

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Pócsi Marianna

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

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Pócsi Marianna

Témavezető: Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A CF patomechanizmusa	9
2.2. A betegség genetikai háttere	11
2.3. A CF klinikai tünetei.....	13
2.4. A CF laboratóriumi diagnosztikája.....	14
2.5. A CF terápiás lehetőségei - középpontban a CFTR modulátorok.....	15
2.6. A CF monitorozásának lehetőségei.....	16
2.6.1. Légzésfunkciós vizsgálatok	16
2.6.2. Képkötő diagnosztika	17
2.6.3. Mikrobiológiai vizsgálatok.....	17
2.6.4. Verejtékklorid teszt.....	17
2.6.5. Laboratóriumi biomarkerek.....	18
2.7. A légúti gyulladással és szövetkárosodással összefüggő biomarkerek CF-ben ..	19
2.7.1. Szérum- és plazma biomarkerek	19
2.7.2. Biomarkerek köpetmintákban.....	23
2.7.3. Biomarkerek a bronchoalveoláris mosófolyadékban.....	25
2.8. Az EMT folyamata cisztás fibrózisban.....	26
3. Célkitűzések	29
4. Anyagok és módszerek	30
4.1. A betegek kiválasztása és a tanulmányok felépítése	30
4.2. Plazma, szérum, köpet- és BAL minták HE4 koncentráció mérése	34
4.3. Sejtkultúrák és kezelési körülményeik	35
4.4. Sejtkultúrák kezeléséhez alkalmazott reagensek	36
4.5. Sejt-életképesség vizsgálat MTT assay-vel	36
4.6. A CFTR-csatornán keresztül folyó kloridáram vizsgálata patch clamp módszerrel	37
4.7. Totál RNS izolálás	38
4.8. A HE4 expresszió gátlása siRNA transzfekcióval CFBE sejtekben	38
4.9. Valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) analízisek.....	38
4.10. Az MMP9 és N-cadherin fehérjék detektálása ELISA módszerrel.....	39

4.11.	Immunfluoreszcens (IF) mikroszkópos vizsgálatok.....	40
4.12.	Etikai engedélyek	41
4.13.	Statisztikai elemzés.....	41
5.	Eredmények.....	43
5.1.	A plazma HE4 koncentráció vizsgálata <i>p.Phe508del</i> -CFTR mutációra homozigóta CF-es betegekben Orkambi® kezelés hatására.....	43
5.1.1.	Különböző klinikai paraméterek és a plazma HE4 szint változásai LUM/IVA (Orkambi®) kezelés hatására	43
5.1.2.	A plazma HE4 szint változás korrelációjának vizsgálata légzésfunkció (ppFEV1) javulásával LUM/IVA kezelés hatására.....	46
5.1.3.	A plazma HE4 szint változás vizsgálata a CF-es tüdőbetegség javulásának előre jelzésében LUM/IVA terápia alatt.....	49
5.2.	A szérum HE4 koncentráció vizsgálata <i>p.Phe508del</i> -CFTR mutációra homozigóta CF-betegekben Kaftrio® kezelés hatására	52
5.2.1.	A LUM/IVA (Orkambi®) és az ETI (Kaftrio®) kezelés hatásának összehasonlítása a szérum HE4 szintek változásán keresztül.....	52
5.2.2.	A szérum HE4 szint változás korrelációjának vizsgálata légzésfunkció (ppFEV1) javulásával LUM/IVA és ETI kezelés hatására	54
5.2.3.	A szérum HE4 koncentráció változás vizsgálata a CF-es tüdőbetegség javulásának előre jelzésében LUM/IVA és ETI kezelés alatt	55
5.2.4.	A két különböző CFTR modulátor (LUM/IVA és ETI) CFTR korrigáló hatásának összehasonlítása a <i>p.Phe508del</i> -CFTR CFBE sejtekben	57
5.2.5.	Az ELX/TEZ/IVA kezelés csökkentette a HE4 koncentrációt a CFBE 410 ⁻ sejtkultúrák felülszójában <i>in vitro</i> körülmények között	60
5.3.	A CF-es betegek köpetmintáiban mért HE4 koncentráció klasszikus gyulladásos paraméterek tükrében.....	61
5.3.1.	A CF-es köpet HE4 szint és a pulmonális exacerbáció közötti összefüggés vizsgálata	62
5.3.2.	Klasszikus gyulladásos paraméterek és a köpet HE4 szint közötti korreláció vizsgálata CF-es betegekben	63
5.4.	A HE4 expresszió vizsgálata a kóros CFTR funkció által kiváltott EMT folyamatában <i>in vitro</i> bronchiális epithelsejt kultúrákban.....	64
5.4.1.	A <i>p.Phe508del</i> -CFTR-t expresszáló CFBE sejtek az EMT-re jellemző tulajdonságokat mutatnak a vad típusú CFBE sejtekkel összehasonlítva	64
5.4.2.	A CFTR funkció korrigálása az epitheliális fenotípus helyreállítását eredményezi a <i>p.Phe508del</i> -CFTR CFBE sejtekben.....	68
5.4.3.	A HE4 expresszió hiánya mezenchimális fenotípust mutató sejtes körülmények között	70

5.4.4. A HE4 csökkent expressziója hozzájárul az EMT kialakulásához, az MMP9 fokozott termelődéséhez és a csökkent sejtproliferációhoz.....	71
5.5. A CF-es légúti körülmények vizsgálata <i>ex vivo</i> CF-es BAL mintákban és annak hatása az EMT folyamatára <i>p.Phe508del</i> -CFTR CFBE sejtekben <i>in vitro</i>	73
5.5.1. A BAL HE4 koncentráció és a légzésfunkció közti korreláció vizsgálata CF-ben	74
5.5.2. A CF-es légúti körülmények hatásának modellezése a <i>p.Phe508del</i> -CFTR CFBE sejtekben CF-es betegek BAL mintáival	75
6. Megbeszélés	77
7. Összefoglalás	91
8. Summary	92
9. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai	93
10. Irodalomjegyzék és publikációs lista	94
10.1. Irodalomjegyzék.....	94
10.2. Publikációs lista.....	108
11. Tárgyszavak – keywords.....	112
12. Köszönetnyilvánítás	113
13. Függelék.....	114

Rövidítések jegyzéke

AAT: α 1-antitripszin

ABC: ATP binding cassette transporter / ATP-kötő kazettás transzporter

AJ: adherens junction / adhéziós sejtkapcsolat

ASL: légúti felszíni folyadékréteg

AUC: area under the curve / görbe alatti terület

BALF: bronchoalveoláris lavage folyadékminta

BMI: body mass index / testtömeg index

CC16: Clara-sejt fehérje (16 kDa)

CF: cisztás fibrózis

CFBE: cisztás fibrózis bronchiális epithelsejt

CFTR: Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor

CFTRm: CFTR modulátor

COPD: krónikus obstruktív tüdőbetegség

CRP: C-reaktív protein

DMSO: dimetil-szulfoxid

EMT: epitheliális–mezenchimális átmenet (tranzíció)

ETI: elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor

FSK: forskolin

GJ: gap junction / sejtközüti réskapcsolat

HE4: humán epididymis protein 4

IBMX: 3-izobutil-1-metilxantin

IPF: idiopátiás pulmonális fibrózis

IL-1 β : interleukin-1 béta

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin-8

IVA: ivacaftor

LCI: Lung Clearance Index / tüdő-tisztulási index

LUM/IVA: lumacaftor/ivacaftor

MBW: Multiple Breath Washout / többszörös légvételes kimosásos vizsgálat

MFI: mean fluorescence intensity / átlagos fluoreszcencia intenzitás

miRNA: mikroRNS

MMP1: mátrix metalloproteináz-1

MMP2: mátrix metalloproteináz-2

MMP8: mátrix metalloproteináz-8

MMP9: mátrix metalloproteináz-9

MPO: myeloperoxidáz

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

mRNS: messenger / hírvivő RNS

NE: neutrophil elasztáz

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

ppFEV1: percent predicted forced expiratory volume in 1 sec / az 1 másodperc alatti erőltetett kilégzési térfogat a prediktált érték százalékában

ROC: the receiver operating characteristic curve

RT-qPCR: real-time quantitative PCR / valós idejű kvantitatív PCR

SLPI: szekrétoros leukocita proteináz inhibitor

TEZ: tezacaftor

TGF β 1: transzformáló növekedési faktor béta 1

TJ: tight junction / szoros sejtközi kapcsolat

TNF- α : tumor nekrosis faktor- α

TWIST1: twist family bHLH transcription factor 1

WFDC: Whey Acidic Protein Four-Disulfide Core

1. Bevezetés

A cisztás fibrózis (CF) egy autoszomális recesszív módon öröklődő genetikai anyagcserebetegség, amelynek hátterében a CFTR (Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor) csatornát kódoló gén mutációja áll. A CFTR fehérje egy klorid/bikarbonát csatorna, amely az epithelsejtek apikális felszínén helyezkedik el, Cl⁻ és bikarbonát-ionokat szállít, valamint szabályozza az ion- és folyadékáramlást. A CFTR génben több, mint 2000 variánst azonosítottak, amelyek közül a leggyakoribb a *p.Phe508del* allél, amely az összes betegséget okozó allél körülbelül 80%-át teszi ki. A genetikai mutációk eredményeképpen a CFTR ioncsatorna nem működik, vagy nem expresszálódik megfelelően. Mindez a külső elválasztású mirigyek megváltozott, besűrűsödött váladéktermelését eredményezi, ez pedig az érintett szervek progresszív károsodását okozza. A betegek korai halálozását elsősorban a fokozatosan beszűkülő légzésfunkció és a krónikus gyulladás talaján kialakuló tüdőfibrózis okozhatja. A tüdőfibrózist megelőzi az ún. epitheliális–mezenchimális tranzíció (EMT), ugyanakkor CF-ben ezen folyamatok patomechanizmusa még nem kellően ismert.

A CF kezelése átfogó, több szakterületet érintő megközelítést igényel, melyben a betegeknek rendszeres orvosi vizsgálatokon kell részt venniük, és pontosan követniük kell az előírt terápiás javaslatokat, amelyet a beteg egyéni tüneteire és szükségleteire igazítanak. Bár a betegség jelenleg nem gyógyítható, a korai diagnózis és a megfelelő ellátás lehetővé teszi a hosszabb, aktívabb életet az érintettek számára.

Az elmúlt évtizedekben a CF ellátásában bekövetkezett jelentős és gyors fejlődés hatására az életkilátások számottevően javultak a korábban gyakran már csecsemőkorban halálos kimenetelű betegségben. A leginkább csak tüneti kezelést biztosító „hagyományos” terápiás lehetőségek mellett megjelentek a molekuláris hibákat célzó specifikus CFTR modulátorok (CFTRm), amelyek már a betegség korai szakaszában hatnak és akár képesek lehetnek megelőzni a végstádiumú tüdőbetegség kialakulását. A várható élettartam ma már elérheti akár az 50–60 évet is.

Mindazonáltal a tüdőbetegség progressziója, amelynek végstádiumában sok esetben csak a tüdőtranszplantáció jelent terápiás lehetőséget, a jelenlegi kezelési lehetőségek mellett is rövidítheti a betegek élettartamát. Emiatt a CF-hez társuló tüdőérintettség folyamatos monitorozása kiemelt jelentőségű a betegellátás során. Azonban a légúti érintettség korai kimutatásának lehetőségei, különösen fiatal életkorban, napjainkban is korlátozottak. Bár a CF klinikai kimenetele jelentősen javult a CFTR specifikus gyógyszerek alkalmazásával, továbbra

is nagy szükség van megbízható vizsgálómódszerekre a CF korai felismeréséhez, a kezelés hatékonyságának nyomon követéséhez, valamint az életveszélyes klinikai szövődmények előrejelzéséhez. Ezért sürgető klinikusi igény mutatkozik új, lehetőleg vérből kimutatható biomarkerek azonosítására és validálására, amelyek megbízhatóan követik a CF-es tüdőbetegség súlyosságát, ezáltal a betegség progresszióját, valamint a terápia hatékonyságát.

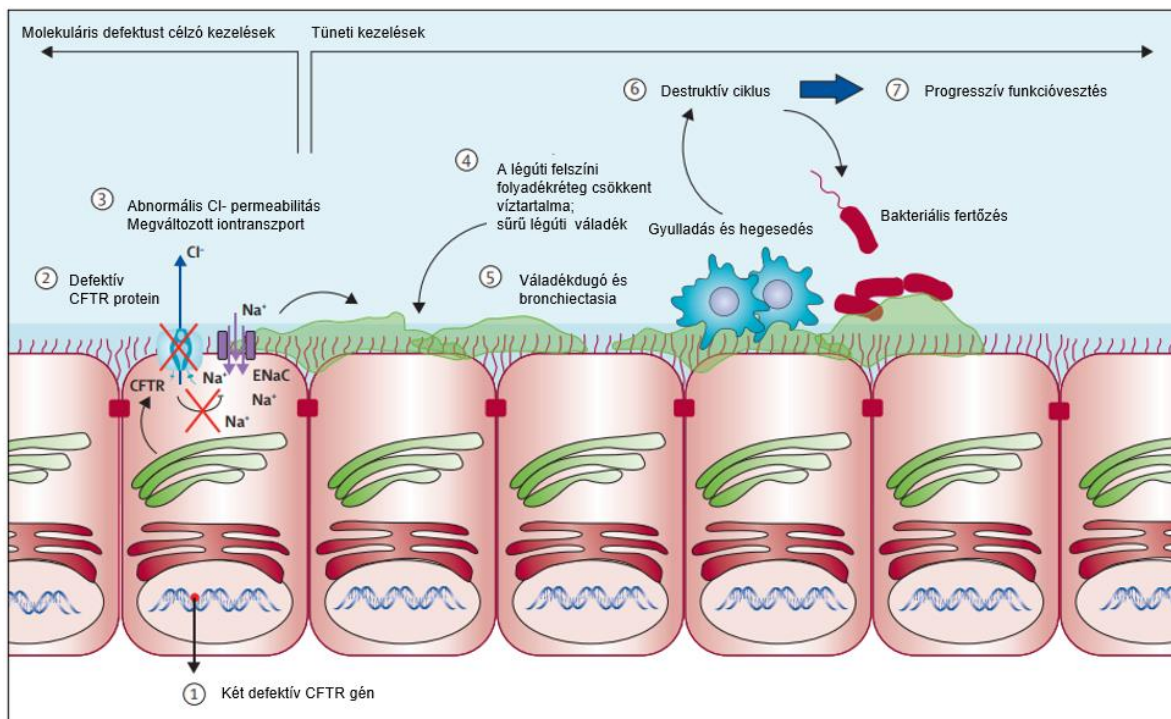
Az értekezésben a már rutin diagnosztikai gyakorlatban jól ismert és bizonyos tumoros betegségekben biomarkerként alkalmazott human epididymis protein 4 (HE4) fehérje potenciális szerepét vizsgáltuk CF-es betegek klinikai állapotának monitorozásában különböző CFTRm kezelés jelenlétében és ennek összefüggését a kezelés hatására bekövetkező légzésfunkciós változásokkal. Ezzel párhuzamosan *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a CF-ben kialakuló EMT mechanizmusát és ezzel összefüggésben a HE4 fehérje expresszió változását *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó bronchiális epithelsejt kultúrában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A CF patomechanizmusa

A CFTR fehérjét érintő génmutációk következtében az epitheliális sejtek apikális felszínén zajló ion- és folyadéktranszport szabályozása zavart szenved. A CFTR egy anioncsatorna, amely Na^+ , Cl^- és HCO_3^- ionokat szállít, ezáltal fenntartja a légutak, az emésztőrendszer, a hasnyálmirigy, a verejtékmirigyek és a reproduktív szervek megfelelő működését. A csatorna működési zavara következtében besűrűsödött nyák termelődik, és ez kedvez a krónikus fertőzések, valamint a gyulladásos folyamatok kialakulásának. A Cl^- transzport jelentős csökkenésének köszönhető a betegség fő patofiziológiai jellemzői.¹ A légutakban a CFTR diszfunkció következtében felborul a Cl^- és Na^+ iontranszport egyensúlya, ami fokozott Na^+ és vízviasszaszívást eredményez. Mindez a légutak felszínén kiszáradásához és a nyák besűrűsödéséhez vezet, amely akadályozza a légutak öntisztulását (mucociliáris clearance), amelyben központi szerepe van a normál összetételű légúti felszíni folyadékrétegnek (airway surface liquid, ASL). Az ASL egy vékony, vizes folyadékréteg, amely a légúti epithéliumot borítja, és elengedhetetlen a tüdő normális működéséhez. Védi a légutakat azáltal, hogy a belélegzett részecskéket a nyálkahártya rétegében fogja meg, és lehetővé teszi a csillók mozgását az alacsony viszkozitású folyadékrétegben, így azok a nyálkahártya-csillók által történő tisztítás révén eltávolíthatók. Az ASL pH-értékének szabályozása szintén kulcsfontosságú, mivel az optimális pH szükséges az antimikrobiális molekulák hatékony működéséhez és a csillók aktivitásához. A CFTR ioncsatorna működése

közvetlenül befolyásolja az ASL összetételét és pH-ját, így annak diszfunkciója súlyosan károsíthatja a légúti védekezőképességet.^{2,3}



1. ábra: A cisztás fibrózis okozta tüdőbetegség patofiziológiai folyamatai. A cisztás fibrózist a *CFTR* gén mutációi okozzák, amelyek olyan kóros folyamatokat indítanak el, amelyek súlyos tüdőkárosodáshoz vezetnek. A hagyományos kezelések főként a tüneteket enyhítik, ezzel szemben a molekuláris hibákat célzó terápiák, mint a CFTR modulátorok, már a betegség korai szakaszában hatékonyak, és képesek lehetnek megelőzni a végstádiumú tüdőbetegség kialakulását. (De Boeck és Amaral 2016-os közleményéből adaptálva)⁴

A CF kimenetelét, a betegek életminőségét és a mortalitási kockázatot elsősorban a légúti érintettség mértéke befolyásolja, amelynek patológiai folyamatai már a csecsemőkor korai szakaszában megindulnak. A sűrű nyák kedvez a krónikus bakteriális kolonizációnak, különösen a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Staphylococcus aureus* által okozott fertőzéseknek. A fertőzések krónikus gyulladásos választ váltanak ki, amely olyan pro-inflammatórikus citokinek fokozott felszabadulásával jár együtt, mint az interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), és tumor nekrosis faktor- α (TNF- α). Ennek eredményeképpen pedig a légúti hám neutrophil granulocyták általi fokozott infiltrációja következik be. Ezek a folyamatok proteázokat és reaktív oxigén gyököket szabadítanak fel, amelyek károsítják a légutak felszínét.⁵ A veseszületett immunválasz és a szervezet gyulladásos reakciójának krónikus szabályozási

zavara központi mechanizmusként merült fel a CF kapcsán, amelyet elsősorban a nuclear factor-kappa B (NF- κ B) jelátviteli útvonal vezérel. A NF- κ B transzkripciós faktor krónikusan aktivált állapotban van a CF-es légúti epithelsejtekben, és ez serkenti a gyulladásos mediátorok termelődését. Egyes anti-inflammatorikus citokinek termelődése csökken, úgy, mint az interleukin-10-é (IL-10), melyek az NF- κ B útvonalat normál körülmények között gátolják.⁶ A neutrophil elasztáz (NE) pedig különösen jelentős szerepet játszik a nyák túlermelésében és a szövetkárosodásban. A folyamat végül bronchiectasiához, légúti obstrukcióhoz és légzési elégtelenséghez vezet (1. ábra).^{7,8}

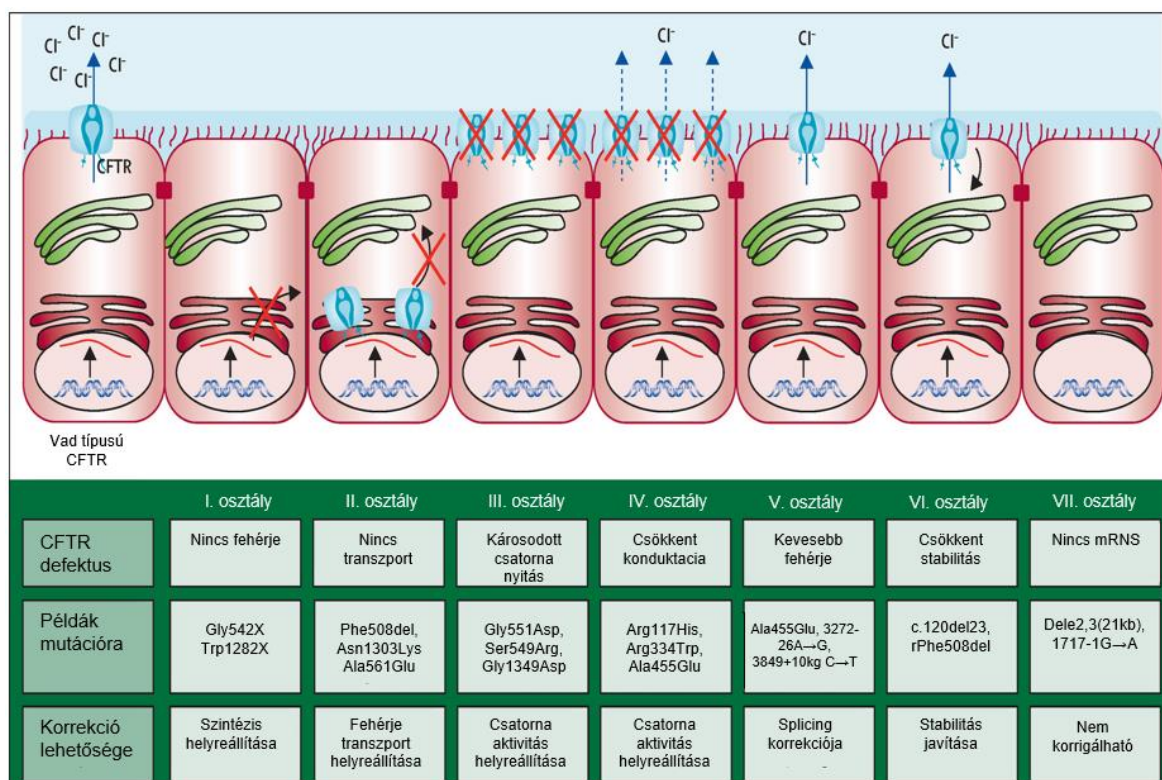
A CFTR diszfunkció nemcsak a légutakat, hanem a pancreas működését is érinti. A pancreasban a CFTR-csatorna szabályozza a HCO₃⁻ szekréciót, amely szükséges a gyomorsav semlegesítéséhez és az emésztőenzimek optimális működéséhez. A CFTR hibás működése vagy kóros expressziója a pancreas kivezetőcsöveinek elzáródását okozza, ami exokrin funkció elégtelenséghez vezet. Ez rontja a lipidek és a fehérjék emésztését malnutríciót és növekedési elmaradást okozva. A pancreas fibrotikus elváltozása következtében kialakulhat a CF-hez társuló diabetes mellitus is. A májban a kis epeutak elzáródása fokális biliáris cirrhosist okozhat, míg a férfiaknál gyakori a kétoldali vas deferens hiánya, ami meddőséghez vezet. A verejtékmirigyekben a CFTR hibás működése miatt a verejték kloridtartalma megemelkedik, amit a kórkép laboratóriumi diagnosztikájában használjuk.⁹

2.2. A betegség genetikai háttere

A CF egy autoszomális recesszív módon öröklődő anyagcserebetegség, amelyet a *CFTR* gén több mint 2000 különböző mutációja okoz. A betegség incidenciája etnikai csoportonként eltérő, leggyakoribb a kaukázusi populációban, ahol kb. 1:3000-1:4000 közé tehető. Más etnikai csoportokban ritkább, például az afroamerikaiaknál 1:15000-1:20000 a CF előfordulása, míg az ázsiai populációban még ritkább, 1:10000 és 1:100000 közé tehető. A *CFTR* gén a 7-es kromoszóma hosszú karján, a 7q31.2 régióban található és egy 27 exonból álló szekvenciát kódol, amely egy 1480 aminosavból álló fehérjét eredményez.¹⁰ A *CFTR* gént 1989-ben azonosították. Ez volt az első alkalom, hogy egy emberi betegséghez kapcsolódó gént azonosítottak, és ez a siker jelentős lendületet adott a Humán Genom Projektnek is.¹¹ A CFTR fehérje az epitheliális sejtek apikális membránján helyezkedik el, és az ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter családba tartozik, de egyedülálló abban, hogy nem klasszikus transzporter, hanem egy szabályozható transzmembrán Cl⁻ ioncsatornaként működik.¹⁰

A CFTR gén mutációi a fehérje szerkezetének és működésének különböző szintjein okozhatnak zavart (2. ábra). A mutációkat funkcionális osztályokba sorolják, amelyek a következőképpen jellemezhetők:

- I. osztály: a fehérje nem termelődik
- II. osztály: fehérjeérés zavara és korai degradáció
- III. osztály: hibás csatornaműködés (alacsony nyitási frekvencia)
- IV. osztály: csökkent konduktancia
- V. osztály: csökkent fehérjetermelődés
- VI. osztály: fokozott lebomlás
- VII. osztály: CFTR specifikus mRNS hiánya



2. ábra: A CFTR génmutációk alcsoportjai és terápiás stratégiák. A CFTR-mutációkat hét funkcionális osztályba sorolják, azt feltételezve, hogy ugyanazok a modulátorok alkalmazhatóak az adott osztályba tartozó összes mutációra. Ugyanakkor a VII. osztályba tartozó mutációk esetén feltételezhetően egyetlen jelenlegi modulátor sem alkalmazható, viszont a terápiás stratégia alternatív kloridcsatornák serkentését foglalhatja magában (De Boeck 2020-as közleményéből adaptálva).¹²

A leggyakoribb mutáció az *p.Phe508del*, amely a betegek kb. 80%-ában fordul elő. Ez a II. osztályba tartozó mutáció, amely a CFTR fehérje kóros folding-ját okozza, így az nem jut el a sejtmembránba, hanem az endoplazmatikus retikulumban lebomlik. Az ilyen típusú mutációk súlyos klinikai fenotípussal járnak, beleértve a légúti, emésztőrendszeri és reprodukív szervrendszeri érintettséget.

A CFTR fehérje öt fő doménből áll: két transzmembrán domén (TMD1 és TMD2), két nukleotidkötő domén (NBD1 és NBD2), valamint egy szabályozó domén (RD). A transzmembrán domének határozzák meg az ioncsatorna pórusát, míg az NBD-k az ATP kötéséért és hidrolíziséért felelősek, ami a csatorna nyitását és zárását szabályozza. A szabályozó domén foszforilációja szintén kulcsfontosságú a CFTR aktivációjához. A *CFTR* gén több, mint 2000 variánsa ismert, amelyek közül nem mindegyik okoz klasszikus cisztás fibrózist. A genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálata során kiderült, hogy bizonyos mutációk enyhébb klinikai képet eredményeznek, például izolált vas deferens hiányt vagy krónikus pancreatitist. A genetikai tesztelés elérhetősége és fejlődése lehetővé tette a CFTR-hez kapcsolódó betegségek szélesebb spektrumának felismerését, valamint a célzott terápiák alkalmazását. A CFTR specifikus gyógyszerek, például ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor és elexacaftor különböző *CFTR* génmutációk jelenlétében képesek javítani a CFTR működését. Ezek a gyógyszerek a fehérje érését, a sejtmembránba való kijutását vagy a csatornaműködését befolyásolják, és jelentős javulást eredményeznek a tüdőfunkcióban, a tápláltsági állapotban és az életminőségben.¹³

2.3. A CF klinikai tünetei

A CF egy több szervet érintő betegség, melyben a klinikai kép leggyakrabban a légzőrendszert, az emésztőrendszert és a reprodukív rendszert érinti. A betegség számos esetben már újszülöttkorban megnyilvánul. Az egyik legkorábbi jel az újszülöttkori bélelzáródás (meconium ileus), amely a CF-es újszülöttek mintegy 10–20%-ánál fordul elő a bélben képződő sűrű, tapadós széklet következtében. A születés utáni elhúzódó sárgaság, rossz súlygyarapodás, zsírszéklet (steatorrhoea) és haspuffadás is korai figyelmeztető jelek lehetnek a pancreas exokrin elégtelenség miatt. A CF-ben szenvedő csecsemők gyakran jó étvágy mellett sem híznak, ami a malabszorpció és a fokozott energiavesztés következménye.¹⁴

A légúti hámsejtekben a viszkózus nyáktermelés akadályozza a mucociliáris tisztulást. Ennek következményei lehetnek a krónikus köhögés, sípoló légzés, ismétlődő alsó légúti

fertőzések és bronchiectasia. A krónikus gyulladás és fertőzés progresszív tüdőkárosodást okozhat.¹⁵

A pancreas kivezetőcsöveiben kialakuló elzáródás exokrin elégtelenséghez vezethet, ami zsírfelszívódási zavart, vitaminhiányt (A, D, E, K), növekedési elmaradást és hypoproteinémiát okozhat. Máj- és epeúti elzáródások, valamint CF-asszociált májbetegség (CFLD) szintén megfigyelhetők, csakúgy, mint a betegséghez kapcsolódó diabetes (CFRD). A verejtékmirigyek károsodása miatt a verejték Cl^- és Na^+ tartalma megnövekszik, ez képezi az izzadságteszt alapját. A férfiak > 95%-ában megfigyelhető az obstruktív azoospermia a kétoldali *vas deferens* hiánya miatt, míg a nők fertilitása is csökkent lehet a cervixnyák viszkózitása miatt. Gyakran előforduló tünet lehet még a krónikus sinusitis és az orrpolip is.¹⁶

2.4. A CF laboratóriumi diagnosztikája

A CF diagnózisa olyan laboratóriumi módszereken alapul, amelyek célja az abnormális CFTR-funkció közvetlen vagy közvetett hatásának kimutatása, illetve a genetikai eltérés azonosítása. A diagnosztikai folyamat több lépésből áll: újszülöttkori szűrés → verejték-klorid teszt → genetikai analízis → kiegészítő funkcionális vizsgálatok. A legtöbb fejlett országban a CF kimutatása már újszülöttkorban megkezdődik. A szűrés első lépése az immunreaktív tripszinogén (IRT) meghatározása szárított vérmintából. A magas IRT-érték pancreas elégtelenségre utal, amely CF-ben gyakori. A pozitív újszülöttkori eredmény még nem diagnosztikus, további megerősítést igényel.¹⁴ A diagnózis alapját a pilokarpin-iontoforézissel nyert verejték elektrolit vizsgálata adja. A 60 mmol/L vagy annál magasabb kloridkoncentráció erősen valószínűsíti a CF diagnózist, míg az intermedier tartományban (30–59 mmol/L) további tesztek szükségesek. Az alacsony (< 30 mmol/L) érték a CF ellen szól.¹⁷

A verejték-teszt megerősítése után a *CFTR* gén mutációanalízise következik. Első lépésben célzott mutációpanelt alkalmaznak, amely a leggyakoribb variánsokat (pl. *p.Phe508del*) vizsgálja. Amennyiben ez a vizsgálat negatív, de a klinikai gyanú erős, teljes génszekvenálás (NGS), valamint kópiaszám-változás (CNV) vizsgálata javasolt. A genetikai lelet értelmezése genetikai tanácsadás keretében történik, mivel a genotípus–fenotípus összefüggések nem mindig egyértelműek.

Amennyiben a genetikai eredmények és a klinikai kép ellentmondásos, a CFTR-funkció közvetlen mérése javasolt. Erre a célra a Nasal Potential Difference (NPD) vizsgálatot alkalmazzák, amely az orrnyálkahártya iontranszportját méri és képes elkülöníteni a CFTR-

függő és független ionáramlást, illetve egy másik módszer az Intestinal Current Measurement (ICM), amely a végbélhám iontranszportját vizsgálja *ex vivo* körülmények között. Ezek a módszerek referenciaközpontokban végezhetők, különösen ritka vagy új CFTR-variánsok diagnosztikai értékelésére.⁴ A CF diagnózisa megerősítettnek tekinthető, amennyiben jellegzetes klinikai tünetek állnak fenn (pl. pulmonális bakteriális kolonizáció, pancreas-elégtelenség), és két kóros CFTR-mutáció azonosítható *transz* állásban, vagy ismételt vizsgálatok során kóros verejték-klorid érték igazolható.

2.5. A CF terápia lehetőségei - középpontban a CFTR modulátorok

A CF kezelése az utóbbi évtizedben forradalmi változáson ment keresztül. Korábban a terápia fő célja a tüneti kezelés volt – a légúti fertőzések kontrollja, a nyák oldása, a gyulladás mérséklése, a tápanyag- és enzim-pótlás, valamint súlyos esetben a tüdőtranszplantáció.¹⁷ Mindezek mellett ma már rendelkezésre állnak olyan új gyógyszermolekulák, ún. CFTRm, amelyek közvetlenül a betegség molekuláris okát célozzák. A hibás CFTR-fehérje funkciót állítják helyre különböző mechanizmusokon keresztül. Egyik fő csoportjukat a potenciátorok adják, melyek a csatorna nyitási valószínűségét növelik (pl. *ivacaftor*), valamint a korrektorok, amelyek javítják a hibás fehérje folding-ot és a fehérje sejtmembránba történő kikerülését (pl. *lumacaftor*, *tezacaftor*, *elxacaftor*), illetve ezen molekulák kombinációját tartalmazó készítmények, amelyek a két mechanizmust egyesítik.^{18, 19}

Az első áttörést a Kalydeco® (*ivacaftor*) jelentette, amelyet potenciátorként a III. csoportba tartozó *p.Gly551Asp* mutáció és más „gating” mutációk esetén alkalmazható, ahol FEV₁ (1 másodperc alatt erőltetetten kilélegzett levegő térfogata) értékek javulását, kevesebb exacerbációt és csökkenő verejtékklorid értéket eredményezett. Az Orkambi® (*lumacaftor/ivacaftor*) volt az első kombinált CFTR-modulátor gyógyszer, amelyet kifejezetten a *p.Phe508del* mutációt hordozó homozigóta betegek kezelésére fejlesztettek ki. A *lumacaftor* (VX-809) elősegíti a hibásan „hajtogatott” CFTR-fehérje megfelelő konformációját és sejtfelszínre jutását²⁰, míg az *ivacaftor* (VX-770) potenciátorként fokozza a már expresszált csatorna nyitvatartási valószínűségét.²¹ A klinikai vizsgálatokban az Orkambi® alkalmazása csak mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns javulást eredményezett a légzésfunkcióban, valamint csökkentette az exacerbációk előfordulását.²² A LUM/IVA kombinációnak folyamatosan kitett betegek esetében a FEV₁ %-os értéke nőtt (+3,67%), a testtömegindex emelkedett (+0,73 kg/m²), és az intravénás antibiotikum-kurák száma 35%-kal csökkent.²³ A

Kaftrio® (az USA-ban Trikafta®) már egy hármas kombinációs terápia, amely a CFTR-modulátorok új generációját képviseli: két korrektort (*elexacaftor* és *tezacaftor*) és egy potenciátort (*ivacaftor*) tartalmaz. Az *elexacaftor* és a *tezacaftor* szinergikusan stabilizálják a hibás CFTR fehérjét, míg az *ivacaftor* tovább növeli a csatorna aktivitását.^{24,25} Ez a komplex gyógyszer még hatékonyabbnak bizonyult, mint a kettős kombináció: a FEV1 értéke 4 hét után 13,8 százalékponttal, 24 héten keresztül pedig 14,3 százalékponttal volt magasabb, míg a pulmonális exacerbációk aránya 63%-kal volt alacsonyabb.²⁴

Az Orkambi® a *p.Phe508del* homozigóta betegekben,²⁶ míg a Kaftrio® már a CF-es betegek jelentős részét kitevő *p.Phe508del* összetett heterozigóta genotípusok esetén is hatásosnak bizonyult.²⁷ A CFTRm terápia korai, még a kifejezett strukturális tüdőkárosodás kialakulása előtti bevezetése nagy mértékben lassítja a tüdőbetegség progresszióját, csökkenti a légúti akut exacerbációk, a kórházi kezelések és az antibiotikumok szükségességének gyakoriságát, továbbá mérsékli az extrapulmonális szövődményeket, többek között javítva a betegek tápláltsági és általános metabolikus állapotát.

2.6. A CF monitorozásának lehetőségei

A CF klinikai lefolyását több tényező – fertőzés, gyulladás, szöveti károsodás – befolyásolja, amelyek nem mindig követhetők csak tünetek vagy funkcionális vizsgálatok (pl. spirometria) alapján. A betegség lefolyása egyénenként eltérő, ezért a rendszeres és komplex monitorozás elengedhetetlen a korai állapotromlás felismeréséhez, a terápiás döntések megalapozásához és a CFTRm kezelések hatékonyságának értékeléséhez.²⁸ A monitorozás multidiszciplináris megközelítést igényel, amelyben kombinálják a klinikai, funkcionális, mikrobiológiai, képalkotó és biomarker alapú módszereket.

2.6.1. Légzésfunkciós vizsgálatok

A légzőszervi állapot monitorozásának központi eleme a spirometria, különösen a ppFEV1 (percent predicted forced expiratory volume in 1 second) értéke. A ppFEV1 az egyik legfontosabb prognosztikai marker, jól korrelál a légúti betegség súlyosságával és ezáltal a túléléssel, évenkénti 1–3%-os csökkenése CF-betegekben a progresszió jele. Ugyanakkor CFTR-modulátor terápia mellett a ppFEV1 növekedése a klinikai javulás korai indikátora lehet.²⁴ Fiatal CF-es betegekben, illetve enyhe tüdőérintettség esetén a módszer érzékenysége viszont korlátozott, mivel nem képes megfelelően detektálni az intrapulmonális folyamatok finom változásait, valamint bizonyos terápiás beavatkozások hatékonyságát; továbbá

kisgyermekes esetében a spirometria kivitelezése gyakran technikai nehézségekbe ütközik.²⁹ A tüdő-tisztulási index (Lung Clearance Index, LCI) mérés, a többszörös légvételes kimosásos vizsgálat (Multiple Breath Washout, MBW) együtt érzékenyebb a kis légúti funkcióváltozásokra, különösen gyermekeknél. Az LCI már akkor kóros lehet, amikor a ppFEV1 még normális, ezért korai markernek számít a betegség progressziójának előrejelzésére.^{30, 31}

2.6.2. Képalkotó diagnosztika

A mellkas CT a strukturális elváltozások (bronchiectasia, nyálkaretenció, parenchyma destrukció) detektálásának legérzékenyebb módszere. A CT-felvételeket kvantitatív értékelő szoftverek (pl. PRAGMA-CF) segítségével a betegség súlyossága objektíven meghatározható. Ugyanakkor a sugárterhelés miatt a CT nem alkalmas gyakori ismétlésre, ezért funkcionális és biomarker alapú módszerekkel kombinálva ajánlott.³² A mellkasi MRI alternatív, sugármentes módszer, amely jól korrelál a gyulladásos aktivitással és a CFTRm terápia hatásával, különösen gyermekeknél.³³

2.6.3. Mikrobiológiai vizsgálatok

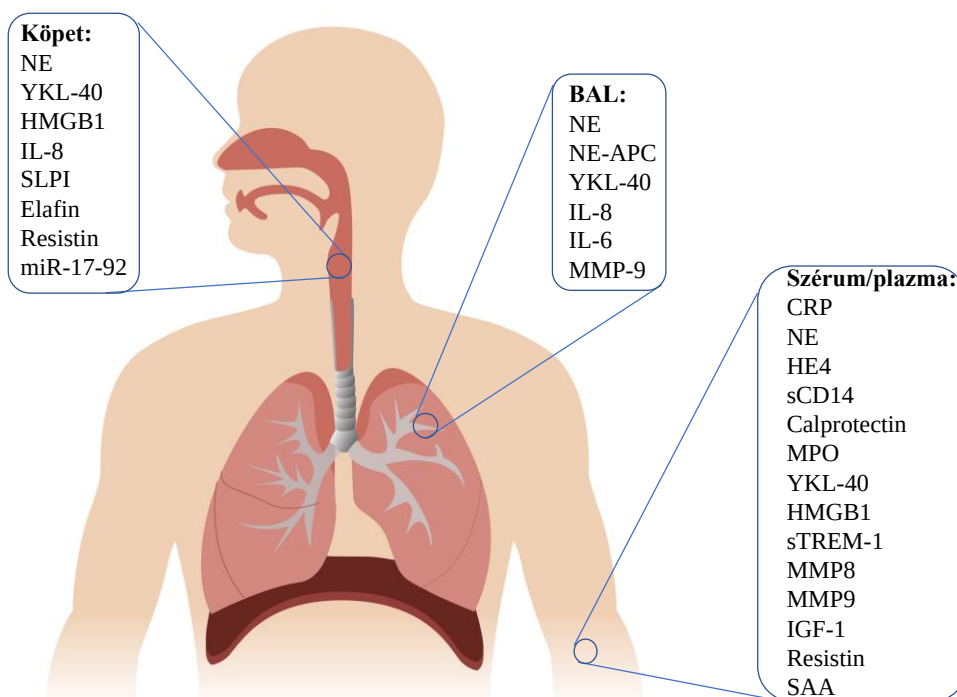
A krónikus légúti bakteriális kolonizáció (elsősorban *Pseudomonas aeruginosa* és *Staphylococcus aureus*) meghatározza a betegség progresszióját. A köpet-, torokváladék- és orrgaratminta rendszeres tenyésztése szükséges a fertőzések korai felismerése és célzott antibiotikus kezelés mielőbbi alkalmazása érdekében. A mikrobiom-analízis (16S rRNS szekvenálás) új perspektívát ad, mivel képes feltárni a légúti ökoszisztéma diverzitásának változását a modulátor terápia hatására.³⁴

2.6.4. Verejtékklorid teszt

A verejtékklorid koncentráció gyors csökkenése közvetett módon igazolja a javuló CFTR funkciót CFTR modulátor kezelések alatt.^{35, 36} Elegendő mennyiségű verejtékminta gyűjtése csecsemőkorban azonban újabb technikai nehézséget jelenthet. Továbbá a verejtékklorid koncentrációmérés értékelését nehezítheti a jelentős intra- és interindividuais variabilitás.^{37, 38} Korábbi CFTR modulátor kezelések hatásosságát vizsgáló tanulmányok *post-hoc* analízise során arra jutottak, hogy a verejtékklorid koncentráció változásai populációs szinten ugyan összefüggtek a légzésfunkciós változásokkal, de egyéni szinten nem jósolták meg a CFTR modulátor kezelés hasznosságát.³⁹

2.6.5. Laboratóriumi biomarkerek

Az utóbbi években a biomarkerek szerepe egyre fontosabbá vált, mivel lehetővé teszik a korai, szubklinikai változások kimutatását, amikor a hagyományos paraméterek (pl. ppFEV1) még nem mutatnak jelentős eltérést. A biomarkerek segíthetnek a betegség aktivitásának, progressziójának korai felismerésében, terápiás válasz nyomon követésében, valamint új gyógyszerek (pl. CFTR modulátorok) hatásának értékelésében.²⁸ Figyelembe véve, hogy a betegség patomechanizmusában alapvető folyamat a krónikus légúti gyulladás, a monitorozásban fontos szerepe lehet a gyulladásos mediátorok detektálásának vérből vagy a légúti felszínről származó mintákból (köpet és/vagy bronchoalveoláris mosófolyadék, BAL) (3. ábra). Az alábbiakban különböző mintatípusokból analizált laboratóriumi paraméterekről gyűjtöttük össze a legfontosabb ismereteket.



3. ábra: A CF-hez társuló gyulladásos folyamatok követésére alkalmas biomarkerek köpet, BAL és szérum/plazma mintákból. BAL: bronchoalveoláris lavage, CF: cisztás fibrózis, miR: mikroRNS, NE: neutrophil elasztáz, NE-APC: neutrophil elasztáz antiproteáz komplex, HMGB1: high mobility group box 1 protein, SLPI: secretory leukocyte protease inhibitor, CRP: C-reaktív protein, HE4: human epididymis protein 4, sCD14: szolúbilis CD14, MPO: myeloperoxidáz, sTREM-1: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, MMP-8,-9: mátrix metalloproteináz-8,-9, IGF-1: Insulin-like growth factor 1, SAA: serum amyloid A, YKL-1: Chitinase 3-like 1. (A témavezető saját ábrája).

2.7. A légúti gyulladással és szövetkárosodással összefüggő biomarkerek CF-ben

Az ideális biomarkert az alábbi jellemzőkkel írhatjuk le: érzékenyen reagál a betegség állapotváltozásaira („responsiveness”), jól korrelál a klinikai végpontokkal, reprodukálható és standardizálható mérésekhez alkalmas, mintanyerésnél minimálisan invazív (különösen gyermekek esetén).

2.7.1. Szérum- és plazma biomarkerek

A légúti gyulladás nyomon követésének egyik legkézenfekvőbb, analitikailag jól standardizálható és reprodukálható megközelítése a biomarkerek vérmintából – plazmából vagy szérumból – történő meghatározása. A vérvétel rutinszerű, minimálisan invazív beavatkozás, amely életkortól és betegségcsoporttól függetlenül biztonságosan és könnyen kivitelezhető.⁴⁰

⁴¹ A szisztémás biomarkerek előnye, hogy jól tükrözhetik a tüdőben zajló gyulladásos és immunológiai folyamatokat, valamint korrelálhatnak a klinikai állapottal, a tüdőfunkcióval (pl. ppFEV1), és a CFTR modulátor terápia hatékonyságával.

A CF-re jellemző fokozott neutrophil granulocytá aktiváció következtében kialakult légúti gyulladás hatására számos plazmafehérje és citokin koncentrációja megváltozik, jelezve a szisztémás és lokális gyulladásos aktivitást. A C-reaktív protein (CRP) az egyik legszélesebb körben vizsgált akut fázisfehérje, amelynek szintje akut exacerbációban jelentősen emelkedik, és jól korrelál a klinikai gyulladásos aktivitással, illetve a betegség súlyosságával. Bár nem specifikus CF-re, a CRP a terápiás válasz – különösen az antibiotikum és CFTR-modulátor kezelés – monitorozására is alkalmasnak találták.⁴²

A pro-inflammatórikus citokinek, elsősorban az interleukin-6 (IL-6), az interleukin-8 (IL-8) és a tumor necrosis factor- α (TNF- α) kulcsszerepet játszanak a gyulladás fenntartásában és a neutrophil aktivációban. Ezek szérumszintje exacerbációban emelkedik, majd antibiotikum terápia hatására csökken, ami alkalmassá teszi őket a gyulladás dinamikájának követésére. Különösen az IL-8 tekinthető jelentős biomarkernek, mivel közvetlenül elősegíti a neutrophil granulocyták toborzását a légutakba, és szoros összefüggést mutat a tüdőkárosodás mértékével, valamint a tüdőfunkció romlásával.⁴³

A neutrophil granulocytákból túlzott és tartós aktiváció hatására nagy mennyiségben szabadulnak fel proteázok és gyulladásos mediátorok - mint a például a NE, MPO és calprotectin - amelyek hozzájárulnak a tüdőszövet strukturális károsodásához és a krónikus gyulladás fennmaradásához.⁴⁴

A calprotectin fehérje szisztémás gyulladás és fertőzés során nagy mennyiségben jut a keringésbe, szérum- és plazmaszintje jól korrelál a tüdőfunkciós paraméterekkel, valamint a betegség klinikai súlyosságával, fontos antimikrobiális hatása ismert.⁴⁵ A szérum calprotectin koncentráció változása klinikailag releváns változásokat jelezhet a CF betegség aktivitásában felnőttekben és gyermekekben egyaránt.^{46, 47} Emelkedése az exacerbációk során, majd csökkenése sikeres kezelés után a gyulladásos aktivitás érzékeny jelzőjévé teszi.⁴⁸ Mindezekon túl a szérumkoncentrációja összefüggést mutatott a klinikailag jelentős állapotváltozásokkal mind CF-es felnőttekben, mind a gyermekekben.^{46, 47}

A myeloperoxidáz (MPO) a neutrophilek granulumaiból különböző stimulusok hatására fokozottan felszabaduló enzim, amely olyan reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésében vesz részt, mint a baktericid hatású hipoklórsav⁴⁹, de egyben a szöveti oxidatív károsodáshoz is hozzájárul. A plazma MPO koncentrációja összefügg a gyulladás intenzitásával, valamint a krónikus tüdőkárosodás progressziójával.⁴⁴ CF-ben az MPO szintje összefüggésben állt a *P. aeruginosa* kolonizációval, és alkalmas volt a gyulladáscsökkentő (pl. *azithromycin*) terápia, vagy a pulmonális exacerbáció miatti antibiotikum kezelés monitorizálására, továbbá az exacerbáció rövidtávú előrejelzésére is.^{45, 50, 51, 52} A neutrophilek TNF- α hatására különböző mátrix metalloproteinázokat (MMP) is termelnek, melyek indukálják a légúti gyulladás és „remodelling” folyamatát CF-ben.⁵³ A szérum vagy plazma MMP-8 és MMP-9 szintek jelentősen emelkedettek voltak CF-ben a kontroll személyekhez képest, különösen a légúti exacerbáció idején.^{54, 55, 56} Az MMP-8 összefüggést mutatott a FEV1 % értékével is, míg antibiotikum kezelést követően az MMP-1, MMP-8 és MMP-9 csökkenését figyelték meg.⁵⁴

A neutrophil elasztáz (NE) a CF egyik legfontosabb patogén proteáz markere. Egy szövetkárosító szerin-proteáz, amely a neutrophilek degranulációja során szabadul fel és az extracelluláris mátrix bontásán keresztül bronchiectasiát és parenchyma pusztulást idéz elő. Az NE lebontja az elasztint és az extracelluláris mátrix komponenseit, valamint fokozza az epitheliális sejtek károsodását. A vérben mért NE-aktivitás a légúti destrukció biokémiai indikátorának tekinthető, és emelkedett szintje rosszabb klinikai kimenetellel társul.²⁸ Az NE az extracelluláris mátrix fehérjével, az antiproteázokkal kölcsönhatásba lépve neutrophil elasztáz antiproteáz komplexet (NE-APC) képez.⁵³ A plazma NE-APC szintje tehát emelkedett a CF-es betegekben, ami folyamatosan jelzi a gyulladás és a tüdőkárosodás folyamatának fennmaradását két exacerbáció között, függetlenül a bakteriális kolonizáció típusától.⁵⁷ Emelkedett NE-APC szinteket mértek magas lázzal és kifejezett leukocytosissal járó pulmonális exacerbáció alatt, míg intravénás antibiotikum hatására jelentősen lecsökkent a plazma NE-APC szintje.⁵⁸

A proteáz–antiproteáz egyensúly felborulása központi szerepet játszik a CF patomechanizmusában. A secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) és az α 1-antitripszin (AAT) a fő antiproteázok, amelyek a NE és más proteázok hatását ellensúlyozzák, azonban CF-ben ezek a védőmechanizmusok elégtelenek, ami a légúti szövetek progresszív destrukcióját eredményezi.²⁸

A CF patomechanizmusában a krónikus gyulladás és fertőzés mellett meghatározó szerepet játszik a légúti epithelium strukturális és funkcionális károsodása, amely hozzájárul a nyák viszkozitásának fokozódásához, a mucociliáris tisztulás romlásához és a kórokozók perzisztálásához.²⁸ Az epitheliális sejtekből származó, vérben is mérhető fehérjék fontos információt adhatnak a szöveti regeneráció és károsodás folyamatáról.

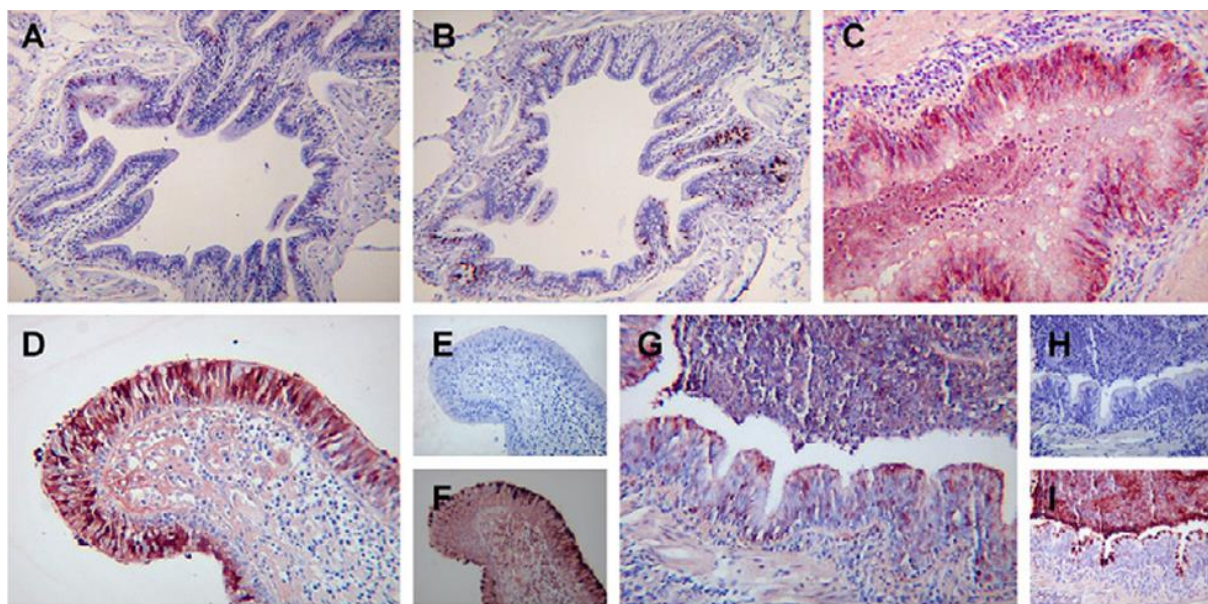
A Clarasejt fehérje (CC16) egy 16 kDa molekulatömegű fehérje, amelyet a terminális bronchiolusok Clara-sejtjei termelnek. Ez a protein anti-inflammatorikus és protektív tulajdonságokkal is rendelkezik, szerepe kulcsfontosságú a légúti epithelium integritásának fenntartásában.⁵⁹ CF-ben a szérumszint és bronchoalveoláris lavage folyadék (BALF) CC16 szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint egészséges kontrollokban, ami a hámkárosodás mértékét tükrözi. Laguna és munkatársai kimutatták, hogy a CC16 koncentráció negatívan korrelált a neutrophil sejtszámmal és a gyulladásos citokinek szintjével, így a légúti epitheliális integritás indirekt markereként szolgálhat.⁶⁰

Annak ellenére, hogy a CF-ben zajló, tüdőt érintő gyulladásos folyamatok monitorozására számos potenciális biomarkert azonosítottak és vizsgáltak, egyelőre egyik sem vált rutinszerűen alkalmazottá a klinikai gyakorlatban azok analitikai körülményei vagy az értékelésük során megnyilvánuló limitációk miatt.⁶¹ Jelenleg nem állnak rendelkezésre olyan megbízható, kellően érzékeny és specifikus szérumszintű biomarkerek, amelyek pontosan tükrözik a CFTR-modulátorok, – akár a hagyományos gyulladáscsökkentő és antibiotikus kezelések – terápiás hatékonyságát. A legtöbb vizsgált gyulladásos fehérje (pl. CRP, IL-6, IL-8) és neutrophil eredetű marker (pl. calprotectin, NE) ugyan szorosan korreláltak a betegség aktivitásával, de nem voltak elég specifikusak és érzékenyek a kezelésre adott válasz objektív követésére.⁶² A HE4, más néven Whey Acidic Protein Four-Disulfide Core Domain Protein 2 (WFDC2), egy kis molekulatömegű glikoprotein, amely a whey acidic protein (WAP) fehérjecsalád tagja. A WFDC proteincsalád kis méretű fehérjéket foglal magában, amelyek különböző, rendszerint protektív funkciót látnak el, például antiproteáz, antibakteriális, vagy gyulladáscsökkentő tulajdonsággal bírnak.⁶³ A HE4-et eredetileg az epididymis (mellékhere) epitheliális sejtjeiben azonosították, de később kimutatták, hogy széles körben expresszálódik a légúti, endometriális, vese- és hasnyálmirigy hámsejtekben is.²⁸ Mindemellett gyulladásos és

immunmodulációs funkcióval is rendelkezik: gátolja a neutrophil eredetű proteázokat, például NE-t, így a légúti szövetek proteolitikus károsodásának egyik endogén ellensúlyozó tényezője lehet.^{28, 64}

A HE4 fehérje expresszióját számos egészséges és malignus szövetben kimutatták.⁶⁵ Legismertebb klinikai alkalmazása az ovárium carcinoma diagnosztikájához és követéséhez kapcsolódik, de endometrium carcinomában⁶⁶ és tüdőtumorban⁶⁷ is vizsgálták tumormarkerként.

A CF és az abnormalis HE4 expresszió potenciális kapcsolatát vizsgálva egy korábbi tanulmányban immunhisztokémiai módszerrel kimutatták, hogy a HE4 főként a bronchiális epithelsejtek citoplasmájában lokalizálódik⁶⁴, illetve munkacsoportunk elsőként vizsgálta, hogy CF-es betegekben a fehérje szintje megemelkedik a keringésben is egészséges egyénnel összehasonlítva. A plazma HE4 szint emelkedése CF-es betegekben a neutrophil aktiváció és az oxidatív stressz mértékével korrelál, és a betegség súlyosságának biomarkereként értékelhető.^{28, 68}



4. ábra: A HE4 (WFDC2) fehérje fokozott expressziója CF-es betegek tüdőbiopsziás szövettani mintáiban. Normál (A, B) és CF-es tüdőszövet (C–I) immunhisztokémiai megfestése WFDC2-re (A, C, D, G), SLPI-re (B, E, H) és mucin 5AC-ra (F, I). Az eredeti felvételeknél 100x (A, B) és 200x (C, D, E, F, G, H, I) nagyítást alkalmaztak. (Bingle és munkatársai 2006-os közleményéből adaptálva.)⁶⁴

A HE4 egyik legfontosabb klinikai vonatkozása a CF tekintetében, hogy szérum- és plazmaszintje dinamikusan változik a CFTR-modulátor kezelés hatására. Munkacsoportunk

három független, *p.Gly551Asp* mutációt hordozó betegcsoportban vizsgálta a HE4 plazmaszintjét *ivacaftor* kezelés megkezdése előtt és után. A vizsgálat alapján a HE4 koncentrációja már a terápia első hónapjában szignifikánsan csökkent és ez a csökkenés tartósan fennmaradt a 3–6 hónapos követés során.⁶⁹ Ezt követően egy másik tanulmányban munkacsoportunk *p.Phe508del*-CFTR bronchiális epithelsejtekben *in vitro*, illetve egy kis számú (n=10) *p.Phe508del*-CFTR mutációra homozigóta CF-es betegcsoport plazma mintáiban vizsgálta a HE4 koncentrációját *ivacaftor/lumacaftor* kezelés hatására. A kombinált *ivacaftor/lumacaftor* kezelés az *ivacaftor*hoz képest nagyobb HE4 szint csökkenést eredményezett mind a plazmában, mind a bronchiális epithelsejtek felülűszójában.⁷⁰

2.7.2. Biomarkerek köpetmintákban

A köpet a légúti gyulladás és fertőzés lokális környezetének legjobb tükröje, ugyanakkor a köpetmintából történő biomarker meghatározás során számos technikai tényezőt kell figyelembe venni, amelyek a vizsgálatok kivitelezését és értékelését egyaránt befolyásolhatják. Bár a mintavétel nem invazív eljárás, a minta megfelelő minőségének biztosítása aktív betegkooperációt igényel, ezért kisgyermekes esetekben ez a módszer általában nem alkalmazható megbízható mintaforrásként. További korlátozó tényező, hogy a köpetmintát a levételt követően azonnal fel kell dolgozni, mivel a nem megfelelő szállítási vagy tárolási körülmények jelentős preanalitikai hibát eredményezhetnek, amelyek torzíthatják a biomarker-szintek meghatározását.^{71,72} Habár a standardizált mintavételi protokollok és mérési eljárások hiánya jelenleg nem teszi lehetővé a köpetből származó biomarkerek rutinszerű klinikai alkalmazását, több tanulmány igazolta, hogy bizonyos gyulladásos mediátorok koncentrációjának meghatározása alkalmas lehet a légzésfunkció romlásának korai előrejelzésére, valamint a terápiás beavatkozások hatékonyságának nyomon követésére.⁷³

A CF-es légúti betegségekre jellemzőek a rekurrens infekciók és a krónikus gyulladás, amely neutrophil granulocyták aktivációjával és pro-inflammatórikus citokinek (pl. IL-6, IL-8, IL-1 β) fokozott termelésével jár együtt.^{5,74} Az IL-8 a neutrophil kemotaxis egyik fő mediátora, és a CF-es légutakban a krónikus gyulladás központi eleme. A köpetben mért IL-8-koncentráció emelkedése exacerbációk során jól tükrözi a neutrophil aktiváció mértékét és a FEV1 %-os értékkel fordítottan korrelál.⁷⁵ A szérumhoz képest lokálisan sokkal magasabb koncentrációban van jelen, így a légúti gyulladás közvetlen jelzője. Ennek ellenére az IL-8 nem CF-specifikus marker, hiszen más légúti fertőzésekben (pl. bronchiectasia, COPD) is emelkedett lehet, így diagnosztikus specificitása korlátozott.⁷⁶ Az IL-1 β vonatkozásában is hasonló eredmények

születtek, amely a szérum CRP is erős összefüggést mutatott.⁷⁷ Az IL-6 a szisztémás és lokális gyulladás egyik kulcsfontosságú mediátora, amely köpetben szintén megemelkedik CF-ben, különösen akut exacerbáció alatt és a FEV1 %-kal fordított irányban korrelált.⁷⁸ Az IL-6 szintjének csökkenése a terápia hatékonyságának jele lehet, ugyanakkor az IL-8-hoz hasonlóan nem CF-specifikus, és koncentrációját számos nem gyulladásos tényező (pl. oxidatív stressz, sejthalál) is befolyásolhatja.⁷⁹

A neutrophil granulocyták aktivációja során a YKL-40 (chitinase-3-like protein) nevű fehérje is kóros mértékben termelődik, mely a CF-es köpetmintákban emelkedett szintet mutatott, és a légúti obstrukció súlyosságával korrelált.⁸⁰ A monocyták és neutrophilek által termelt Resistin fehérje a TLR4 receptorhoz kötődve fejti ki a hatását, így az NF- κ B út vonal egyik induktora. A CF-es köpetben nemrégiben emelkedett szintjét mérték, mely negatívan korrelált a légzésfunkcióval és szoros összefüggést mutatott a CF-hez társuló diabétesszel.⁸¹

A CF-es köpetben magas MPO-szintet mértek, amely a gyulladás súlyosságával és a tüdőfunkció csökkenésével korrelált. Az MPO-szint csökkenése antibiotikum vagy CFTR-modulátor terápia hatására a gyulladás mérséklődésének korai markereként viselkedhet.⁸² Azonban az MPO mennyiségét befolyásolhatja a neutrophilek aránya és az oxidatív környezet instabilitása, így standardizálása kihívást jelent.

A NE az egyik legszélesebb körben vizsgált biomarker CF-es köpetben. Több tanulmány kimutatta, hogy a köpet NE-aktivitása fordított korrelációt mutat a tüdőfunkcióval, és előre jelezheti a tüdőfunkció romlását, sőt a jövőbeni exacerbációk kockázatát is.⁸³ Ugyanakkor a NE szintjének meghatározását befolyásolhatja a minta feldolgozása és stabilitása, valamint a jelenlévő endogén proteázgátlók (pl. α 1-antitripszin), ami korlátozza az analitikai pontosságot. CF-ben a neutrophil granulocyták fokozott jelenléte miatt a különböző neutrophil eredetű proteázok nagy mennyiségben vannak jelen a légutakban, és felülmúlják az antiproteázok hatását. A proteáz/antiproteáz egyensúly felborulása a légutak abnormális öntisztulását, fokozott gyulladást és az immunválasz károsodását eredményezi.⁸⁴ Az epitheliális eredetű TLP (trypsin-like protease) aktivitás fordítottan arányos volt a FEV1 %-kal és azoknál mérték magasabb értékeket, akik 5 éven belül nem éltek túl a betegséget.⁸⁵ Az antiproteáz tulajdonsággal bíró ún. whey acidic protein four-disulfide-core (WFDC) fehérjék közül a köpetben az SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) szintet találtak a nem kezelt CF-es betegekben a kontrollhoz képest, ami emelkedést mutatott antibiotikum kezelés hatására.⁸⁶ Továbbá szintén a WFDC fehérjecsaládba tartozó Elafin, amely hasítja a NE-t, alacsonyabb

szintet mutatott *P. aeruginosa* fertőzött CF-es betegekben.⁸⁷ Ugyanakkor a HE4-et, amely szintén ennek a fehérjecsaldának a tagja, mások még nem vizsgálták korábban.

2.7.3. Biomarkerek a bronchoalveoláris mosófolyadékban

A bronchoalveoláris lavage (BAL) a légúti gyulladás és immunaktivitás legközvetlenebb vizsgálati módszere, mivel a mintavétel közvetlenül a disztális légutakból történik. A BAL folyadék alkalmas a gyulladásos sejtek, citokinek és proteázok kvantitatív mérésére, és magas érzékenységgel tükrözi a tüdőben zajló patofiziológiai folyamatokat. Ugyanakkor a BAL mintavétel egy invazív eljárás, amely szedációt vagy altatást igényel, ezért alkalmazása főként kutatási és speciális diagnosztikai célokra korlátozódik, elsősorban kisgyermek és súlyosabb CF-es betegek esetében.⁶¹ A BAL gyulladással és infekcióval asszociált biomarkereinek alkalmazhatósága így elsősorban a csecsemő- és kisgyermekkorban jellemző, amikor a légúti gyulladás még tünetmentes és normál légzésfunkció esetén is érzékenyen követi a légutak állapotában bekövetkező változást.⁸⁸ Azonban a BAL eredetű mediátorok hasznossága nem bizonyított a CF követésében⁸⁹, viszont alkalmasak lehetnek a CF-es és nem CF-es egyének elkülönítésére,^{53, 90} akár az eltérő fenotípussal rendelkező CF-es betegek megkülönböztetésére,^{91, 92, 93} valamint a terápia monitorozására.⁹⁰

A BAL minták citokin (pl. IL-8, IL-6 stb.) expresszióját a baktériumok és azok produktumai, illetve a pro-inflammatórikus citokinek által aktivált NF- κ B útvonal indukálja különböző sejttípusokban.⁹⁴ A IL-8 koncentráció szorosan korrelál a neutrophilek arányával és a bakteriális kolonizáció mértékével, különösen *P. aeruginosa* fertőzés esetén.⁷⁶ Az IL-8 azonban nem CF-specifikus marker, mivel szintje más krónikus légúti gyulladásokban (pl. bronchiectasia, COPD) is emelkedik, így inkább a gyulladás általános intenzitását, nem pedig a betegség-specifikus aktivitást tükrözi. A transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) CF-ben kulcsfontosságú immunmodulátor citokin, amely a krónikus gyulladás és a tüdő remodelling folyamatában játszik meghatározó szerepet. A TGF β 1 aktiválja a fibroblasztokat, fokozza a kollagén- és extracelluláris mátrix-fehérjék szintézisét, és gátolja az alveoláris epithélium regenerációját. BAL mintákban a TGF β 1 szintje jelentősen emelkedett CF-es betegekben, és pozitív korrelációt mutat a strukturális tüdőkárosodás mértékével.⁹⁵ A TGF β 1 nemcsak egy lokális gyulladásos marker, hanem potenciális prognosztikai faktor is CF-ben.⁹⁶ Ugyanakkor a fehérje nem CF-specifikus, emelkedése más fibrotizáló tüdőbetegségekből – például idiopátiás pulmonális fibrózisban vagy krónikus aszpirációs szindrómákban – is megfigyelhető. A mátrix metalloproteinázok (MMP-k) – különösen az MMP-8 és az MMP-9 – a CF-es tüdő gyulladásos

és szövetkárosító folyamataiban központi szerepet töltenek be. Ezek a cinkfüggő endopeptidázok felelősek az extracelluláris mátrix lebontásáért, ami hozzájárul a légúti falak destrukciójához és bronchiectasia kialakulásához. A BAL-ban mért MMP9-szint magas korrelációt mutat a neutrophilek arányával és a légúti proteáz-terheléssel, valamint előre jelzi a strukturális tüdőkárosodás progresszióját gyermekeknél.⁹⁷ Magas NE, MMP2 és MMP9 aktivitás szinteket mértek CF-es bronchiectasiában a nem-CF eredetű bronchiectasiás esetekhez képest.⁵³ A betegség korai stádiumában a citokinek felszabadulása és a celluláris folyamatok megváltozása a BAL-ban tehát érzékenyen jelzik a légúti gyulladásos folyamatok beindulását a még tünetmentes gyermekekben. A betegséggel diagnosztizált csecsemők nagy részében aktív pulmonális gyulladás következik be; az esetek 30%-ában emelkedett NE aktivitás mérhető, 20%-ban légúti infekció van jelen, míg 80%-ban CT vizsgálattal kimutathatóak a strukturális tüdőkárosodás jelei már 3 hónapos korban.⁹² Azt is fontos megjegyezni, hogy kora csecsemőkorban a CT vizsgálattal kimutatott bronchiectasia az esetek egy részében még reverzibilis. A BAL-ban 3 hónapos korban mért szabad NE aktivitás a perzisztáló bronchiectasia prediktív biomarkere.⁹⁸

Mivel a jelenleg ismert biomarkerek használhatósága limitált, vannak törekvések új biomarkerként használható proteinek BAL-ból történő azonosítására a CF-es tüdőbetegség követése céljából. CF-es gyermekek BAL mintáiban komplex tömegspektrometriás analízise során összesen 93 metabolitot találtak a neutrophilekhez köthető gyulladással összefüggésben, amelyek körül számos molekula prediktív értékkel bírt a strukturális károsodás szempontjából.⁹⁹

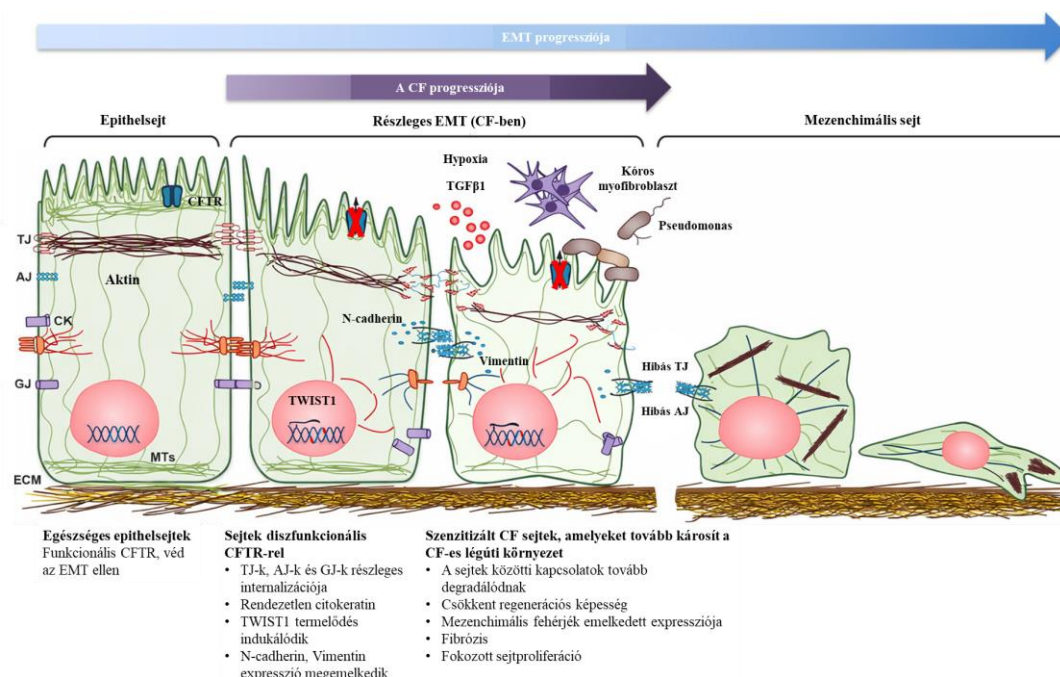
2.8. Az EMT folyamata cisztás fibrózisban

Az epitheliális–mezenchimális tranzíció (EMT) egy olyan transzkripciós újraprogramozási folyamat, amelynek során az epitheliális sejtek mezenchimális fenotípust és viselkedést vesznek fel, miközben elveszítik epitheliális jellegüket, ezáltal megbomlik az epithelium integritása.¹⁰⁰ Az EMT-t elősegítő fő transzkripciós faktorok (TF) közé tartoznak a SNAIL-, ZEB- és TWIST-család tagjai (pl.: TWIST1).¹⁰¹ A folyamat során különböző sejtközi kapcsolatok, így a tight junctionok (TJ), az adherens junctionok (AJ), a gap junctionok (GJ) és a dezmoszómák inaktiválódnak, miközben citoskeletális átrendeződés is végbe megy. Ennek következtében megszűnik az apikális–bazális polaritás, és megváltozik a sejtek morfológiája. Ezzel párhuzamosan aktiválódnak a mezenchimális fenotípusra jellemző gének, például a citoskeletális komponensekhez (vimentin, α SMA), a sejtkapcsolatokhoz (N-

cadherin) és az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéihez (kollagén I, fibronectin) kapcsolódó gének^{101, 102}. Jelenleg három különböző típusa írható le az EMT-nek. Az embrionális szakaszra jellemző EMT (I. típus) alapvető szerepet játszik a szöveti fejlődésben és az organogenezisben, viszont ez a folyamat lecsendesített állapotban van normál, egészséges szövetekben, amikor ez a szakasz lezárul.

Ugyanakkor az EMT bizonyos patológiás állapotokban is lejátszódik, például gyulladásos betegségekben (II. típus) vagy daganatokban (III. típus).^{101, 103} A daganatokkal összefüggésbe hozható EMT elősegíti a tumorprogressziót, hozzájárulva az invazív és metasztatikus fenotípus kialakulásához¹⁰³, míg a II. típusú EMT a szöveti remodelling és fibrózis egyik fő hajtóereje a gyulladásos betegségekben. Ez a folyamat számos krónikus tüdőbetegségben, köztük a krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD), az idiopátiás pulmonális fibrózisban (IPF), valamint a cisztás fibrózisban (CF) is kimutatható volt.¹⁰⁴ Fontos megjegyezni, hogy ezekben a betegségekben az EMT gyakran hibrid vagy részleges formában van jelen, ami azt jelenti, hogy a sejtek köztes epitheliális/mezenchimális állapotot mutatnak.^{105, 106, 107} Ennek megfelelően az EMT-t nem bináris folyamatként, hanem inkább egy dinamikus, mégis stabil állapotokat magában foglaló spektrumként kell értelmezni, ahol a sejtek jelentős plaszticitással rendelkeznek, és akár epitheliális és mezenchimális jellemzőket egyszerre is kifejezhetnek. Valójában az epitheliális sejtek, amelyekben aktiválódik az EMT-program, ritkán alakulnak át teljesen mezenchimális sejté, ehelyett különböző markerek kevert expresszióját mutatják.^{101, 108, 109} A TGFβ1 az EMT egyik legfontosabb szabályozó mediátora jelentősen megemelkedett CF-ben a normál tüdőszövethez képest, ami elősegíti a szöveti fibrózist a tüdőben, amely a fő halálok a betegségben.¹¹⁰ Ugyanakkor továbbra sem teljesen tisztázott, hogy az EMT aktivációját kizárólag a kóros CFTR-funkció váltja-e ki, vagy ebben másodlagos tényezők, például bakteriális fertőzés és krónikus gyulladás is szerepet játszanak.

^{111, 112}



5. ábra: A CF-es légutak epitheliális károsodásának progressziója. Egészséges légúti epithelsejtekben a funkcionális CFTR fehérje szerepet játszik az epitheliális–mezenchimális átmenet (EMT) elleni védelemben. CF-ben a diszfunkcionális CFTR jelenléte esetén különböző kiváltó ingerek (pl. TGFβ1) hatására fogékonyabbá válnak az EMT kialakulására. A sejtek elveszítik normális epitheliális jellegüket, miközben növekszik mind a mezenchimális markerek, mind az EMT-hez társuló transzkripciós faktorok szintje. (Quaresma és munkatársai 2006-os közleményéből adaptálva.)¹⁰²

A CF-ben kórosan működő CFTR ioncsatorna normál körülmények között szerepet játszik az epitheliális transzportfolyamatok szabályozásában, továbbá számos sejtfunkcióban is szerepet kapott, beleértve az epitheliális sejtek differenciálódását, polarizációját és proliferációját.¹⁰² A CFTR megfelelő működése hozzájárul a TJ szerkezeti és funkcionális integritásának fenntartásához, alapvető az epitheliális barrier tulajdonságok megőrzésében, és elősegíti a légúti epithelium hatékony regenerációját sérülést követően.¹¹³ Ezzel szemben cisztás fibrózisban a légúti regeneráció késleltetett, és az epitheliális differenciáció károsodott¹¹⁴, amit fokozott pro-inflammatórikus válasz és megváltozott MMP expresszió kísér – például megnövekedett IL-8 és MMP9 termelés.¹¹⁵ Emellett leírták a CF-es légúti epitheliális sejtek fokozott proliferációját, és epidemiológiai adatok arra utalnak, hogy a betegségben megnő a malignitások, különösen a gasztrointesztinális daganatok kockázata.¹¹⁶ Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a CFTR potenciálisan tumorsuppresszor szerepet tölthet be¹¹⁷, és felvetik annak lehetőségét, hogy a CFTR működés zavara összefüggésben állhat az EMT kialakulásával és az onkogenezis folyamataival.¹¹⁸

3. Célkitűzések

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

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

4. Anyagok és módszerek

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

4.1. A betegek kiválasztása és a tanulmányok felépítése

A két klinikai vizsgálatunkba bevont betegeket összesen 4 betegcsoportba soroltuk különböző szempontok alapján, így a csoportok jellemzőit először röviden külön-külön összegzem a könnyebb érthetőség kedvéért. Első klinikai vizsgálatunkba 68 Orkambi® kezelt (PROSPECT study-ból retrospektíven kiválogatva, 1. táblázat), második klinikai vizsgálatunkba pedig összesen 123 Orkambi® (n = 43, 3. kohorsz) és Kaftrio® (n = 51, 1. kohorsz; n = 29, 2. kohorsz) kezelt *p.Phe508del* mutációra homozigóta CF-es beteget válogattunk be plazma és szérum HE4 szintek összehasonlítása céljából (2. táblázat). A betegeket két külföldi (Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA; Department of Pulmonology, Charles University, Prága, Csehország) és négy hazai CF centrumból (Pécsi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Pécs; Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Budapest; Törökbálinti Tüdőgyógyintézet, Törökbálint; Szent-Györgyi Albert Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Szeged) válogattuk be. A CF diagnózisának felállítása az aktuális CF konszenzuson alapuló diagnosztikai kritériumok alapján történt.¹¹⁹ A beválogatott személyek mindegyike a betegség klasszikus formáját mutatta. A PROSPECT study-ból retrospektív módon 38 gyermek (18 év alatt) és 30 felnőtt CF-es beteg került beválogatásra. A Kaftrio®-kezelésben részesülő CF-es betegek az 1. kohorszban (n = 51) kizárólag felnőttek voltak, ahol a nemek megoszlása: 28 nő, valamint 23 férfi. A betegek életkorának mediánja 27 év volt (minimum: 20 év, maximum: 47 év). Ebben az alcsoportban két vizsgálati időpont szerepelt: a kezelés megkezdése előtti és a terápia elindítását követő 3. hónap, azonban a COVID-19 pandémia kitörése miatt további követési mintavételre nem volt lehetőség. A 2. kohorsz gyermek- és fiatal felnőttkorú betegekből (n = 29) állt. A nemek megoszlása alapján 17 nő és 12 férfi volt, a medián életkoruk 12 év volt (minimum: 6 év, maximum: 50 év). Ebben

a betegcsoportban a mintavételek a kezelés megkezdése előtt, valamint annak 1–2. és 3–6. hónapjában történtek, lehetővé téve a terápiás válasz időbeli nyomon követését. A két CFTR modulátor hatásának összehasonlítása céljából beválogatott (n = 43) életkor és nem szerint illesztett Orkambi® kezelt CF-es betegek (3. kohorsz) medián életkora 14 év volt (minimum: 11 év, maximum: 53 év). A vérmintavétel három időpontban történt, hasonlóan a Kaftrio®-val kezelt 2. kohorsz mintavételi protokolljához. A vérminták a fent említett időpontokban a járóbeteg kontrollvizsgálatok alkalmával kerültek összegyűjtésre, amikor általában enyhe vagy közép súlyos állapotban voltak a betegek.

Változók	Összes CF-es (n=68)	CF-es gyermek (n=38)	CF-es felnőtt (n=30)
Életkor (év) (medián, min-max)	16 (6-29)	13 (6-17)	24 (18-29)
Nem (nő/férfi), n	39/29	23/15	16/14
Kiindulási verejtékklorid (mmol/L) (medián, min-max)	100,8 (64-116)	102,0 (76,5-114,0)	100,0 (64,0-116,0)
Kiindulási ppFEV1 (%) (medián, min-max)	80,8 (27,6-94,7)	86,5 (34,7-94,7)	84,7 (27,6-92,8)
Kezelés előtti BMI (kg/m ²) (medián, min-max)	20,1 (14,1-28,5)	18,5 (14,1-26,6)	21,2 (16,2-28,5)
ppFEV1 változása 6 hónapnál (%) (átlag, 95% CI)	2,6 (0,6-4,5)	3,7 (0,9-6,5)	1,1 (-1,6-3,7)
Tüdőfunkció javulás 6 hónapnál (ppFEV1 ≥ 2,6% átlagos emelkedés) (igen/nem), n	34/34	20/18	14/16
Reszponder/nem rezponder (ppFEV1 ≥ 5% változás alapján 6 hónapnál) (igen/nem), n	26/42	15/23	11/19
<i>P. aeruginosa</i> pozitivitás (igen/nem), n	32/36	13/25	19/11

1. táblázat: Első klinikai vizsgálatunkba bevont Orkambi® kezelt CF-es populáció legfontosabb demográfiai és laboratóriumi paraméterei. A PROSPECT tanulmányból 68 CF-es beteg került bevonásra¹²⁰ amelyekből plazma HE4 meghatározás történt a tüdőfunkció javulásának monitorozására. Az egyes paraméterek megoszlását feltüntettük külön a CF-es gyermekekre (n = 38) és felnőttekre (n = 30) is. A tüdőfunkció javulását a kezelés hatására a ppFEV1 % ≥ 2,6%-os átlagos emelkedésében határoztuk meg. Reszponder: az Orkambi® kezelésre jól reagáló (ppFEV1 % ≥ 5% változás alapján 6 hónap után); nem rezponder: az Orkambi® kezelésre nem vagy kevésbé reagáló (ppFEV1 % < 5% változás alapján 6 hónap után).

Változók	1. CF-es kohorsz Kaftrio® (n=51)	2. CF-es kohorsz Kaftrio® (n=29)	3. CF-es kohorsz Orkambi® (n=43)
Életkor (év) (medián, min-max)	27 (20-47)	12 (6-50)	14 (11-53)
Nem (nő/férfi), n	28/23	17/12	23/20
Kiindulási verejtékklorid (mmol/L) (medián, min-max)	103 (61-119)	112 (66-149)	128 (61-166)
Kiindulási ppFEV1 (%) (medián, min-max)	73 (24-107)	89 (40-147)	70 (23-120)
Kezelés előtti BMI (kg/m ²) (medián, min-max)	21,9 (17,0-34,4)	16,3 (13,2-25,3)	17,9 (13,2-27,9)
ppFEV1 változása 3* vagy 6 hónapnál (%) (átlag, 95% CI)	17,5 (14,5-20,5)*	4,0 (-3,9-12,1)	1,6 (-1,6-4,7)
Kiindulási szérumsz C-reaktív protein (mg/L) (medián, min-max)	4,5 (0,5-43,4)	2,4 (0,2-96,4)	2,3 (0,1-57,4)
Kiindulási szérumsz kreatinin (μmol/L) (medián, min-max)	-	71 (32-96)	68 (32-107)
Bakteriális kolonizáció (igen/nem), n	-	7/22	10/33
Reszponder/nem rezponder a ppFEV1 ≥ 5% változás alapján 3* vagy 6 hónapnál, n	46/5*	19/10	22/21

2. táblázat: Második klinikai vizsgálatunkba bevont Kaftrio® és Orkambi® kezelt CF-es populációk legfontosabb demográfiai és laboratóriumi paraméterei. Összesen 5 (hazai és külföldi) centrumból beválogatott CF-es beteg (n = 123) szérumsz HE4 koncentráció meghatározása történt a tüdőfunkció javulásának követése érdekében. A tüdőfunkció javulását a kezelés hatására a ppFEV1 % ≥ 5%-os átlagos emelkedésében határoztuk meg. Reszponder: a Kaftrio®/Orkambi® kezelésre jól reagáló (ppFEV1 ≥ 5% változás alapján 6 hónap után); nem rezponder: a Kaftrio®/Orkambi® kezelésre nem, vagy csak kis mértékben reagáló (ppFEV1 % < 5% változás alapján 6 hónap után). *kezelés időtartama 6 hónap helyett csak 3 hónap volt.

A ppFEV1 értékek alapján történt alcsoportok kialakítása Sagel és munkatársainak közleménye alapján¹²¹ kerültek meghatározásra, és ennek megfelelően az első vizsgálatba (Orkambi®, n = 68) bevont CF-es betegeket három alcsoportba soroltuk: <50% ppFEV1 (n = 9), 50–89% ppFEV1 (n = 45), ≥ 90% ppFEV1 (n = 14). Mindkét klinikai vizsgálat résztvevői a terápiás válasz alapján két alcsoportba kerültek: „reszponder” azokat a betegeket, akiknél a ppFEV1 értéke legalább 2,6%-kal (első klinikai vizsgálat, 1. táblázat) vagy 5%-kal (második klinikai vizsgálat, 2. táblázat) emelkedett a 6 hónapos (Orkambi®, Kaftrio® 2. kohorsz) vagy 3

hónapos (Kaftrio® 1. kohorsz) követési időszak során. Ezzel szemben a „nem reszponder” csoportba azok a betegek kerültek, akiknél a ppFEV1 növekedése 2,6% vagy 5% alatti volt. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgálati időszak alatt egyik cisztás fibrózisos beteg sem tapasztalt akut pulmonális exacerbációt.

A légzésfunkció vizsgálatot spirometriás módszerrel, a ppFEV1 érték alapján, a jelenlegi irányelveknek megfelelően végezték.¹²² A verejtékklorid-koncentráció analízisét verejték vezetőképesség méréssel (sweat conductivity test) végezték a vizsgálati látogatások alkalmával. Fontos megjegyezni, hogy ezek a funkcionális mérések azokon a napokon történtek, amikor a vérmintavétel is.

Egy amerikai centrumból (Division of Respiratory, Critical Care and Occupational Pulmonary Medicine, Department of Internal Medicine, Salt Lake City, UT, USA) 72 CF-es betegről (3. táblázat) származó köpetmintákban szintén lemértük a HE4 szintjét és rendelkezésre álltak különböző klinikai paraméterek is. Megvizsgáltuk, hogy köpet HE4 koncentráció korrelál-e a pulmonális exacerbáció súlyosságával, illetve vajon mutat-e összefüggést olyan klasszikus köpetben mért gyulladásos paraméterekkel, mint a NE, IL1- β , MPO és MMP9.

Változók	Eredmények
Életkor (év), medián (min-max)	24,7 (13,2 - 47,5)
Nem (nő/férfi)	34 / 38
BMI (kg/m ²), medián (min-max)	21,1 (15,7 - 30,8)
Vizsgálatkori ppFEV1 (%), medián (min-max)	60,3 (11,8 - 105,3)
<i>P. aeruginosa</i> kolonizáció (igen / nem)	26 / 33 (13 nem ismert)
Pulmonális exacerbációk száma a mintavétel után, n	0 (33), 1 (22), 2 (12), 3-4 (5)
Pulmonális exacerbációk súlyossága, n	enyhe (22), közepes (8), súlyos (39), bizonytalan (3)
Gyógyszerelés:	
Corticosteroidok (orális / inhalációs), n	4 / 46
CFTR-modulátor (IVA /LUM-IVA), n	1 / 21
Azithromycin, n	37
Tobramycin, n	17

3. táblázat: Egy éven belül exacerbációt mutató 72 CF-es beteg főbb demográfiai és laboratóriumi paraméterei, akiknél köpet HE4 koncentráció meghatározás történt. A vizsgált CF-es betegek egy része *ivacaftor* (n = 1), illetve *ivacaftor/lumacaftor* (n = 21) kezelést kapott.

Összegyűjtöttünk továbbá 13 CF-es beteg BAL mintáját (4. táblázat) annak érdekében, hogy analizáljuk azok HE4 koncentrációját, illetve *in vitro* megvizsgáljuk a CF-es légutakra jellemző megváltozott körülmények komplex hatását a bronchiális epithelsejtekre. A BAL mintákból készítettünk egy mintapoolt, majd a sejtekhez adtuk 20%-os arányban és 48 órán keresztül inkubáltuk. A kezelést követően a sejtekből totál RNS-t izoláltunk, majd az EMT markerek expressziós változásának vizsgálata céljából RT-qPCR analízist végeztük.

Változók	Érték
Életkor (év), medián (min-max)	10 (1-18)
Nem (nő/férfi)	10/3
BMI (kg/m ²), medián (min-max)	16 (14,8-19,8)
Vizsgálatkori ppFEV1 (%), medián (min-max)	99,3 (55-110)
HE4 (pmol/L), medián (min-max.)	4913 (534,3-13207,4)
Verejtékklorid (mmol/L), medián (min-max)	103 (90-117)
Neutrophil elasztáz (NE; ng/mL), medián (min-max)	330 (40-540)
IL-8 (pg/mL), medián (min-max)	210 (40-800)
Pulmonális exacerbáció a mintavétel után (igen/nem)	5 / 4 (4 nem ismert)
<i>S. aureus</i> /A. <i>xylosoxidans</i> /több kórokozó/nincs kolonizáció	8 / 1/ 2 / 2

4. táblázat: A 13 CF-es beteg főbb demográfiai és laboratóriumi paraméterei, akik esetében rendelkezésünkre álltak a betegek BAL mintái. HE4 koncentráció meghatározást végeztünk a BAL mintákból, illetve *in vitro* ezen mintákból készített mintapoolt felhasználva kezeltük a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejteket.

4.2. Plazma, szérum, köpet- és BAL minták HE4 koncentráció mérése

A vérmintákat vénás punkcióval nyerték, centrifugálták plazmára és szérumra, ezt követően –70 °C-on tárolták, majd szárazjégen futárszolgálattal szállították a Debreceni Egyetemre további feldolgozás céljából. A köpet és BAL minták tárolása és szállítása is ugyanígy történt. A betegek plazma, szérum, köpet-, illetve BAL mintáiban, továbbá a CFBE sejtek felülszójában a HE4 koncentrációkat kemilumineszcens mikropartikuláris immunoassay módszerrel mértük meg Architect® i2000SR, illetve i1000SR automatákon (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Németország).

A CFBE sejtek felülszóját a kezelési idő eltelte után leszívtuk, majd szobahőmérsékleten centrifugáltuk 10000 g-n 1 percig annak érdekében, hogy

megszabaduljunk az esetleges sejtektől, sejtörmelékektől, amelyek akadályozhatják a mérést. Ugyanígy jártunk el a plazma, szérum, köpet és BAL minták esetén is kiolvasztás után.

4.3. Sejtkultúrák és kezelési körülményeik

A CF-es légutakra jellemző sejt körülményeket biztosító *p.Phe508del*-CFTR mutációt, illetve a vad típusú CFTR-t (wt-CFTR) expresszáló CFBE 410⁺ sejtek Dr. J. P. Clancy laboratóriumából származnak (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA). A sejtek tenyésztéséhez Earl's BSS-t (EBSS) és 1% L-glutamint tartalmazó Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (Lonza Inc., Morristown, NJ, USA) médiumot használtunk, 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) és 5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) hozzáadásával. A sejteket 37°C fokon, 5% CO₂ koncentráció mellett inkubáltuk.

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

A CFTR-csatorna aktivitást FSK (10 µM) és IBMX (100 µM) kombinációjával (FSK/IBMX) fokoztuk mindkét sejtvonal esetén (a CFTR modulátorral kezelt vagy nem kezelt sejteknél is), míg a CFTR gátlás céljából CFTR_{inh172}-t (20 µM) adtunk a wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekhez. A kontroll mintákhoz ebben az esetben is DMSO-t adtunk. A CFTR modulátorok általunk alkalmazott kísérleti körülményei összhangban vannak a korábbi *in vitro* tanulmányokban alkalmazott módszerekkel.^{123, 124, 125}

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

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

4.4. Sejtkultúrák kezeléséhez alkalmazott reagensek

A CFTR korrektorként alkalmazott *lumacaftort* (VX-809, LUM) (S1565) és *tezacaftort* (VX-661, TEZ) (S7059), *ellexacaftort* (VX-445, ELX) (S8851), a CFTR potenciátor hatású *ivacaftort* (VS-770, IVA) (S1144), a CFTR gátlására használt feszültség-independens CFTR inhibitor CFTR_{inh172}-t (S7139), a CFTR aktivátor *forskolint* (FSK, S2449) a Selleck Chemicals cégtől (Houston, TX, USA) rendeltük. A cAMP foszfodiészteráz gátló IBMX-t (3-isobuthyl-1-methylxanthine, I5879) a Merck Group - tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A TGFβ1 (PHG9214, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) kivételével a reagensek mindegyikének a dimethyl-sulfoxide (DMSO, Merck Group) volt az oldószere (a TGFβ1 oldószere: 40 mM ecetsav és 0,1 % BSA kombinációja). A HE4 (WFDC2) specifikus siRNS-t (WFDC2 siRNS, ID: 4392420, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és a kontrollként alkalmazott NEG01 siRNS-t (Silencer Select Negative Control No.1, ID: 4390846, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pedig a Thermo Fischer Scientific-től szereztük be.

4.5. Sejt-életképesség vizsgálat MTT assay-vel

A sejtek életképességének vizsgálatára MTT alapú assay-t végeztünk TGFβ1 kezelést követően. A sárga színű MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) festéket az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimjei redukálják és formazán kristályokká alakítják, mely dimetil-szulfoxidban (DMSO, Sigma-Aldrich) feloldva élénk lila színt ad. Az elhalt sejtek nem rendelkeznek aktív mitokondriummal, így nem képesek ezt az átalakítást elvégezni, és nem színeződnek el. A CFBE sejteket (25 000 sejt/well) PLL-lel előkezelt 24-well plate-ben (SPL Life Sciences, Naechon-Myeon, Korea) növesztettük, majd 0-120 órán keresztül TGFβ1-nek tettük ki. A kezelést követően a felülúszót eltávolítottuk és minden wellbe 300 µL HBSS-ben (Sigma-Aldrich) feloldott MTT oldatot adtunk. Három órás inkubáció után (37 °C, 5% CO₂, párásított légkörben) az MTT oldatot eltávolítottuk, majd a lila formazán kristályokat 300 µL DMSO-ban oldottuk fel. A szín detektálását spektrofotométerrel végeztük (550 nm) és a kapott optikai denzitásból (OD) számoltuk a százalékos értékeket a nem

kezelt sejtek OD értékeinek átlagát véve 100%-nak. Pozitív kontrollként H_2O_2 -vel (50 μM), negatív kontrollként pedig TNF- α -val (100 ng/mL) kezeltük a sejteket 48 órán keresztül.

4.6. A CFTR-csatornán keresztül folyó kloridáram vizsgálata patch clamp módszerrel

A CFBE sejtekben a kloridáramot ún. „egész sejt” patch-clamp technikával analizáltuk, hasonlóan korábban publikált vizsgálatokhoz^{126, 127}. Az alkalmazott extracelluláris oldat összetétele a következő volt: 145 mM NaCl, 4 mM CsCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glucose és 10 mM HEPES (pH 7,4 315 mOsm NaOH-dal titrálva). Az intracelluláris pipetta oldat a következőket tartalmazta: 113 mM L-aszparaginsav, 113 mM CsOH, 27 mM CsCl, 1 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM etilén-glikol-tetraacetátsav (EGTA), 10 mM HEPES és 3 mM Mg-ATP (pH 7,2 285 mOsm CsOH-dal titrálva). Minden órában friss Mg-ATP oldat került hozzáadásra az intracelluláris oldathoz. Az intracelluláris oldatot jégen tároltuk felhasználás előtt. A FSK/IBMX-et és a CFTR_{inh172}-t közvetlenül a mérés előtt adagoltuk az extracelluláris oldathoz. Az elektrofiziológiai mérésekhez használt mikropipetták boroszilikát üvegapillárisokból (GC150-TF10, Harvard Apparatus Co., Holliston, MA, USA) kerültek felhúzásra 4 fázisban egy Flaming Brown típusú automata pipetta húzóval (Sutter Instruments, San Rafael, CA, USA). A pipetták hegyátmérője 0,5 - 1 μm volt, ellenállásuk pedig az alkalmazott oldatok esetén 3-10 M Ω . A mérésekhez Axopatch 200B patch-clamp erősítőt (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) használtunk feszültség-zár üzemmódban, ezáltal a vizsgált sejt membránpotenciálja konstans értéken tartható, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagysága meghatározható. A mérések során Burleigh PCS5000 (Thorlabs Inc., Newton, New Jersey, USA) mikromanipulátort használtunk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1440 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) illesztőegységen keresztül a pCLAMP10 programcsomag (Molecular Devices Inc.) segítségével. Az áramgörbéket 3 pólusú Boxcar szűrővel szűrtük. A rögzített áram -40 mV-ra volt állítva, és kétféle feszültség-clamp protokollt alkalmaztunk a CFTR ionáram mérésére. Elsőként 5 másodpercig tartó, -40 mV-ról 0 mV-ra változó egyszeri depolarizációt alkalmaztunk 4-5 percen keresztül az ionáram monitorizálására, és annak igazolására, hogy számottevő elfolyó ionárammal nem kell számolnunk. Az áram-feszültség (I-V) kapcsolat követésére a sejteket -40 mV-os rögzített feszültségen tartottuk és -80 mV-tól +80 mV-ig terjedő feszültség tartományban depolarizáltuk különböző potenciálokkal, 10 másodpercenként történő 20 mV-os lépésekben. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten végeztük. A vizsgálatok kivitelezésében Dr. Szántó G.

Tibor, Dr. Arnódi-Mészáros Beáta és Prof. Panyi György (Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) nyújtottak segítséget.

4.7. Totál RNS izolálás

Az CFBE sejt kultúrákból, valamint pulmonális mezenchimális őssejtekből (MSC) és CF-ből származó tüdő eredetű fibroblasztokból (DHLF-CF) kinyerhető össz RNS-t TRI reagens segítségével (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) izoláltuk a gyártó ajánlása szerint. A kezelést követően a sejtekről eltávolítjuk a felülszót (ezeket a fent említett módon eltettük további felhasználásra), majd Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) oldattal történő mosást követően 1 mL TRI reagensben erős szuszpendálást követően feloldjuk és - 20 °C-on (hosszú távon - 80 °C-on) tároljuk felhasználásig. Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ellenőrizzük. Az RNS-mintákat -80°C-on tároltuk további analízis előtt.

4.8. A HE4 expresszió gátlása siRNS transzfekcióval CFBE sejtekben

A *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejteket 24 órával a transzfekció előtt (25 000 sejt/well) plateltük 24-well plate-re. A mutáns CFBE sejtekben a HE4 (WFDC2) expresszióját egy specifikus siRNS segítségével csökkentettük (20 pmol, ID: 4392420, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a gyártó utasításai szerint, 48 órás inkubációs idővel. Kontrollmintaként negatív kontroll siRNS-t (NEG01 siRNA) alkalmaztunk (Silencer Select Negative Control No.1, 20 pmol, ID: 4390846, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), illetve a sejtekbe történő bejutáshoz szükséges lipofectaminnal (13778100; Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) előzetesen 5 percig inkubáltuk az siRNS-eket. A transzfekció hatékonyságát a HE4 expresszió fehérjeszintű (immunfluoreszcens mikroszkópiával, IF) és mRNS-szintű (RT-qPCR) kimutatásával ellenőriztük.

4.9. Valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) analízisek

Az izolált RNS mintákból az RT-qPCR-hoz szükséges komplementer DNS szintézist High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia)

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

Messenger RNS	Forward primer RT-qPCR-hoz	Reverse primer RT-qPCR-hoz
HE4	5' - ATAGCACCATGCCTGCTTGT - 3'	5' - TGCTCCTGTGCCTGAGACTA - 3'
E-cadherin	5' - TTTCCACCAAAGTCACGCTG - 3'	5' - CCAGGAGAGGAGTTGGGAAA - 3'
N-cadherin	5' - GGACAGTTCCTGAGGGATCA - 3'	5' - GGATTGCCTTCCATGTCTGT - 3'
MMP9	5' - GAACCAATCTCACCGACAGG - 3'	5' - GCCACCCGAGTGTAACCATA - 3'
IL1β	5' - AGCCAGGACAGTCAGCTCTC - 3'	5' - AGAGGCCTGGCTCAACAA - 3'
Vimentin	5' - AGTCCACTGAGTACCGGAGAC - 3'	5' - CATTTACGCATCTGGCGTTC - 3'
GAPDH	5' - AGCCACATCGCTCAGACAC - 3'	5' - GCCCAATACGACCAAATCC - 3'
TWIST1	5' - GTCCGCAGTCTTACGAGGAG - 3'	5' - GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT - 3'
RPLP0 (36B4)	5' - ATGCAGCAGATCCGCATGT - 3'	5' - TCATGGTGTTCTTGCCCATCA - 3'

5. táblázat: A RT-qPCR mérések során alkalmazott forward és reverse primerek szekvenciája.

4.10. Az MMP9 és N-cadherin fehérjék detektálása ELISA módszerrel

A sejtfelülúszó mintákban az MMP9 fehérje (DMP900; Human MMP-9 ELISA Kit – Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), illetve az N-cadherin fehérje (EH0050;

Human CDH2 (Neural Cadherin) ELISA kit, Finetest, Wuhan, Hubei, China) koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg azért, hogy megerősítsük a HE4 expresszió megváltozásának közvetlen hatását az MMP9-termelésre, valamint az EMT folyamatának az elindulását/fokozódását különböző *in vitro* végzett kezelések hatására.

4.11. Immunfluoreszcens (IF) mikroszkópos vizsgálatok

Az EMT-re jellemző fenotípus kimutatását CFBE sejt kultúrákban immunfluoreszcens festéssel (IF) végeztük az EMT specifikus markerek (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin) fehérje szintű vizsgálatának céljából. Ehhez a vad típusú (wt-CFTR) és a *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejteket speciálisan erre a célra gyártott 8-well chamber-ben (amely egyben tárgylemezként is funkcionál a mikroszkópos vizsgálat során a festést követően) tenyésztettük ($2,5 \times 10^4$ sejt/well), majd kezeltük két napon keresztül.

Az EMT-re jellemző markerek pozitivitását a sejtmembránban mindkét sejtvonal esetében először a genotípus alapján figyeltük meg. Az EMT folyamatát ezt követően *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben TGF β 1 (15 ng/mL) hozzáadásával 48 órán keresztül indukáltuk, míg a kontrollminták csak a kezelőanyag oldószerét kapták.

A CFTR-modulátor kezelés EMT-re gyakorolt hatásának vizsgálatokor a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket *elixacaftorral* (3 μ M), *tezacaftorral* (5 μ M) és *ivacaftorral* (10 μ M), illetve kontrollként DMSO-val inkubáltuk 24 órán át. A sejteket ezt követően jéghideg metanol-aceton (50 v/v%) oldattal fixáltuk 10 percig. A nem specifikus antitestkötődési helyeket FBS-sel (Merck Group) blokkoltuk 15 percig.

Az EMT markerek primer jelöléséhez az alábbi antitesteket alkalmaztuk 1 órással inkubálással: monoklonális egér anti-humán E-cadherin (610181) és N-cadherin (610920) (250 μ g/mL, BD Biosciences), poliklonális nyúl anti-HE4 (AB273130) és anti-MMP9 (AB73734) (100 μ g/mL, Abcam). A szekunder jelölést FITC-cel konjugált kecske anti-egér (A11029) és anti-nyúl (A11034), illetve rhodaminnal konjugált kecske anti-egér IgG (2 mg/mL, hígítás: 1:400, Thermo Fisher Scientific Inc.) antitestekkel végeztük 1 órán keresztül. A Ki67-fehérje festését (AB15580, 100 μ g/mL, Abcam) azon sejtek azonosítására használtuk, amelyek aktívan osztódtak, és a sejtciklus növekedési fázisában voltak, HE4-expresszióval rendelkező és siRNA transzfektált sejtek esetében is. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI, 283 nM) festettük meg, és a mintákat Zeiss Axio Scope.A1 fluoreszcens mikroszkóppal (HBO 100 lámpa; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk. A mikroszkópos

beállítások a következők voltak: DAPI: gerjesztés G 365 nm, emisszió BP 445/50 nm, fluoreszcein (FITC): gerjesztés BP 470/40 nm, emisszió BP 525/50 nm, rhodamin: gerjesztés BP 546/12 nm, emisszió BP 575–640 nm. A képeket ZEN 2012 v.1.1.0.0 szoftverrel (Carl Zeiss Microimaging GmbH) elemeztük, és minden marker esetében átlagos fluoreszcenciaintenzitást (MFI) számítottunk a pozitivitás mértékének kvantifikálására. Az immunfestés specificitását szekunder antitesttel történő inkubálással ellenőriztük, és háttérfestődést nem tapasztaltunk. A vizsgálatok kivitelezésében Dr. Fenyvesi Ferenc és Dr. Rusznyák Ágnes (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék) nyújtottak segítséget.

4.12. Etikai engedélyek

A kutatást a Debreceni Egyetem Regionális Etikai Bizottsága (engedélyszám: 4813–2017) és a Magyar Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) (engedélyszám: IV/10417–3/2020/EKU, engedély kelte: 2020. december 29.) hagyta jóvá a World Medical Association Helsinki Nyilatkozatának – az emberi alanyokat érintő orvosi kutatások etikai elveinek – megfelelően. A biobank alkalmazását a Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics (CFFT) felülvizsgálta és elfogadta, amely teljesen anonimizált cisztás fibrózisos mintákat biztosított a kutatás számára. A kutatáshoz anonimizált cisztás fibrózisos mintákat a magyarországi CF-centrumok biztosították.

4.13. Statisztikai elemzés

Az adatokat átlag $\pm$ 95%-os konfidencia intervallumban (95% CI) illetve ahol jeleztük, mediánként (1. és 3. kvartilis, IQR), vagy mediánként (min-max) formában adtuk meg. Az adatok normalitásának vizsgálatára a Shapiro–Wilk és Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. A normál eloszlású adatok két csoport közötti összehasonlítását párosított t-próbával végeztük, míg a nem normál eloszlású klinikai és laboratóriumi változók esetében a Mann–Whitney U-próbát használtuk két csoport adatainak összehasonlítására. Amikor a kiindulási (baseline) és az utánkövetés (follow-up) minták eredményeit hasonlítottuk össze, a Wilcoxon-féle párosított tesztet alkalmaztuk. Több csoport összevetésekor a parametrikus ANOVA vagy a nem parametrikus Friedman tesztet alkalmaztuk, Dunn-féle *post-hoc* analízissel. A Spearman-féle rangkorrelációs együtthatót (r) használtuk a plazma HE4 és a ppFEV₁, valamint a verejtékklorid koncentráció és a BMI abszolút vagy delta értékei közötti összefüggések vizsgálatára. A többszörös logisztikus regressziós elemzést annak értékelésére

alkalmaztuk, hogy mely kovariánsok befolyásolják leginkább a „responder” státusz valószínűségét a LUM/IVA kezelés megkezdését követő 6. hónapban. A vizsgált kovariánsok a következők voltak: delta HE4, életkor, nem, kiindulási ppFEV1, verejtékklorid-koncentráció, BMI, valamint *P. aeruginosa* pozitivitás. A ROC-görbe (receiver operating characteristic) alatti terület AUC (area under the curve) értékét mind az abszolút, mind a delta HE4 esetében meghatároztuk annak vizsgálatára, hogy a tüdőfunkció javulása kimutatható-e ezekkel a paraméterekkel Kaftrio® vagy Orkambi® kezelés mellett a 3. vagy 6. hónapban (az alcsoporthoz függően). A ppFEV1 átlagos változásának 2,6%-át (LUM/IVA) és 5%-át (Kaftrio® vagy Orkambi®) határoztuk meg a bináris változó határértékeként. A delta HE4 esetében az AUC értéket külön is elemeztük, amikor a 5%-os delta ppFEV1-t választottuk határértéknek, mivel ez a mértékű tüdőfunkció javulás várható egy a kezelésre jól reagáló („responder”) betegtől.¹²¹ A cut-off vagy küszöb értéket a Youden-index maximuma alapján határoztuk meg (szenszitivitás, specificitás, PPV, NPV). A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatfeldolgozást és statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) és az SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) szoftverekkel végeztük.

5. Eredmények

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

Az irodalmi adatok alapján munkacsoportunk elsőként kezdte el konzekvensen vizsgálni a HE4 fehérje plazma/szérum koncentrációját a CF-es betegek laboratóriumi vizsgálata érdekében nem tumormarkerként, mint ahogyan korábban alkalmazták malignus kórképekben,^{128, 129} hanem mint egy új típusú gyulladásos paraméter.^{28, 68} Kíváncsiak voltunk arra is, hogy vajon a plazma HE4, mint új potenciális biomarker alkalmas lehet-e az Orkambi® kezelés hatékonyságának a monitorozására CF-es betegekben. Vizsgálataink elején még csak az Orkambi® volt elérhető, mint CFTR modulátor, majd idő közben vált elérhetővé a Kaftrio® is. Így elsőként az Orkambi® kezelésben részesült betegekre vonatkozó eredményeket szeretném részletesen bemutatni.

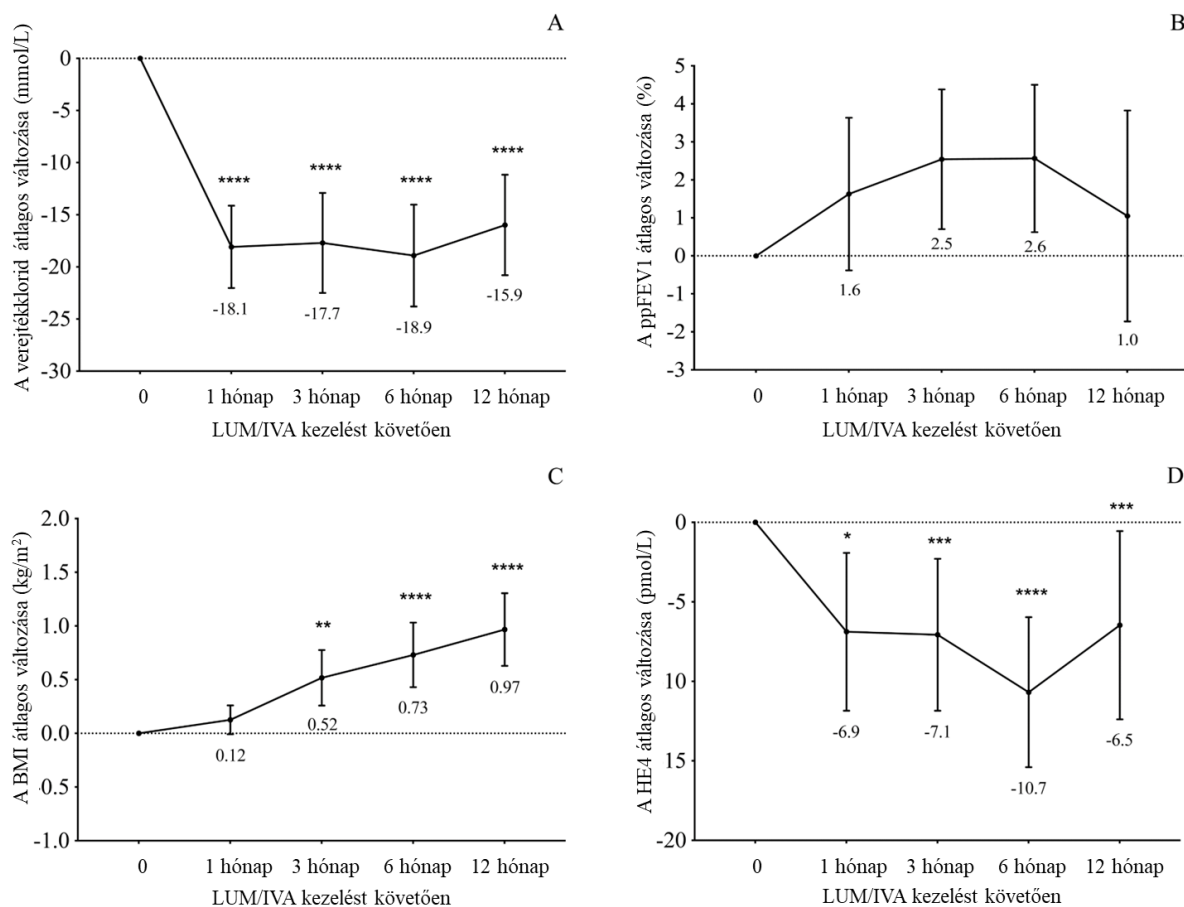
5.1.1. Különböző klinikai paraméterek és a plazma HE4 szint változásai LUM/IVA (Orkambi®) kezelés hatására

A verejtékklorid koncentráció átlagosan $-18,1$ mmol/L-rel csökkent (95% CI: $-22,3 - -15,0$) a LUM/IVA kezelés megkezdését követő 1 hónapon belül, és ez a csökkent érték a 6. hónapban is fennállt (átlagos változás: $-18,9$ mmol/L; 95% CI: $-24,5 - -14,8$) a kezelés előtti adatokhoz képest (6/A. ábra). A ppFEV1 érték tekintetében mérsékelt, statisztikailag nem szignifikáns változás volt megfigyelhető az 1–6 hónapos követési időszak alatt: az 1 hónapos átlagos változás 1,6% (95% CI: $-0,4 - -3,6$), míg a 6 hónapos 2,6% (95% CI: $0,6 - 4,5$) volt ebben az alcsoportban (6/B. ábra), ellentétben a teljes vizsgálati populációban korábban kimutatott eredményekkel.¹²¹ A tápláltsági állapot ugyanakkor jelentősen javult, amit a testtömegindex (BMI) folyamatos emelkedése is jelzett a vizsgálat során, $0,73$ kg/m² átlagos növekedéssel (95% CI: $0,42 - 0,98$) a 6. hónap végére (6/C. ábra).

A plazma HE4 koncentráció a LUM/IVA kezelés megkezdése előtt hasonló volt más, IVA kezelés előtti CF-es esetekhez — medián (IQR): $68,5$ ($56,6-87,3$) pmol/L, míg egy korábbi vizsgálatunkban $63,1$ ($47,9-97,5$) pmol/L értéket mértünk⁶⁹ (7/A. ábra).

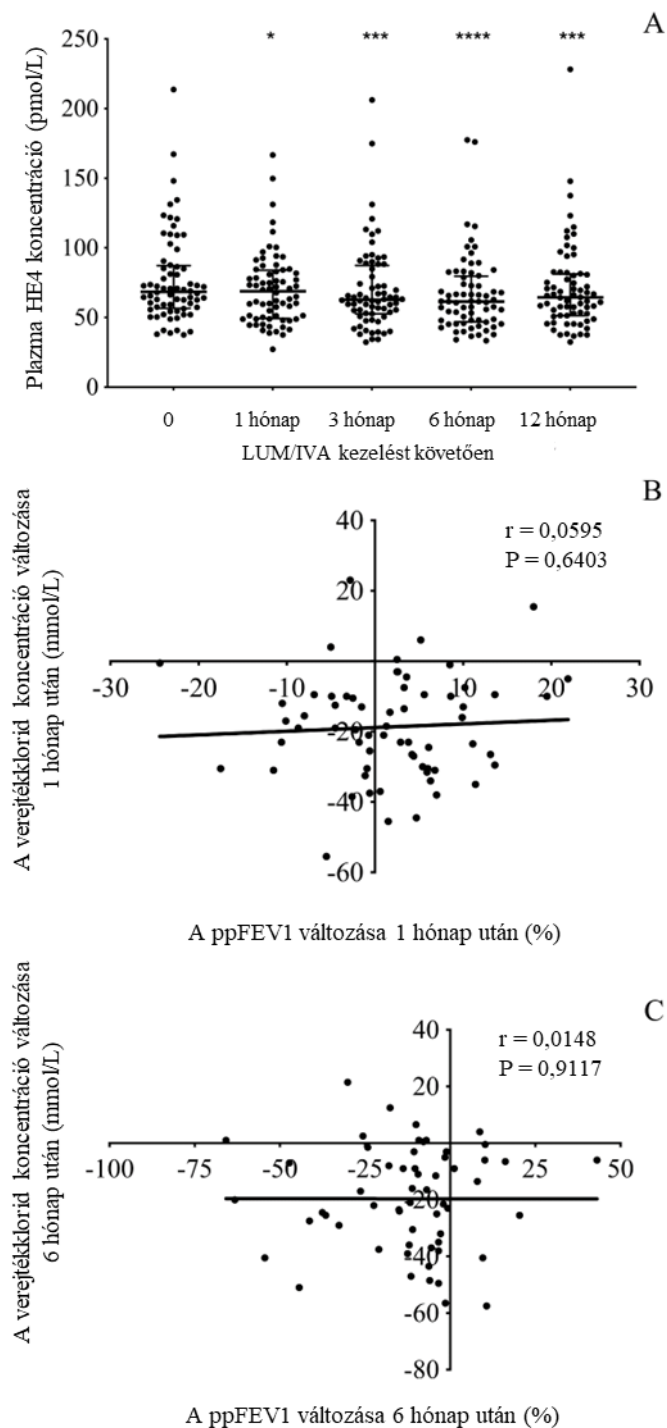
A plazma HE4 szint a kezelés megkezdését követően minden vizsgált időpontban csökkent, a legnagyobb változás (delta érték) a 6. hónapban volt megfigyelhető: $-10,7$ pmol/L (95% CI: $-15,4 - -5,9$) a kezelés előtti szinthez képest (6/D. ábra). Érdekes módon a HE4 átlagos változása a 12. hónapra kisebb mértékű volt ($-6,5$ pmol/L, 95% CI: $-12,4 - -0,5$), ami

mérsékeltőbb légzésfunkció-javulással járt együtt (delta ppFEV1: 1,0%, 95% CI: -1,7 – 3,8) a vizsgálati időszak végére.



6. ábra: A LUM/IVA kezelés hatására bekövetkező változások különböző klinikai paraméterekben a 12 hónapos követési idő alatt. Az átlagos változás (95%-os CI) a verejtékklorid koncentrációban (A), a ppFEV1-ben (B), a BMI-ben (C), valamint a plazma HE4 koncentrációban (D) CF- és betegekben (n = 68) LUM/IVA terápia megkezdése előtt, illetve 1, 3, 6 és 12 hónappal azt követően. A statisztikai elemzéseket Friedman-próbával, Dunn-féle *post hoc* teszttel végeztük. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 a kiindulási értékhez viszonyítva.

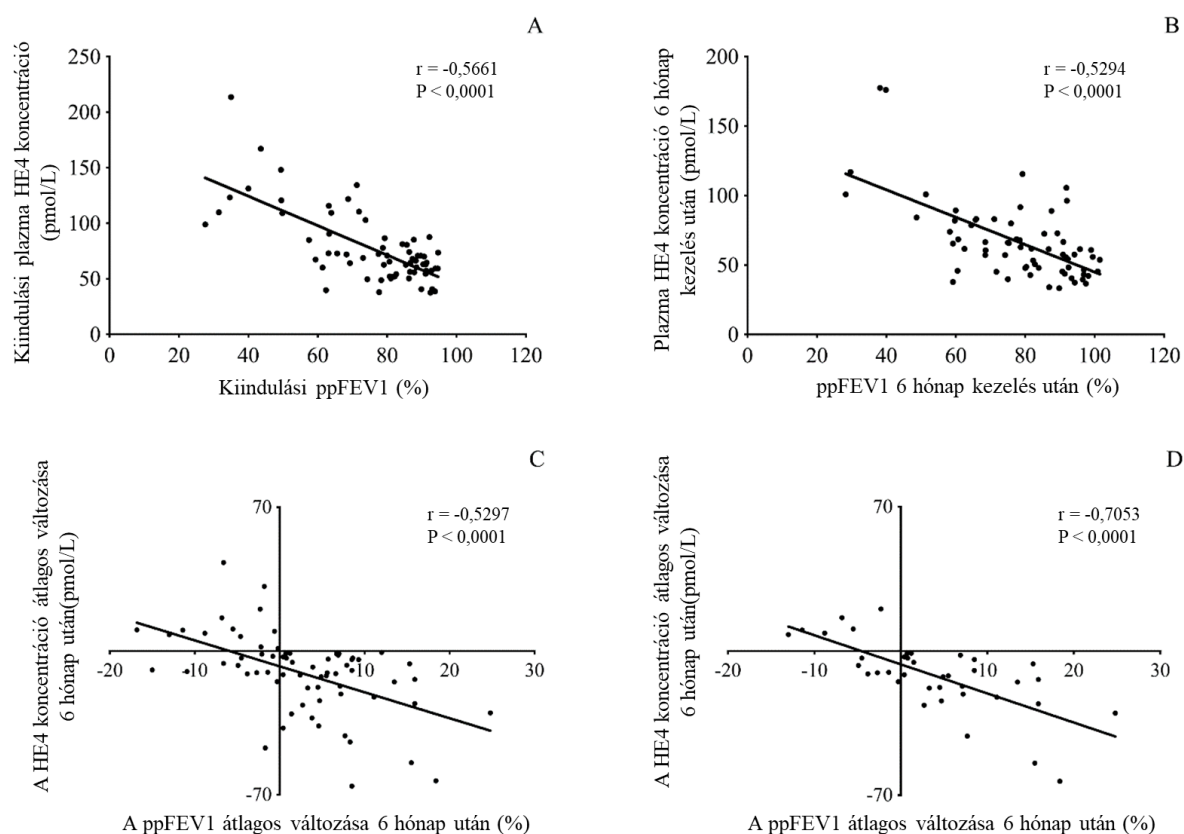
A Spearman-féle korrelációs vizsgálat alapján a ppFEV1 változása az 1. és 6. hónapban nem mutatott szignifikáns összefüggést a verejtékklorid koncentráció változásával sem az 1. hónapban (r = 0,0595; p = 0,6403), sem a 6. hónapban (r = 0,0148; p = 0,9117) (7/B-C. ábra). Mindezek alapján az volt a célunk, hogy felmérjük a plazma HE4, mint potenciális biomarker használhatóságát a LUM/IVA CFTR modulátor terápia hatásának nyomon követésében a vizsgálati időpontok során (7/A. ábra).



7. ábra: A plazma HE4 szint meghatározása LUM/IVA kezelés előtt, valamint a kezelés során (1, 3, 6 és 12 hónapnál). A pontok az egyedi HE4 értékeket jelölik, mediánnal és interkvartilis tartománnyal (IQR) együtt (A). A statisztikai elemzéseket Friedman-próbával, Dunn-féle post hoc teszttel végeztük. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ a kiindulási értékhez viszonyítva. A verejtékklorid koncentráció változása (delta értékek) és a ppFEV1 közötti korrelációt vizsgáltuk 1 hónapnál (B), illetve 6 hónapnál (C) Spearman-próbával. E változók között egyik időpontban sem volt kimutatható összefüggés.

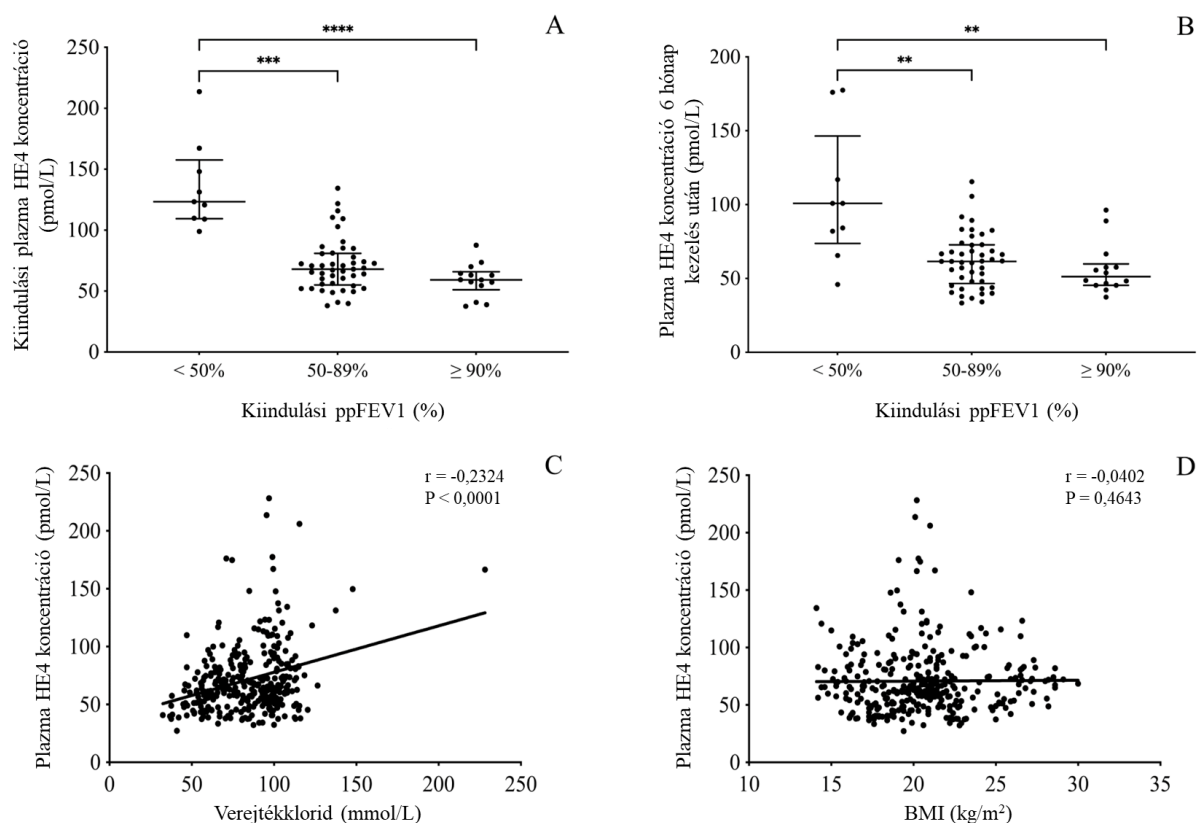
5.1.2. A plazma HE4 szint változás korrelációjának vizsgálata légzésfunkció (ppFEV1) javulásával LUM/IVA kezelés hatására

Elsőként megvizsgáltuk a plazma HE4 koncentráció és a ppFEV1 értékek közötti összefüggést a LUM/IVA kezelés megkezdésekor és a 6. hónapban, amikor a legnagyobb tüdőfunkció javulás volt kimutatható. A ppFEV1 értékek ugyanazon a napon kerültek meghatározásra, amikor a vérmintavétel történt. A célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a plazma HE4 abszolút értékei tükrözik-e a tüdőfunkció állapotát. A vizsgálat eredményei szerint szignifikáns, fordított korreláció áll fenn a kezelés előtti HE4 szintek és a ppFEV1 értékek között ($r = -0,5661$; $p < 0,0001$) (8/A. ábra). Hasonlóképpen, negatív összefüggés volt kimutatható a plazma HE4 koncentrációk és a ppFEV1 értékek között a LUM/IVA kezelés 6. hónapjában is ($r = -0,5294$; $p < 0,0001$) (8/B. ábra).



8. ábra: A HE4 koncentráció és a ppFEV1 értékek közötti korreláció elemzése a kezelés előtt (A), valamint a LUM/IVA kezelés megkezdését követő 6. hónapban (B). A HE4 átlagos változása és a ppFEV1 delta értékek közötti kapcsolat vizsgálata az összes beteg bevonásával (C). Ezt az összefüggést külön elemeztük a 18 év alatti CF-es betegek esetében is (D). A korrelációs analízist Spearman-próbával végeztük.

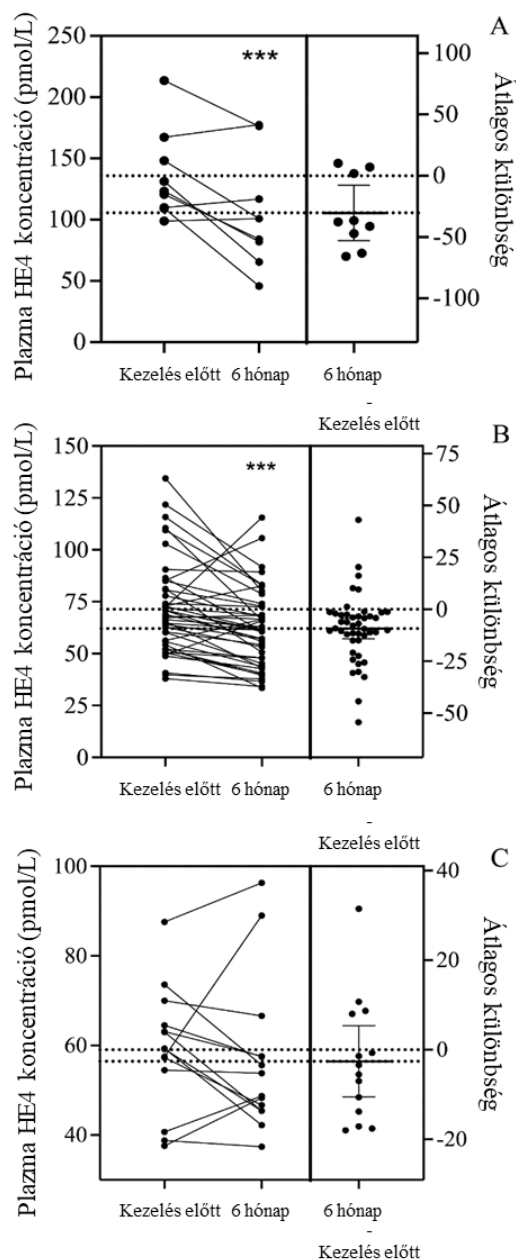
Ezzel párhuzamosan a HE4 szintjének változása a kiindulási értékhez képest (azaz a delta HE4) szintén szoros negatív korrelációt mutatott a delta ppFEV1 értékével ($r = -0,5297$; $p < 0,0001$) az összes vizsgálati résztvevő esetében (8/C. ábra). Amikor pedig az összefüggést külön elemeztük a 18 év alatti betegek alcsoportjában, a korreláció még erőteljesebbnek bizonyult gyermekkorban ($r = -0,7053$; $p < 0,0001$) (8/D. ábra).



9. ábra: A kiindulási (A) és a 6 hónapos HE4 koncentrációk (B) elemzése a kiindulási ppFEV1-értékek alapján meghatározott három alcsoportban. A plazma HE4 koncentrációk és a verejtékklorid értékek (C), valamint a BMI értékek (D) közötti korreláció vizsgálata. Az értékeket mediánként (IQR) adtuk meg. A statisztikai elemzéseket Friedman-próbával, Dunn-féle post hoc tesztel végeztük, a korrelációkat Spearman-próbával vizsgáltuk. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ két csoport között.

Amikor az abszolút HE4 koncentrációt a kezelés előtti és a 6 hónapos időpontban értékeltük a kiindulási ppFEV1 alapján (< 50%, 50–89% és ≥ 90%), ahogyan azt Sagel és munkatársai¹²¹ korábban meghatározták, a kezelés előtti és 6 hónapos HE4 szintek szignifikánsan magasabbak voltak azokban a betegekben, akiknek kiindulási ppFEV1 értéke < 50% volt, összehasonlítva a másik két alcsoporttal (9/A-B. ábra). Fontos kiemelni, hogy a legnagyobb és statisztikailag szignifikáns átlagos HE4 változást azokban a (többségében

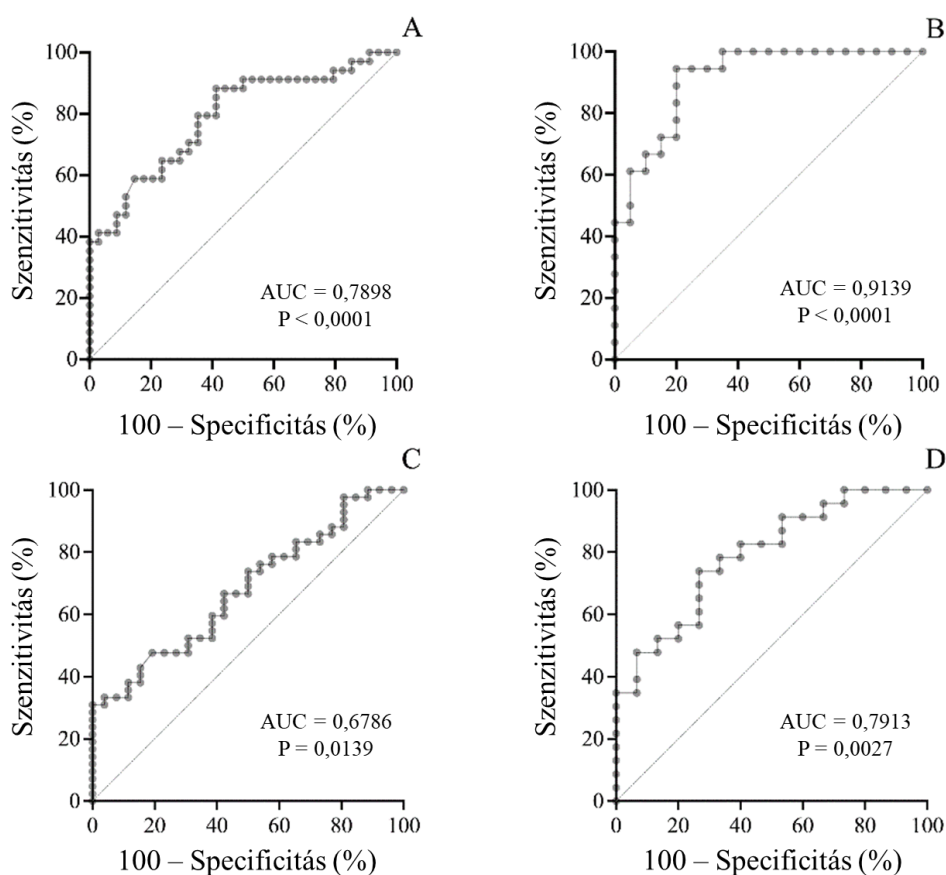
felnőtt) CF-es betegekben figyeltük meg, akiknek a kezelés megkezdése előtt súlyosan károsodott a tüdőfunkciója volt ($< 50\%$ ppFEV1) (9/A-B. ábra). Ezzel szemben a legkisebb, statisztikailag nem szignifikáns változások azoknál a betegeknél jelentkeztek, akiknek kiindulási ppFEV1 értéke $\geq 90\%$ volt.



10. ábra: A plazma HE4 koncentrációk átlagos különbségét a kiindulási ppFEV1 kategóriák $< 50\%$ (A), $50-89\%$ (B) és $\geq 90\%$ (C) alapján határoztuk meg. A bal oldalon a kiindulási HE4 értékek és a LUM/IVA kezelés 6 hónapja utáni eredmények láthatók, bemutatva a HE4 változásának tendenciáját az egyes alcsoportokban, a jobb oldalon az átlagos különbségek szerepelnek az egyedi értékekkel együtt. Az értékek átlagot jelölnek (95%-os CI-mal). A kiindulási és a 6 hónapos HE4 értékeket párosított t-próbával hasonlítottuk össze. *** $p < 0,001$ a kiindulási értékhez viszonyítva.

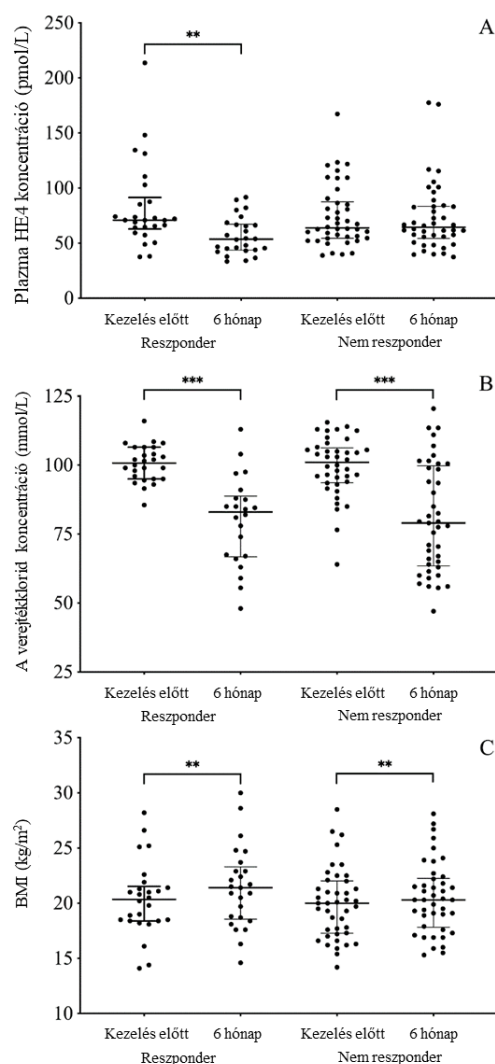
5.1.3. A plazma HE4 szint változás vizsgálata a CF-es tüdőbetegség javulásának előre jelzésében LUM/IVA terápia alatt.

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a LUM/IVA kezelés hatására bekövetkező HE4 szint csökkenés előre jelzi-e a tüdőfunkció javulását, amelyet a delta ppFEV1 értékek alapján határoztunk meg. Ennek érdekében megvizsgáltuk a delta HE4 diszkriminatív képességét, amikor a 6 hónap alatti ppFEV1 változás 2,6%-os értékét – vagyis a vizsgált betegcsoport átlagát – használtuk bináris határértékként. A delta HE4 esetében jelentős AUC-érték adódott (0,7898 [95% CI: 0,6823–0,8972], $p < 0,0001$), a $-10,7$ pmol/L-es cut-off pedig 62%-os szenzitivitást és 79%-os specificitást mutatott az összes vizsgált beteg körében (11/A. ábra).



11. ábra: A HE4 átlagos változásának diszkriminatív képességét ROC–AUC analízissel határoztuk meg a kezelés 6. hónapjában, ahol a delta ppFEV1 2,6%-os (A, B), illetve 5%-os (C, D) értékét alkalmaztuk bináris klasszifikátorként. A teljes kohorsz adataihoz képest (A) a HE4 koncentráció átlagos változása kifejezettebb volt gyermekekben ugyanazon küszöbérték alkalmazása mellett (B). Amikor a ppFEV1 delta értékének 5%-át vettük klasszifikátorként, a HE4 AUC értéke mérsékelten jelezte a megfelelő tüdőfunkció javulást az összes CF-es beteg (C), valamint a CF-es gyermekek (D) esetében.

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



12. ábra: A plazma HE4 koncentráció (A), a verejtékklorid koncentráció (B) és a BMI értékek (C) elemzése, két CF-es alcsoportban: 1) „reszponderek”, ha a ppFEV1 átlagos változása $\geq 5\%$ volt a kezelés 6. hónapjában, vagy 2) „nem rezponder”, ha a ppFEV1 növekedése 5% alatti volt. A verejtékkloriddal és a BMI-vel ellentétben a plazma HE4 koncentráció csak a rezponder csoport esetében mutatott szignifikáns változást. Az értékeket mediánban (IQR) adtuk meg. A két adatcsoport összehasonlítása Wilcoxon-féle párosított teszttel történt. ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ a kiindulási értékhez viszonyítva. Az SC a verejtékkloridot, a BMI a testtömegindexet jelöli.**

Amikor a CF-ben szenvedő betegeket a terápiás válasz alapján két alcsoportra osztottuk - vagyis reszponder csoportba soroltuk azokat, akiknél a ppFEV1 legalább 5%-os átlagos javulást mutatott 6 hónap LUM/IVA kezelés után, míg a nem reszponder csoportba azokat, akiknél a delta ppFEV1 ennél kisebb volt - azt találtuk, hogy szignifikáns plazma HE4 csökkenés kizárólag a reszponder betegekben volt megfigyelhető, akiknél a 6 hónap alatt a vártnak megfelelő tüdőfunkció javulás következett be (12/A. ábra). Ezzel szemben a verejtékklorid koncentráció és a BMI mindkét alcsoportban szignifikánsan változott (12/B-C. ábra). Ez arra utal, hogy míg a verejtékklorid és a BMI jól tükrözi a LUM/IVA kombináció általános hatását, nem alkalmasak a terápiás válasz mértékének megítélésére, és nem különítik el a reszponder és nem reszponder betegeket egymástól.

Változók	OR	95% CI	p érték
Kor	1,04	0,89-1,21	0,605
Nem	0,54	0,12-2,41	0,417
Kiindulási verejtékklorid	1,01	0,97-1,05	0,765
Kiindulási ppFEV1	1,09	1,02-1,16	0,005
BMI	1,13	0,88-1,45	0,326
<i>P. aeruginosa</i> kolonizáció	0,73	0,14-3,80	0,709
Delta HE4 6 hónapnál	0,89	0,82-0,95	0,001

6. táblázat: A „reszponder státusz” valószínűségének értékelése többszörös logisztikus regressziós analízis alkalmazásával az alábbi kovariánsok figyelembevételével: delta HE4, életkor, nem, kiindulási ppFEV1, verejték-klorid koncentráció, BMI, valamint *P. aeruginosa* kolonizáció a LUM/IVA kezelés megkezdését követő 6 hónapban. A delta HE4 és a kiindulási ppFEV1 egymástól függetlenül összefüggést mutattak a reszponder státusszal a ppFEV1 változása ($\geq 5\%$) alapján a nem válaszadókhoz képest. Az OR az esélyhányadost (odds ratio) jelenti.

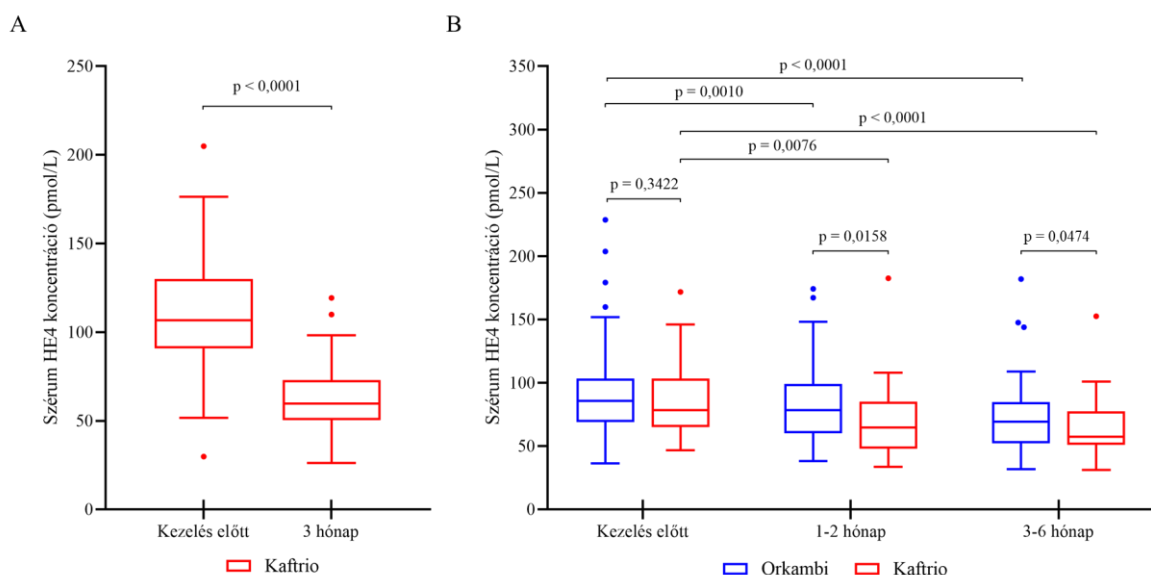
Végül többváltozós logisztikus regressziós analízist végeztünk annak vizsgálatára, hogy mely tényezők befolyásolják leginkább a reszponder státusz valószínűségét (6. táblázat). A vizsgált kovariánsok a következők voltak: delta HE4, életkor, nem, kiindulási ppFEV1, verejtékklorid koncentráció, BMI, valamint a *P. aeruginosa* pozitivitás a kezelés indítását követő 6. hónapban. Az eredmények szerint a delta HE4 (OR: 0,89; 95% CI: 0,82–0,95; $p = 0,001$) és a kiindulási ppFEV1 (OR: 1,09; 95% CI: 1,02–1,16; $p = 0,005$) független prediktor tényezőknek bizonyultak a reszponder státusz szempontjából a nem reszponder csoporthoz viszonyítva (6. táblázat).

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

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

5.2.1. A LUM/IVA (Orkambi®) és az ETI (Kaftrio®) kezelés hatásának összehasonlítása a szérum HE4 szintek változásán keresztül

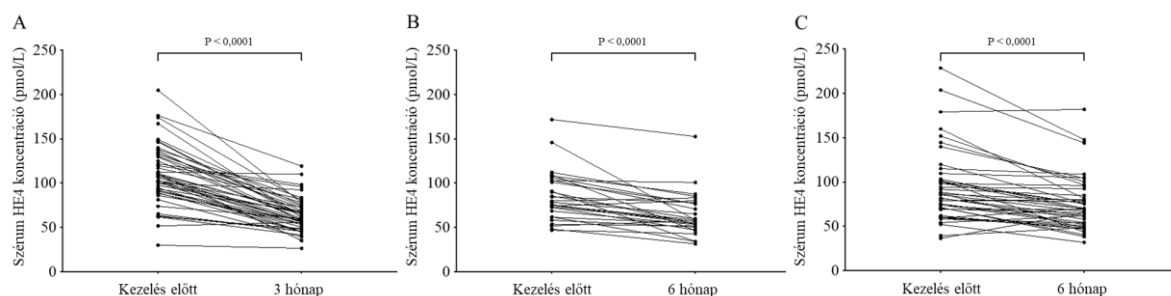
Mivel a plazma HE4 szint jelentős változást mutatott a LUM/IVA kezelés hatására, kíváncsiak voltunk, hogy vajon hogyan alakul ETI kezelés hatására a fehérje koncentrációja a CF-es betegek szérumában. Elsőként meghatároztuk a szérum HE4 szintet két Kaftrio® kezelésben részesülő, *p.Phe508del* mutációra homozigóta CF-es betegcsoportban. Az 1. kohorsz felnőtt betegeiben a tüdőfunkció jelentős javulása mellett (ppFEV1: 17,5 [14,5–20,5] %) a szérum HE4 koncentráció szignifikánsan csökkent ($p < 0,0001$) a kezelés 3. hónapjára, függetlenül a kiindulási értéktől. Ez az időpont volt az egyetlen után követéses vizsgálat ebben a betegcsoportban (13/A. ábra), a COVID-19 pandémia kitörése miatt további követési mintavételre nem volt lehetőség. A 2. kohorszban a legtöbb CF-es beteg esetében szintén javult a tüdőfunkció, az átlagos ppFEV1-változás 4,0 [–3,9–12,1] % volt. A szérum HE4 szint már a Kaftrio® kezelés 1–2. hónapjában fokozatos csökkent ($p = 0,0076$), amely a 3–6. hónapra tovább erősödött ($p < 0,0001$ a kiindulási értékhez képest) (13/B. ábra). Ezzel párhuzamosan az Orkambi®-val kezelt betegek körében is szignifikánsan alacsonyabb szérum HE4 értékeket figyeltünk meg a követéses vizsgálatok során ($p = 0,0010$ az 1–2. hónapban, illetve $p < 0,0001$ a 3–6. hónapban a kezelés előtti értékekhez viszonyítva). Fontos megjegyezni, hogy a Kaftrio®-val és Orkambi®-val kezelt betegek között a kiindulási HE4 szintben nem volt különbség ($p = 0,3422$). Ugyanakkor az ETI kezelésben (Kaftrio®) részesülőkben a HE4 koncentrációk minden követéses időpontban szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a LUM/IVA (Orkambi®) csoportban ($p = 0,0158$ az 1–2. hónapban, illetve $p = 0,0474$ a 3–6. hónapban), ami összefüggést mutatott a tüdőfunkció javulásának mértékével (13/B. ábra).



13. ábra: Szérum HE4 szintek a kezelés megkezdése előtt és különböző követéses időpontokban Kaftrio® kezelés alatt az 1. kohorszban (A), valamint Kaftrio® vagy Orkambi® kezelés alatt a 2. kohorszban (B). Összesen 123 *p.Phe508del*-CFTR variánsra homozigóta CF-es beteg került beválogatásra.

Az egyéneken belüli HE4 szint változásokat külön elemeztük és azt találtuk, hogy a legtöbb betegnél a szérum HE4 koncentráció csökkent a kezelés előtti és az utolsó időpont között. Az 1. kohorszban a szérum HE4 szint a 3 hónapos ETI kezelést követően jelentősen csökkent a kiindulási értékhez képest, az átlagos delta HE4 $-45,7$ pmol/L volt, miközben a ppFEV1 átlagos javulása 17,5%-ot ért el. A 2. kohorszban az ETI-kezelt CF-es betegek esetében a 3–6 hónapos kezelés alatt a ppFEV1 átlagosan 4,0%-kal nőtt, a HE4 átlagos változása pedig $-20,7$ pmol/L volt (14/A-B. ábra). Ezzel szemben az Orkambi® kezelésben részesülő betegek esetében mindössze 1,6%-os ppFEV1 növekedést tapasztaltunk, a HE4 átlagos csökkenése pedig $-18,5$ pmol/L volt a 3–6. hónapra (14/C. ábra).

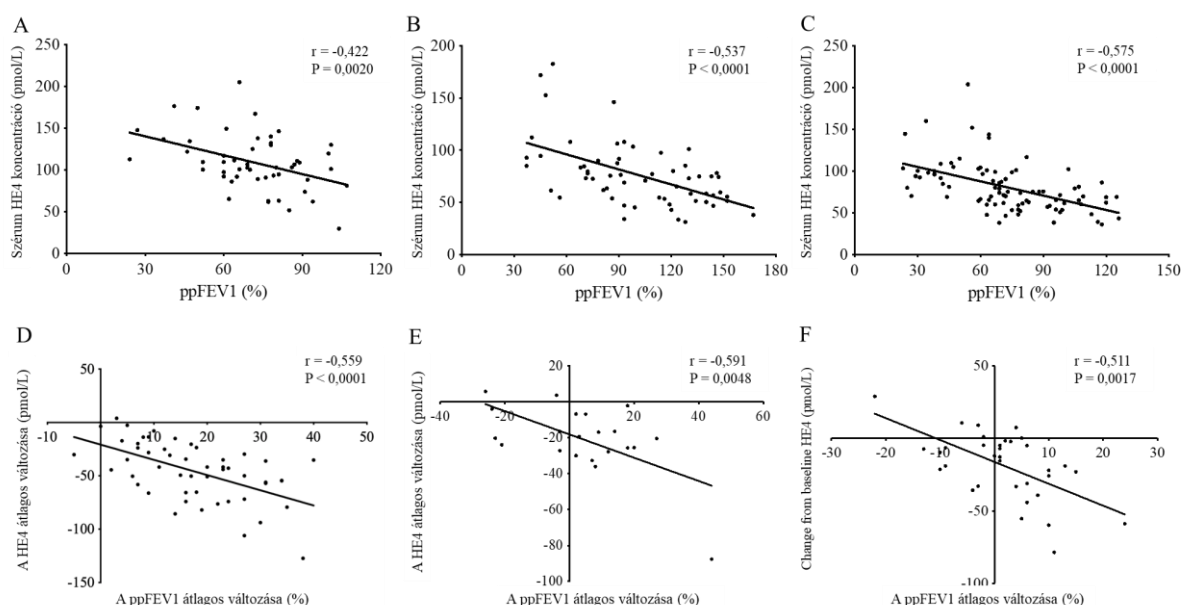
Ezek a klinikai eredmények alátámasztják, hogy a CFTR modulátor terápiák hatékonyan járulnak hozzá a szérum HE4 koncentráció csökkenéséhez CF-ben. Továbbá, a Kaftrio® kedvezőbb terápiás hatása az Orkambi®-val szemben a légzésfunkció javulásának tekintetében sikeresen nyomon követhető volt a szérum HE4 szintek változásán keresztül.



14. ábra: Az egyéni HE4 koncentráció változások elemzése CF-es betegekben. A szérum HE4 szint alakulása az 1. kohorszban (A) és a 2. kohorszban (B) Kaftrio® kezelés kezelt, valamint az Orkambi® kezelésben részesülő kontroll betegek esetében (C). A kiindulási és a követéses minták közötti HE4 értékek különbségének meghatározás Wilcoxon-féle párosított teszttel történt.

5.2.2. A szérum HE4 szint változás korrelációjának vizsgálata légzésfunkció (ppFEV1) javulásával LUM/IVA és ETI kezelés hatására

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



15. ábra: Korrelációs vizsgálat a szérum HE4 koncentráció és a ppFEV1 értékek között. Az összefüggés az 1. (A) és a 2. kohorszban (B) Kaftrio® kezelés alatt, valamint az Orkambi® kezelésben részesülő kontroll betegek esetében (C) a HE4 szint és a ppFEV1 között. Az egyes alcsoportokban (D–F) a HE4 átlagos változása és a delta ppFEV1 közötti összefüggést is vizsgáltuk. A korrelációs analízist Spearman teszttel végeztük.

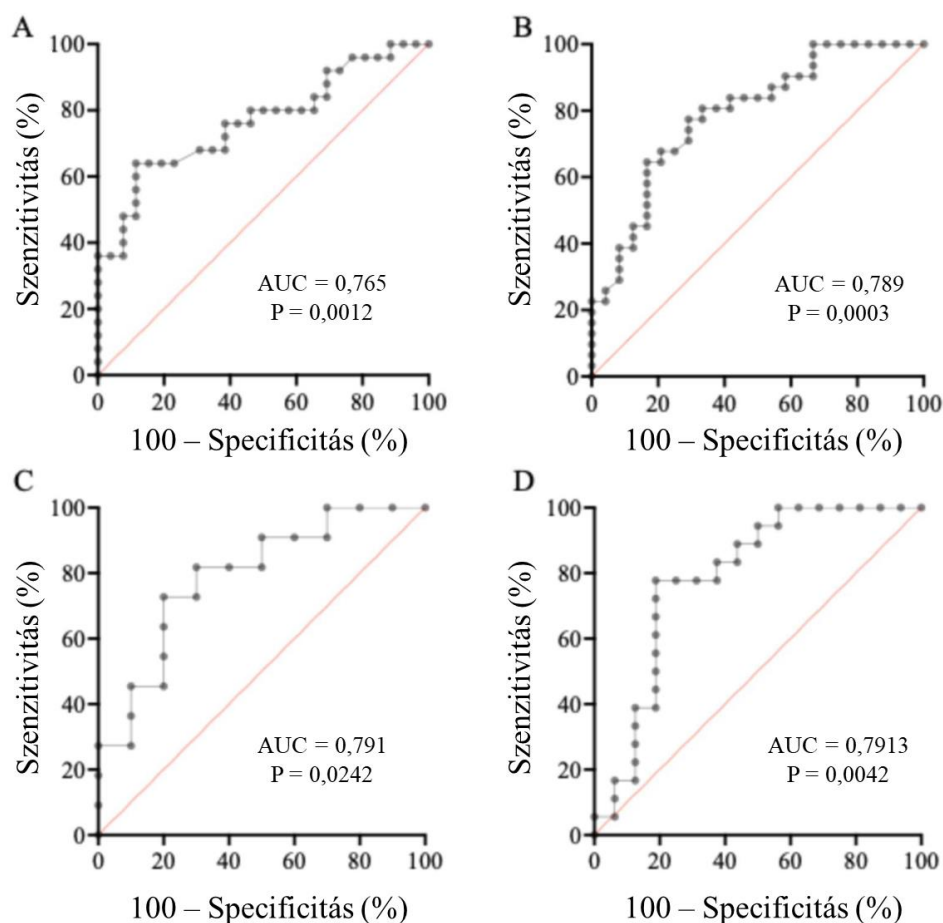
Minden kohorszban szignifikáns, fordított korrelációt találtunk a HE4 és ppFEV1 értékek között: az 1. kohorszban (Kaftrio®) $r = -0,422$; $p = 0,0020$, a 2. kohorszban (Kaftrio®) $r = -0,537$; $p < 0,0001$, míg az Orkambi®-val kezelt csoportban $r = -0,575$; $p < 0,0001$ értékeket mértünk (15/A-C. ábra).

Ezzel párhuzamosan a HE4 szintjének változása a kiindulási értékhez képest (azaz a delta HE4) szintén jelentős negatív korrelációt mutatott a delta ppFEV1 értékével az összes vizsgálati résztvevő esetében: az 1. kohorszban $r = -0,559$; $p = 0,0001$, a 2. kohorszban $r = -0,591$; $p = 0,0048$, míg a LUM/IVA kezelést kapó csoportban $r = -0,511$; $p = 0,0017$ értékeket kaptunk (15/D-F. ábra).

A szérum HE4 szint tehát erősen korrelált a ppFEV1 értékekkel, ami arra utal, hogy az összefüggés a CFTR modulátorok által kiváltott légzésfunkció javulással állhat kapcsolatban. Különösen figyelemre méltó, hogy a delta HE4 értékek még jobban tükrözték a ppFEV1 változásait, különösen a 2. kohorszban, amelybe viszonylag fiatal, ETI kezelésben részesülő CF-es betegek tartoznak.

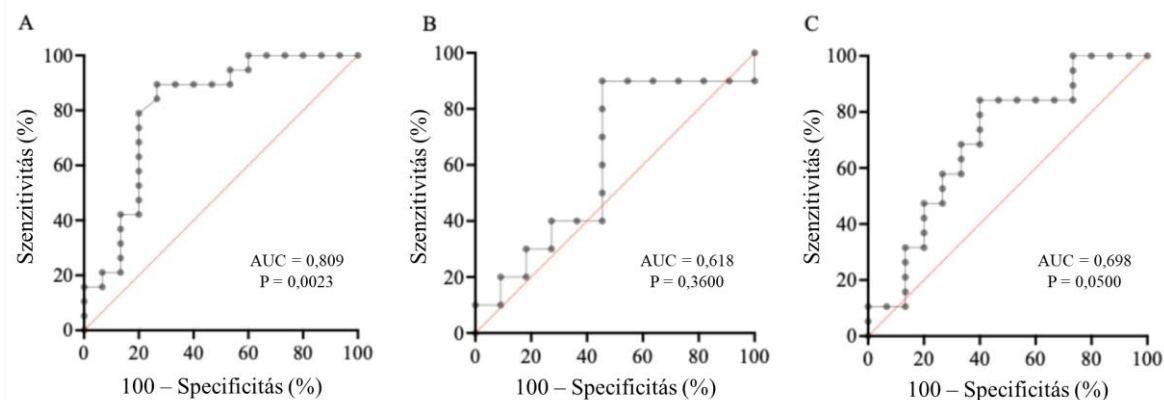
5.2.3. A szérum HE4 koncentráció változás vizsgálata a CF-es tüdőbetegség javulásának előre jelzésében LUM/IVA és ETI kezelés alatt

Ezt követően pedig azt vizsgáltuk, hogy vajon a HE4 szint csökkenés összefügg-e a tüdőfunkció javulásával a Kaftrio® kezelés hatására – csakúgy, mint az Orkambi® kezelés esetén –, amelyet szintén a ppFEV1 változásával követtünk. Ennek érdekében meghatároztuk a delta HE4 megkülönböztető képességét akkor, amikor a ppFEV1 3 vagy 6 hónap alatt bekövetkező 4,0%-os változását vettük bináris határértékként mindkét Kaftrio® kohorszban, valamint a Kaftrio® kezelés alatt álló teljes betegcsoport két életkor szerint meghatározott alcsoportjában. A felnőtt CF-es betegekből álló 1. kohorszban a delta HE4 esetében jelentős AUC értéket kaptunk (0,765 [95% CI 0,633–0,898], $p = 0,0012$). A $-42,4$ pmol/L-es cut-off érték 68,0%-os szenzitivitást és 69,0%-os specificitást mutatott (16/A. ábra). A gyerekeket és felnőtteket egyaránt magában foglaló 2. kohorszban hasonlóan magas AUC érték adódott (0,789 [95% CI 0,668–0,909], $p = 0,0003$), ahol a $-20,3$ pmol/L-es cut-off 77,4%-os szenzitivitást és 70,8%-os specificitást nyújtott (16/B. ábra). Ezzel párhuzamosan az Orkambi®-val kezelt betegek (kontroll csoport) esetében a delta HE4 AUC értéke 0,809 volt (95% CI 0,648–0,969; $p = 0,0023$), $-17,2$ pmol/L-es cut-off mellett, 78,9%-os szenzitivitással és 80,0%-os specificitással (17/A. ábra).



16. ábra: A HE4 átlagos változásának (delta HE4) diszkriminatív képességét ROC–AUC analízissel határoztuk meg, ahol a Kaftrio[®] kezelés 3. vagy 6. hónapjában a delta ppFEV1 4,0%-át alkalmaztuk bináris klasszifikátorként. A HE4 átlagos változása jelentős AUC értéket mutatott az 1. (A) és a 2. kohorszban (B), valamint Kaftrio[®] kezelésben részesülő gyermekek (C) és felnőttek (D) esetében.

A Kaftrio[®] kezelt betegek körében a HE4 átlagos változása hasonló prediktív értékkel bírt mind gyermekekben (AUC: 0,791 [95% CI 0,594–0,988], $p = 0,0242$), mind felnőttekben (AUC: 0,788 [95% CI 0,624–0,953], $p = 0,0042$). A cut-off értékek gyermekeknél $-14,6$ pmol/L, felnőtteknél $-21,6$ pmol/L voltak, amelyekhez 72,7% és 80,0%-os szenzitivitás, illetve 77,8% és 81,3%-os specifitás társult (16/C-D. ábra).

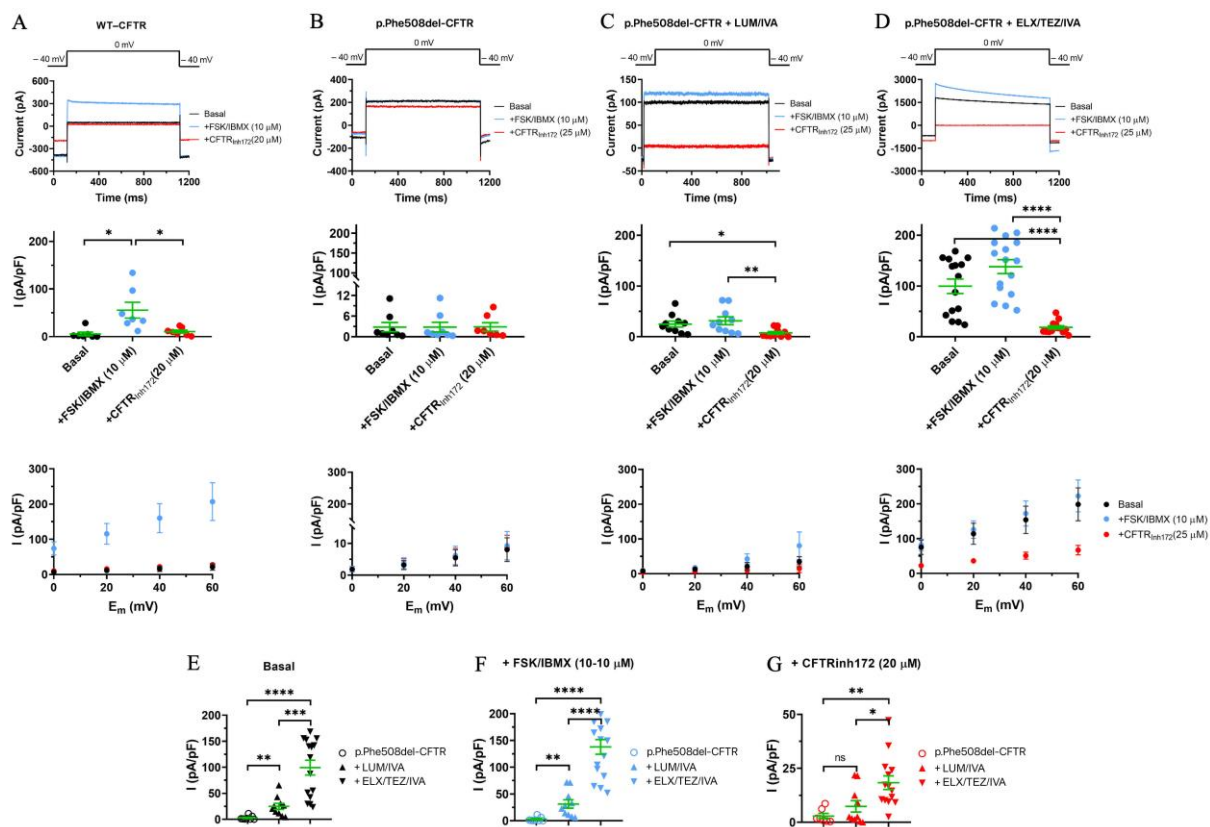


17. ábra: A delta HE4 diszkriminatív képességének meghatározása CF-es betegekben. ROC–AUC analízist végeztük az abszolút HE4 érték diszkriminatív képességének vizsgálatára Orkambi® kezelésben részesülő CF-es betegekben (A), valamint a Kaftrio® (B) vagy Orkambi® (C) kezelés 3. vagy 6. hónapjában, ahol a delta ppFEV1 4,0%-át alkalmaztuk bináris határértékként.

A kiindulási abszolút HE4 szintek diagnosztikai jellemzőit is elemeztük annak megítélésére, hogy képesek-e előre jelezni a CFTR modulátor kezelésre adott klinikai választ, amelyet a ppFEV1 3–6 hónap alatt bekövetkező 4,0%-os javulása alapján határoztunk meg. Azonban egyik vizsgált kohorszban sem mutatkozott statisztikailag szignifikáns összefüggés: sem a Kaftrio® kezelés esetében (AUC: 0,618 [95% CI 0,365–0,872], $p = 0,3600$), sem pedig az Orkambi® kezelés során (AUC: 0,698 [95% CI 0,513–0,883], $p = 0,050$) (17/B-C. ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a delta HE4 – és nem az abszolút HE4 érték – alkalmas a Kaftrio® kezelés kedvező hatásainak hatékony jelzésére.

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

Annak érdekében, hogy a CFTR funkció CFTR modulátorokkal történő helyreállítását megvizsgáljuk, a légúti epithelsejteken „egész sejt” patch-clamp technikát alkalmazva követtük nyomon a kezelőanyagok CFTR ioncsatornán átfolyó kloridáramra gyakorolt hatását. Munkacsoportunk korábbi eredményeit, melyben *in vitro* humán *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejteken két különböző CFTR modulátor kombináció (LUM/IVA vagy TEZ/IVA) kezelés hatása került analízisre, alapul vettük további vizsgálatainkhoz.⁷⁰



18. ábra: A kloridáram helyreállítása LUM/IVA és ELX/TEZ/IVA kezelt *p.Phe508del*-CFTR CFBE 41o⁻ sejtekben. A mért kloridáram változásait rögzítettük a wt-CFTR-t (A) és *p.Phe508del*-CFTR-t (B) expresszáló CFBE sejteken, amelyeket 24 órán át LUM/IVA-val (C) vagy ELX/TEZ/IVA-val (D) kezeltünk. Felső képsor: 0 mV-on rögzített bazális áram FSK/IBMX stimuláció nélkül (fekete), ~2 perces FSK/IBMX (10/100 μ M) stimuláció után (kék), valamint FSK/IBMX és 20 μ M CFTRinh₁₇₂ jelenlétében (piros). Középső képsor: csúcsáram-feszültség (pA/pF), FSK/IBMX nélkül (fekete), FSK/IBMX stimuláció hatására (kék), illetve FSK/IBMX és 20 μ M CFTRinh₁₇₂ jelenlétében (piros). Alsó képsor: áramsűrűség-feszültség (pA/pF) a megadott tesztpotenciálokon, FSK/IBMX nélkül (fekete), FSK/IBMX stimuláció után (kék), valamint FSK/IBMX és 20 μ M CFTRinh₁₇₂ jelenlétében (piros). A +40 mV-on mért bazális (E) FSK/IBMX (10/100 μ M) által stimulált (F), FSK/IBMX (10/100 μ M) által stimulált és CFTRinh₁₇₂ (20 μ M) által gátolt (G) csúcsáramsűrűségek (pA/pF) CFTR modulátor előkezelés nélkül (*p.Phe508del*-CFTR, üres körök), LUM/IVA-val előkezelt (felfelé mutató háromszögek) vagy ELX/TEZ/IVA-val előkezelt (lefelé mutató háromszögek) sejtekben. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk (n = 7–16 sejt/feltétel), minden szimbólum egyedi mérést reprezentál. Az összehasonlításokat páros vagy párosítatlan t-próbával végeztük. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), illetve p < 0,0001 (****) esetén.

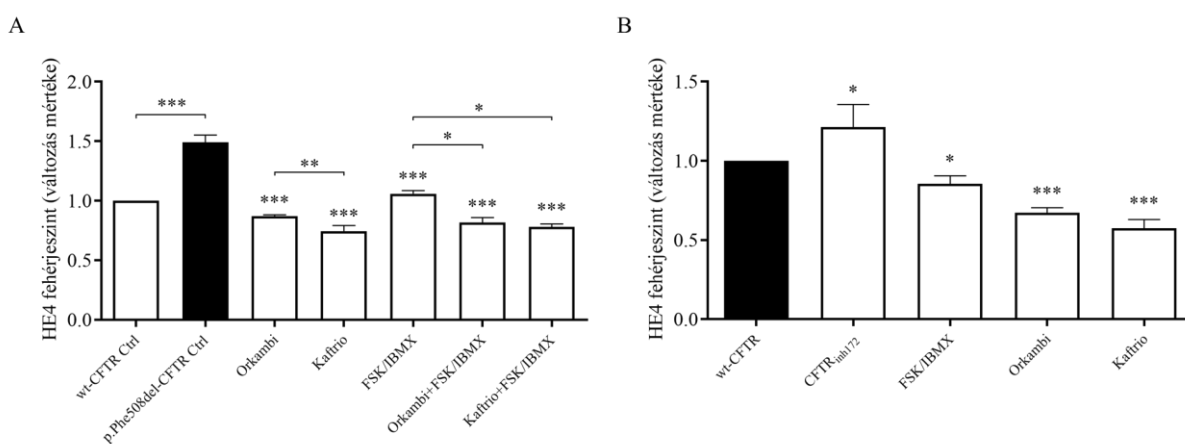
Jelen tanulmányunkban ugyanezzel a módszertannal hasonlítottuk össze a Kaftrio[®] és az Orkambi[®] hatását a kloridcsatorna működésére, amelyben a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló

CFBE sejteket 24 órán át ELX/TEZ/IVA-val vagy LUM/IVA-val kezeltük, illetve összevetettük a kezeletlen kontrollokkal (18/B-D. ábra). Párhuzamosan kezeletlen, wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejteket is vizsgáltunk kontrollként (18/A. ábra).

Az ionáram mérését elvégeztük FSK/IBMX csatorna-aktivátorok nélkül, majd azok jelenlétében, végül pedig a CFTR szelektív inhibitor CFTR_{inh172} hozzáadását követően. Az összehasonlíthatóság megkönnyítése érdekében a Cl⁻ áram nagyságát a sejtkapacitásra normalizáltuk, így kaptuk meg az áramsűrűséget, amelyet minden sejt esetében legalább három, 5 másodpercenként ismételt depolarizáció átlagából számoltunk. Az ionáramot -40 mV rögzített potenciálról kiindulva 0 és +60 mV közötti tesztpotenciálokra adott feszültség léptékkel váltottuk ki 20 mV-os lépésekben 10 másodpercenként a légúti epithelsejteken. A vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben a kloridáram jelentősen növelhető volt a FSK/IBMX hatására és egyben gátolható volt a CFTR szelektív inhibitor CFTR_{inh172} alkalmazásával (18/A. ábra). Ezzel szemben a *p.Phe508del*-CFTR-t hordozó CFBE sejtekben az FSK/IBMX nem váltott ki kloridáramot (18/B és F. ábra). Mind a LUM/IVA, mind pedig az ELX/TEZ/IVA előkezelés szignifikánsan megnövelte a bazális kloridáramot (18/E. ábra). Az ELX/TEZ/IVA előkezelés hatása lényegesen erőteljesebb volt: a bazális áramsűrűség a következőképpen alakult (pA/pF): kezeletlen *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek: $2,8 \pm 1,3$ (n = 8); LUM/IVA-val előkezelték: $24,9 \pm 5,8$ (n = 10; p = 0,0044); ELX/TEZ/IVA-val előkezelték: $99,4 \pm 14,2$ (n = 15; p < 0,0001). Az FSK/IBMX mindkét CFTR_m kezelés (LUM/IVA és ELX/TEZ/IVA) esetén szignifikánsan növelte a kloridáramot a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló sejtekben (18/C és D. ábra), és ezek az áramok nagyobbak voltak, mint a kezelés nélküli állapotban mért értékek (18/F. ábra). Ezen felül az ELX/TEZ/IVA-val kezelt sejtekben az FSK/IBMX által indukált áram nagysága szignifikánsan meghaladta a LUM/IVA-val előkezelt sejtek értékeit ($138,0 \pm 13,8$ (n = 16) vs. $31,3 \pm 7,7$ (n = 10) pA/pF; p < 0,0001). Az ionáram érzékeny volt a CFTR_{inh172} gátló hatására (18/B-D és G): a 20 μM CFTR_{inh172} az FSK/IBMX által kiváltott ionáramokat az inhibitor nélkül mért értékek kb. 10%-ára csökkentette. Összefoglalva, mindkét CFTR modulátor kombináció hatékonyan korrigálta a *p.Phe508del*-CFTR ioncsatorna működését, azonban a Kaftrio® (ELX/TEZ/IVA) előkezelés lényegesen hatékonyabbnak bizonyult, mint az Orkambi® (LUM/IVA), ami összhangban áll a klinikai tapasztalatokkal.

5.2.5. Az ELX/TEZ/IVA kezelés csökkentette a HE4 koncentrációt a CFBE 410⁻ sejt kultúrák felülszójában *in vitro* körülmények között

A CFTR modulátorok HE4 expresszióra kifejtett hatásának vizsgálatához a *p.Phe508del*-CFTR CFBE 410⁻ sejteket kezeltük az ELX/TEZ/IVA (Kaftrio®) hármas kombinációval, illetve a LUM/IVA (Orkambi®) kettős kombinációval 24 órán keresztül. A kezelés után a HE4 koncentrációját a sejt kultúra felülszójában határoztuk meg. Kontrollként wt-CFTR-t expresszáló CFBE 410⁻ sejteket is vizsgáltunk. Korábbi eredményeinkkel összhangban⁶⁸⁷⁰ a bazális HE4 szekréció szignifikánsan magasabb volt *p.Phe508del*-CFTR sejtekben, mint a vad típusú kontroll sejtekben ($p < 0,001$). Mindkét modulátor kezelés szignifikáns HE4 szint csökkenést eredményezett a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva ($p < 0,001$ mindkét esetben; 19/A. ábra). Az ELX/TEZ/IVA kombináció pedig jelentősebb mértékben csökkentette a HE4 koncentrációját, mint a LUM/IVA ($p < 0,01$).



19. ábra: A HE4 szint vizsgálata a *p.Phe508del*-CFTR-t (A) és wt-CFTR-t expresszáló CFBE 410⁻ sejtek felülszójában (B). A CFTR funkciót farmakológiai úton befolyásoltuk a sejtekben 24 órás ELX/TEZ/IVA vagy LUM/IVA kezeléssel. Az összehasonlításokhoz független t-próbát alkalmaztunk. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), illetve $p < 0,001$ (***) esetén a kontroll sejtekhez viszonyítva.

Egy másik kísérletben az FSK/IBMX aktivátorokat – amelyek ismert módon fokozzák a CFTR-csatorna aktivitását – önmagában vagy a CFTR modulátorokkal kombinálva kezeltük a *p.Phe508del*-CFTR sejteket (19/A. ábra). Az FSK/IBMX önálló alkalmazása is szignifikánsan mérsékelte a HE4 szinteket ($p < 0,001$), feltehetően a reziduális CFTR funkció aktiválásán keresztül. Figyelemre méltó módon az FSK/IBMX + CFTRm kombinációja még tovább csökkentette a HE4 expressziót, és ez a hatás szignifikáns volt az FSK/IBMX önálló

kezeléssel összehasonlítva is ($p < 0,05$), ami a terápiás hatások additív jellegére utal (19/A. ábra).

A CFTR funkció és a HE4 expresszió közötti fordított kapcsolat mélyebb megértése érdekében a CFTR gátlás hatását vizsgáltuk wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o- sejtekben. A CFTR_{inh172} inhibitor alkalmazása szignifikáns HE4 koncentráció emelkedést eredményezett a sejtek felülúszójában ($p < 0,05$) (19/B. ábra), ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a csökkent CFTR aktivitás fokozott HE4 szekrécióhoz vezet. Ezzel ellentétesen, a CFTR funkció FSK/IBMX általi aktiválása jelentősen csökkentette a HE4 koncentrációját (19/B. ábra) a kezeletlen kontrollokhoz képest ($p < 0,05$), ami pedig arra utal, hogy a fokozott CFTR aktivitás gátló hatást gyakorol a HE4 fehérje expressziójára.

Érdekes módon mind az ELX/TEZ/IVA, mind a LUM/IVA kezelés csökkentette a HE4 szintet még a wt-CFTR-t expresszáló CFBE41o- sejtekben is. A csökkenés mindkét modulátor kezelés esetében szignifikáns volt ($p < 0,001$), és hasonló mértékűnek bizonyult (19/B. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CFTR működése meghatározza a HE4 bazális expresszióját és a csatorna funkció károsodása magyarázhatja a HE4 szint emelkedését CF-es légúti epithelsejtekben *in vitro*.

Összességében az eredmények megerősítik, hogy a HE4 kiindulási szintjét alapvetően a CFTR aktivitás szabályozhatja. A CFTR funkció károsodása – ahogy az CF-eredetű légúti epitheliális sejtekben megfigyelhető – az emelkedett HE4 expresszió hátterében állhat. Emellett a *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó sejtekben az ELX/TEZ/IVA jóval kifejezettebb HE4 szint csökkenést idézett elő, mint a LUM/IVA, ami összhangban van a jobb CFTR funkció korrigáló hatásával. Ez a HE4 extracelluláris koncentrációjának jelentősebb változásában is tükröződött, összhangban a korábban leírt szisztémás HE4 szint csökkenéssel.

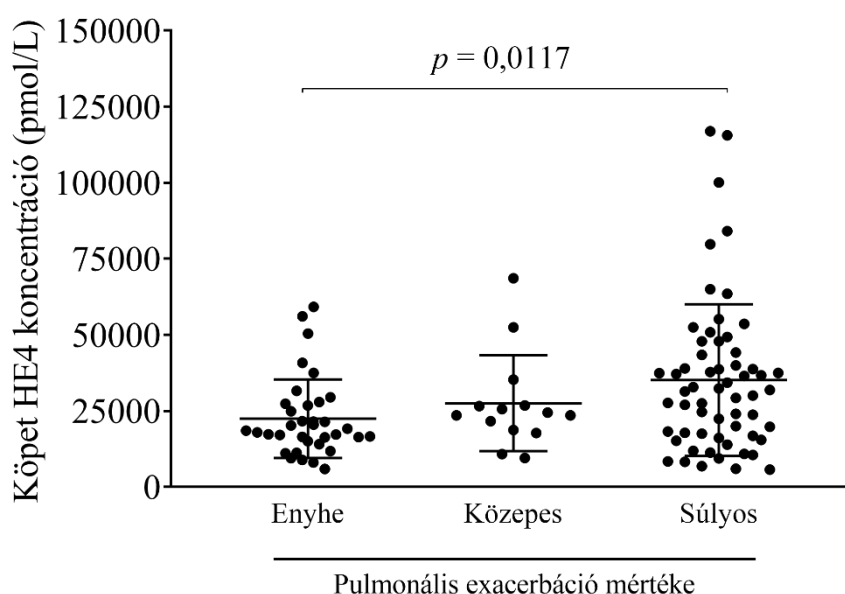
5.3. A CF-es betegek köpetmintáiban mért HE4 koncentráció klasszikus gyulladásos paraméterek tükrében

A plazma és szérum HE4 koncentráció meghatározása mellett klinikai vizsgálatainkat kiegészítettük CF-es betegek köpetmintáinak analízisével (még nem publikált adatok). A köpetben jónéhány pro-inflammatorikus citokin (pl. IL-8) koncentrációja mérhető, ugyanakkor nagy intra-individuális variabilitást mutathat akár stabil állapotú CF-es betegekben is, azonban ennek oka nem teljesen tisztázott. Az egységes mintavételi és analitikai eljárások hiánya miatt a köpetben mérhető biomarkerek rutinszerű alkalmazása a klinikai gyakorlatban korlátozott, ugyanakkor egyes gyulladásos mediátorok meghatározása hasznos lehet a légzésfunkció

romlásának előrejelzésében és a terápiás válasz követésében. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon CF-es betegek köpetmintáiban a HE4 szintek összefüggést mutatnak-e a pulmonális exacerbáció súlyosságával és különböző gyulladásos paraméterekkel.

5.3.1. A CF-es köpet HE4 szint és a pulmonális exacerbáció közötti összefüggés vizsgálata

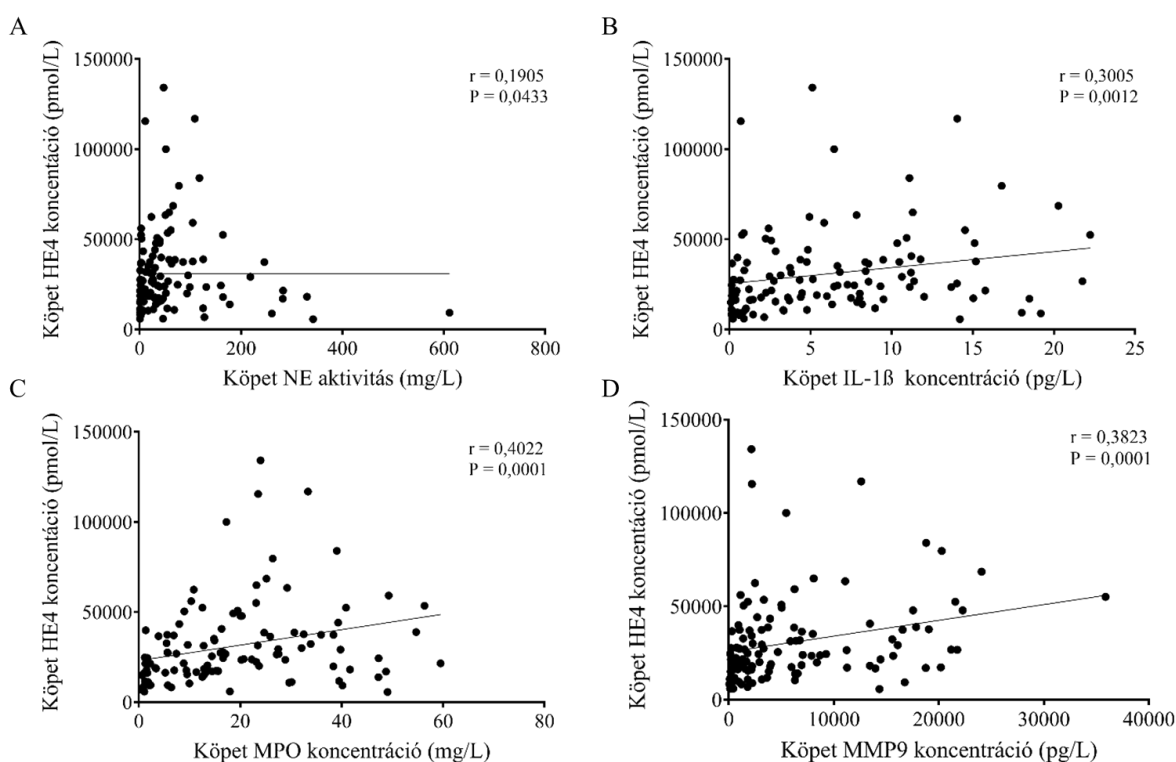
Rendelkezésünkre állt 72 CF-es beteg köpetmintája, akiknek a főbb demográfiai és laboratóriumi paramétereit már korábban feltüntettük (lásd 3. táblázat). Vizsgálataink során három alcsoportba soroltuk a CF-es betegeket az exacerbáció súlyosságát figyelembe véve. Ennek megfelelően enyhe, közepes, illetve súlyos exacerbációt mutató csoportokat képeztünk. Azt találtuk, hogy a köpet HE4 koncentráció szignifikánsan emelkedett volt a súlyos exacerbációt mutató CF-es betegeknél az enyhe, illetve közepes mértékű exacerbációban szenvedőkhöz képest, ugyanakkor az utóbbi két csoport között nem találtunk jelentős különbséget. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a köpetben mért HE4 szint egyfajta tendenciát mutathat a pulmonális exacerbáció súlyosságával (20. ábra).



20. ábra: Köpet HE4 szint meghatározás pulmonális exacerbáción átesett CF-es betegekben. Összesen 72 CF-es beteg köpetmintájában végeztünk HE4 koncentráció meghatározást. A betegeket három alcsoportba soroltuk az exacerbáció súlyosságának megfelelően: enyhe, közepes és súlyos. Az egyes alcsoportok közötti összehasonlítást ANOVA teszttel végeztük.

5.3.2. Klasszikus gyulladásos paraméterek és a köpet HE4 szint közötti korreláció vizsgálata CF-es betegekben

Az exacerbáción átesett 72 CF-es beteg esetében, akiknek lemértük a köpet HE4 koncentrációját, rendelkezésünkre álltak különböző gyulladásos paraméter adatai. Az egyik vizsgált marker a légúti gyulladás egyik legérzékenyebb biomarkere CF-ben, az aktivált neutrophil granulocyta által termelt NE, mely szignifikáns korrelációt mutatott a köpetben mért HE4 koncentrációval ($r = 0,1905$; $p = 0,0433$) (21/A. ábra). CF-ben a visszatérő infekciók és krónikus gyulladás gyakori és mindez neutrophil granulocytá aktivációval és pro-inflammatorikus citokinek (pl. IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β) fokozott termelődésével jár együtt, melyek nem csak a patomechanizmusban töltenek be funkcionális szerepet, de potenciális biomarkerként is tekinthetünk rájuk. Az általunk vizsgált betegek esetén az IL-1 β eredmények álltak rendelkezésre, melyek még jelentősebb összefüggést mutattak a HE4 szintekkel ($r = 0,3005$; $p = 0,0012$) (21/B. ábra).



21. ábra: A köpet HE4 és különböző gyulladásos paraméterek korrelációjának vizsgálata CF-ben. Összesen 72, akut exacerbáción átesett CF-es beteg köpetmintájában végeztünk HE4 koncentráció meghatározást. Megvizsgáltuk a köpet HE4 szint korrelációját a neutrophil elasztázzal (NE) (A), interleukin-1 β -vel (IL-1 β) (B), mieloperoxidázzal (MPO) (C), és mátrix metalloproteináz-9-cel (MMP9) (D). A korrelációs analízist Spearman teszttel végeztük.

A legjelentősebb korrelációt pedig másik két gyulladásos marker, a neutrophil granulocyták által termelt MPO ($r = 0,4022$; $p < 0,0001$) (21/C. ábra), illetve az extracelluláris mátrixot bontó enzim, a MMP9 mutatta ($r = 0,3823$; $p < 0,0001$) (21/D. ábra), amely szintén a neutrophil granulocytákból és makrofágokból szabadul fel gyulladásos folyamatok során. CF-ben az MMP9 szintje gyakran emelkedett a légutakban, és hozzájárul a szöveti károsodáshoz és a légúti szöveti remodellinghez.

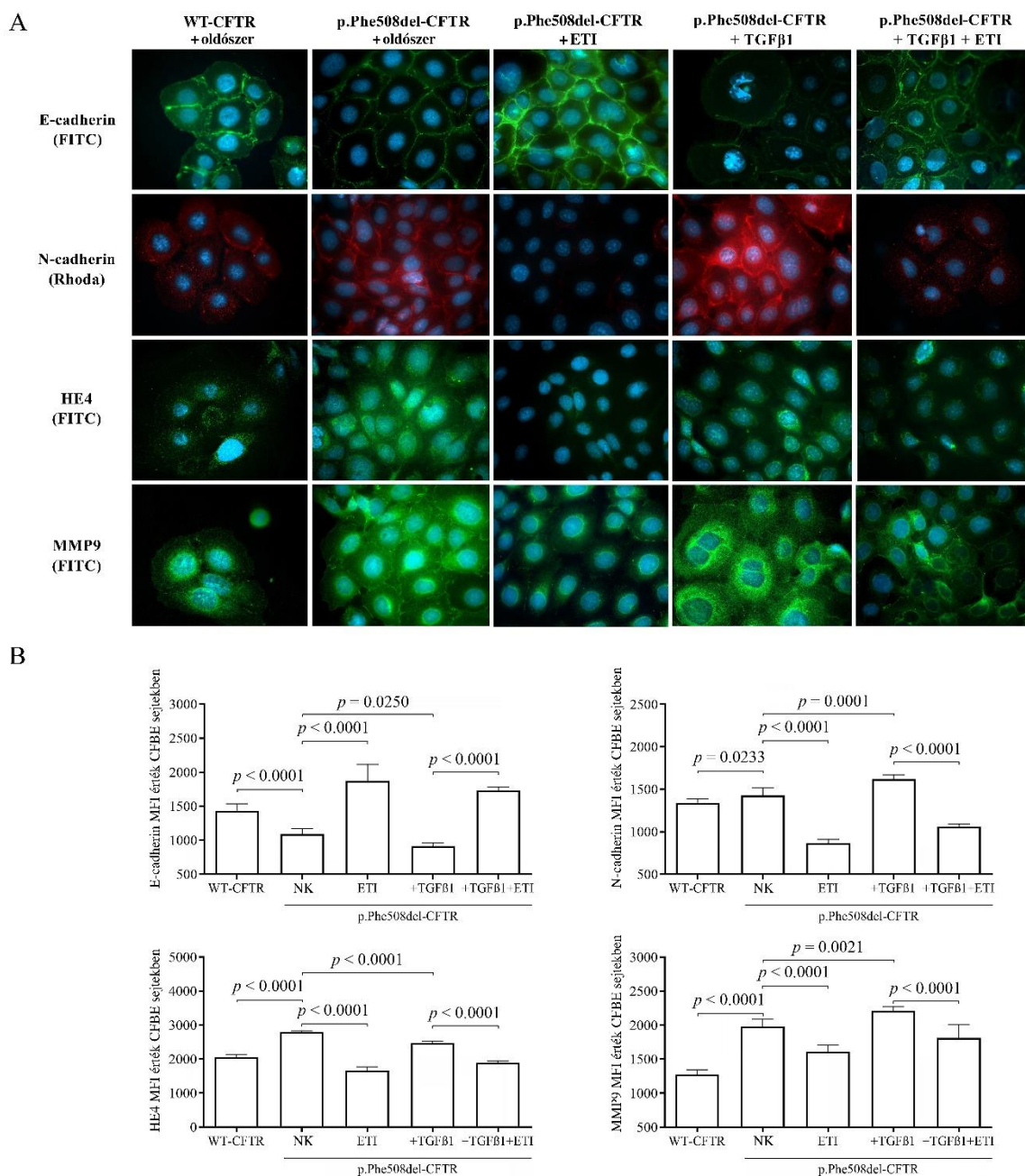
Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a köpet HE4 koncentráció korrelál a pulmonális exacerbáció súlyosságával CF-ben, illetve összefüggést mutat olyan klasszikus köpetben mért gyulladásos paraméterekkel, mint a NE, IL1- β , MPO és MMP9.

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

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

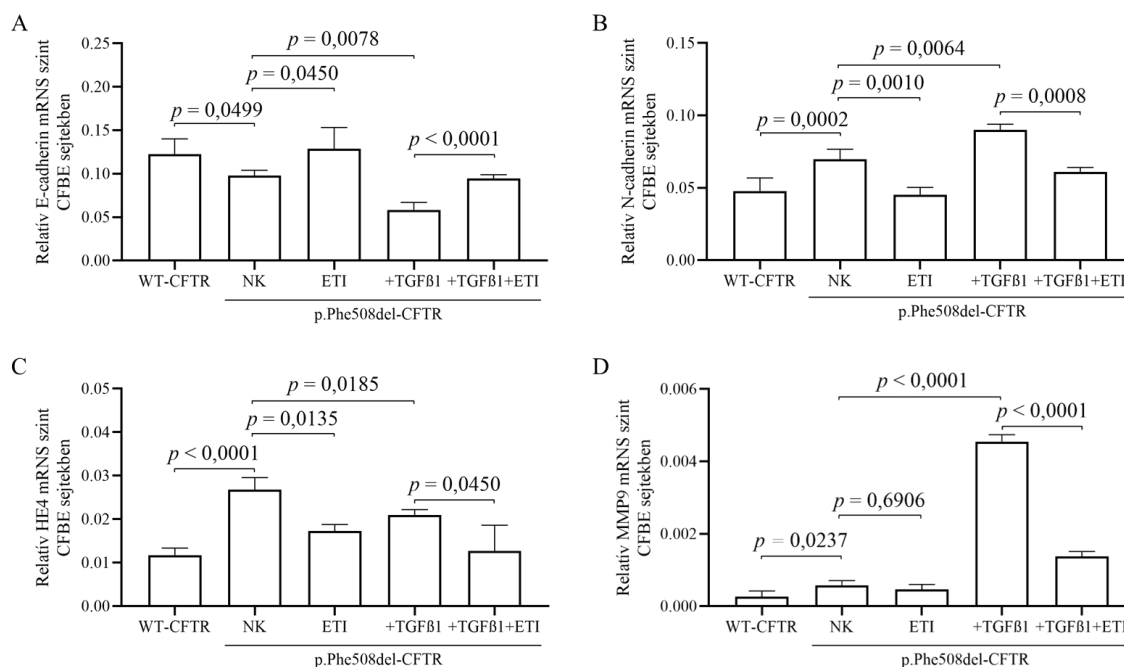
5.4.1. A *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejtek az EMT-re jellemző tulajdonságokat mutatnak a vad típusú CFBE sejtekkel összehasonlítva

A humán CF-es légúti epithelsejtek vizsgálatához a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejteken, valamint kontrollként wt-CFTR-t hordozó CFBE 41o⁻ sejteken végeztünk immunfluoreszcens (IF) és RNS szintű vizsgálatokat annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az EMT markerek expresszióját. Az IF analízis eredményei azt mutatták, hogy az E-cadherin expressziója csökkent, míg az N-cadherin pozitivitása fokozott volt a mutációt tartalmazó sejtekben a vad típusú sejtekhez képest (22/A ábra). Emellett a HE4 és az MMP9 fehérjék expressziója is kimutatható volt IF segítségével és mindkét marker kiindulási átlagos fluoreszcencia intenzitása (MFI) emelkedett a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a wt-CFTR kontroll sejtekhez viszonyítva (22/B ábra).



22. ábra: Kiindulási és TGFβ1 által indukált EMT marker, valamint HE4 és MMP9 expresszió immunfluoreszcens mikroszkópos (IF) vizsgálata ETI kezelés mellett vagy anélkül a *p.Phe508del-CFTR*-t, illetve a *wt-CFTR*-t expresszáló CFBE sejtekben. Az EMT markerek szintjét IF festéssel végeztük (A), és az egyes markerekhez tartozó átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) használtuk a pozitivitás mértékének kvantitálására (B) annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a két sejtvonalat az EMT kialakulásának szempontjából. Az adatokat átlag ± SEM formájában ábrázoltuk, n = 6–8 minta/kondíció. A két csoport összehasonlítását Mann–Whitney U-próbával végeztük.

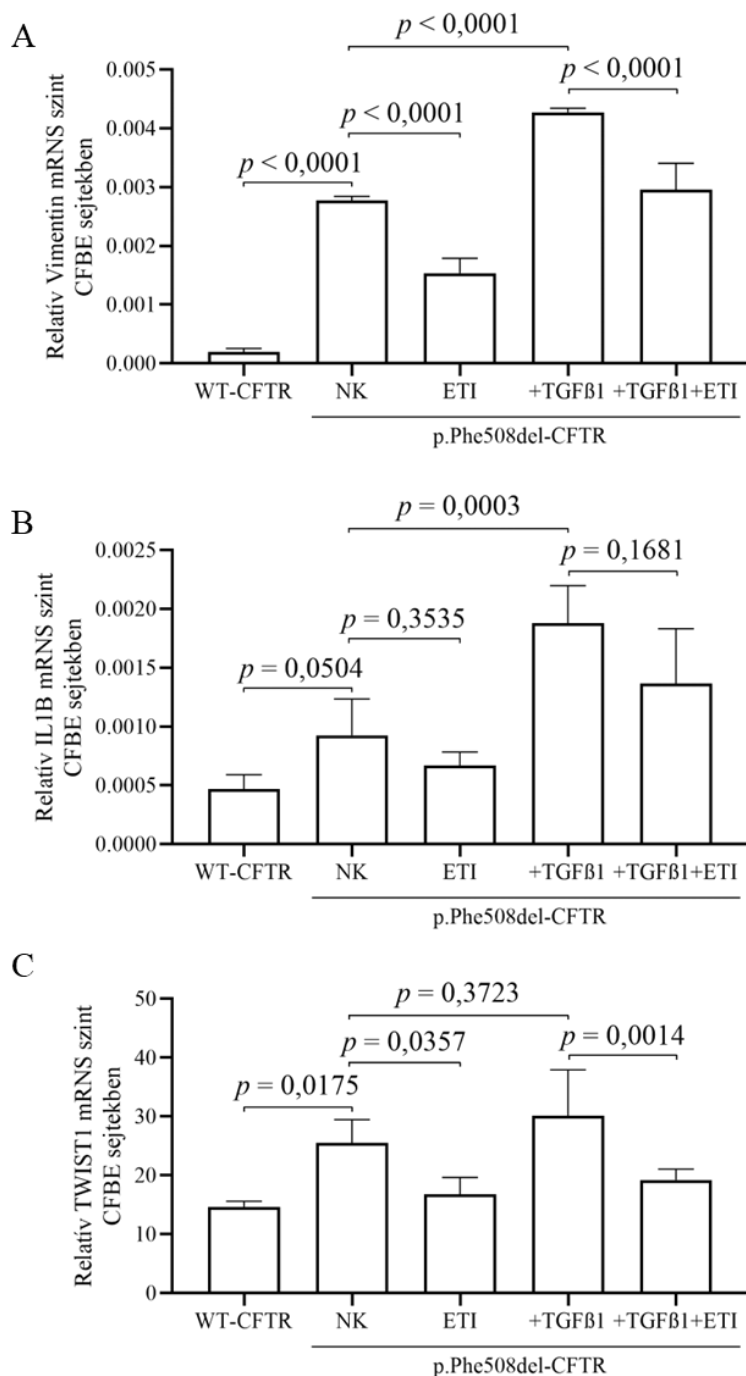
Ezzel párhuzamosan mRNA mennyiségi meghatározást is végeztünk, és a fenti biomarkerek expressziója között hasonló, de még kifejezettebb különbséget figyeltünk meg a két sejtvonal között (23/A-D ábra).



23. ábra: Az E-cadherin (A), N-cadherin EMT markerek, valamint a HE4 (C) és az MMP9 (D) mRNA expressziójának vizsgálata a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben TGFβ1-kezelést követően, ETI jelenlétében vagy anélkül. Az mRNA kvantitatív analízisét RT-qPCR módszerrel végeztük és a normalizáláshoz a *RPLP0* (36B4) referencia gént használtuk. Az adatokat átlag ± SEM formájában ábráztuk, n = 5–6 minta/kondíció. A két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-próbát alkalmaztunk.

Továbbá meghatároztuk a Vimentin (24/A. ábra), mint további mezenchimális marker, valamint az IL-1β mRNA expresszióját (24/B. ábra), amely pedig egy proinflammatorikus citokin. Mindkét esetben szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a kontroll sejtekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az epitheliális fenotípus károsodik és mezenchimális jelleg indukálódik a CF-es bronchiális epithelsejtekben. Ezen kívül megvizsgáltuk a TWIST1 mRNA expresszióját is, amely transzkripciósz faktorként különböző génexpressziós szabályzásban vesz részt az EMT folyamatában.¹⁰² A TWIST1 emelkedett expressziója alátámasztotta a mezenchimális fenotípus kialakulását mind a bazális, mind a TGF-β1 kezelt a mutációt hordozó CFBE sejtekben (24/C. ábra). Ezek az eredmények

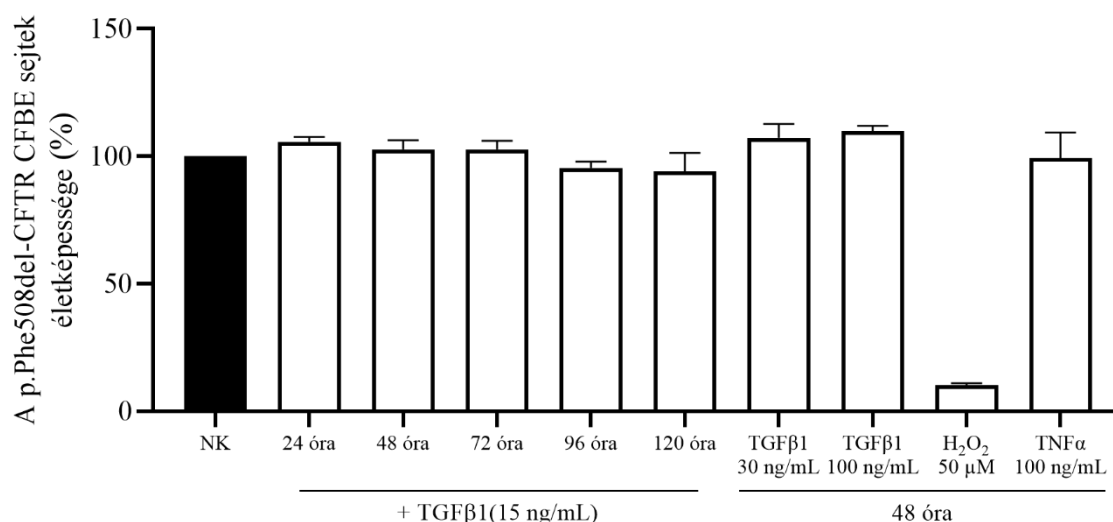
a légúti epithelium károsodására, valamint a mezenchimális jellemzők kialakulására utalnak a natív CF-es bronchiális epithelsejtekben.



24. ábra: A Vimentin (A), az IL1B (B) és a TWIST1 (C) mRNA expresszió mennyiségi meghatározása a *p.Phe508del*-CFTR-t, illetve wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben TGFβ1-kezelés mellett, ETI alkalmazásával vagy anélkül. Az mRNA kvantitatív analíziséhez RT-qPCR módszert alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formájában ábráztuk, n = 5–6 minta/kondíció. A két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-próbát alkalmaztunk.

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

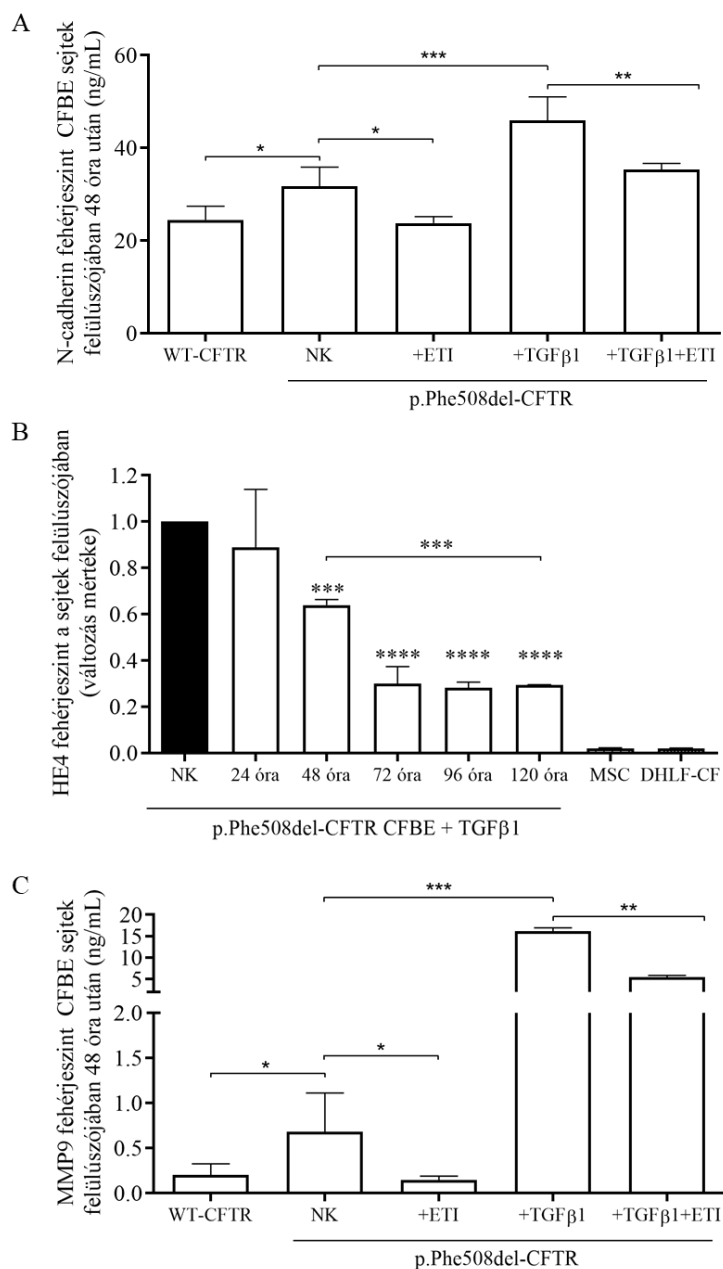
Ezt követően a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket ETI-vel kezeltük az EMT fenotípus visszaállítása céljából és fokozott E-cadherin-, valamint csökkent N-cadherin expressziót figyeltünk meg (22/A. ábra). Kíváncsiak voltunk továbbá arra, hogy a TGF β 1 képes-e tovább fokozni az EMT folyamatát a mutációt tartalmazó CF-es légúti epithelsejtekben. Elsőként MTT-assay segítségével megvizsgáltuk a sejtek életképességét különböző koncentrációjú és időtartamú TGF- β 1 kezelést követően, és nem figyeltünk meg citotoxikus hatást 15 ng/mL TGF- β 1 koncentráció mellett legfeljebb 120 órán keresztül, illetve még magasabb koncentráció esetén sem 48 óráig (25. ábra).



25. ábra: Sejt-életképességi vizsgálat TGF β 1 kezelt *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben. A sejtek életképességének meghatározása céljából a CFBE sejteket 0-120 órán át TGF β 1 kezelésnek tettük ki, majd MTT alapú assay-t végeztünk. Az eredményeket a nem kezelt sejtekhez viszonyított életképesség százalékában adtuk meg. Pozitív kontrollként H₂O₂-vel (50 μ M), negatív kontrollként pedig TNF- α -val (100 ng/mL) kezelt sejteket vizsgáltunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában ábrázoltuk, n = 5–6 minta/kondíció.

Ahogy vártuk, az IF vizsgálatok szerint a kezelés hatására tovább csökkent az E-cadherin expresszió, míg az N-cadherin és az MMP9 fehérjeszint tovább emelkedett a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a kezeletlen CF-es sejtekhez képest. Meglepő módon azonban a TGF β 1 kezelés csökkentette a HE4 expresszióját a *p.Phe508del*-CFTR CFBE

sejtekben a kiindulási szinthez viszonyítva (22/A-B. ábra; 23/C. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az indukált EMT CF-ben alacsonyabb HE4 expresszióval társulhat.



26. ábra: Az N-cadherin (A), HE4 (B) és MMP9 (C) fehérjeszintek elemzése CF-es epithelsejtek és nem epitheliális sejt kultúrák felülszójában. Az N-cadherin és MMP9 fehérjeszinteket ELISA módszerrel határoztuk meg wt-CFTR, valamint kezeletlen, ETI, TGFβ1 és TGFβ1+ETI kezelt *p.Phe508del-CFTR* CFBE sejtek esetében (A, C). A *p.Phe508del-CFTR* CFBE sejteket 24–120 órán át TGFβ1-gyel kezeltük a HE4 expresszió változásának vizsgálata céljából. Párhuzamosan pulmonális mezenchimális őssejtekben (MSC) és CF-ből származó humán tüdő eredetű fibroblasztokban (DHLF-CF) is elemeztünk HE4 expressziót (B). Az eredményeket átlag ± SEM formában ábrázoltuk n=5–6 minta/kondíció. Két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-tesztet, míg több csoport összehasonlítására Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk.

Annak igazolására, hogy ezek a TGF β 1 által kiváltott változások az EMT folyamatában visszafordíthatóak, CFTR modulátor kezelést alkalmaztunk *in vitro*. Ennek megfelelően a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket TGF β 1 és ETI együttes jelenlétében kezeltük 24 órán keresztül, majd újra megvizsgáltuk az EMT markerek expresszióját. Az IF vizsgálatok eredményei szerint az E-cadherin pozitivitás emelkedett és közelített a normál értékhez, míg az N-cadherin expressziója visszacsökkent a kiindulási szintre vagy az alá. Lényeges, hogy a HE4 és az MMP9 expressziója szignifikánsan csökkent, ami a CFTR funkció ETI általi helyreállítására utal (22/A ábra). Az EMT markerek expresszióját RT-qPCR-rel is elemeztük, amely megerősítette, hogy az N-cadherin, valamint a Vimentin és IL1B mRNS szintek visszatértek a kiindulási értékekhez (23/B ábra; 24. ábra).

Továbbá a HE4 és MMP9 mRNS-ek szintje jelentősen csökkent TGF β 1 és ETI együttes jelenlétében a csak TGF β 1 kezelthez képest (24/C-D. ábra). Az N-cadherint vizsgáltuk fehérje szinten is ELISA módszerrel és hasonló változásokat figyeltünk meg a fent említett különböző kezelések hatására (27/A. ábra). Ezek az eredmények megerősítik, hogy a TGF β 1 az elsődleges kiváltó tényező az EMT indukálásában a csökkenő HE4 szintek mellett, és közvetlen összefüggés van a CFTR működési zavara és az EMT kialakulása között a CF-ben.

Összefoglalva, eredményeink azt igazolják, hogy a TGF β 1 az EMT egyik fő indukáló tényezője, amely CF-ben HE4 szint csökkenéssel jár az EMT folyamatának progressziója során, továbbá a CFTR diszfunkció és az EMT kialakulása között közvetlen kapcsolat áll fenn.

5.4.3.A HE4 expresszió hiánya mezenchimális fenotípust mutató sejtes körülmények között

Mivel a HE4 expressziója a *p.Phe508del*-CFTR-t hordozó CFBE sejtekben már 24 órás TGF β 1 kezelés után csökkent, a sejteket ezt követően tartós TGF β 1 expozíciónak tettük ki annak érdekében, hogy a HE4 expresszió hosszú távú változásait nyomon kövessük. A kezelés hatására a HE4 szintje fokozatosan és szignifikánsan csökkent 48 és 120 óra között (26/B. ábra). Kontrollként mezenchimális eredetű sejtvonalakban is vizsgáltuk a HE4 jelenlétét, és egyikben sem volt kimutatható a fehérje: sem a pulmonális mezenchimális őssejtekben, sem pedig a humán CF-ből származó tüdő eredetű fibroblasztokban (26/B. ábra). Emellett az MMP9 fehérje szintjét is analizáltuk ELISA módszerrel a wt-CFTR és *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek felülúszójában, továbbá a mutáns sejtekben TGF β 1 kezelést követően ETI jelenlétében vagy annak hiányában. Összhangban az IF és RT-qPCR eredményekkel, az MMP9 koncentrációja magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek felülúszójában a wt-CFTR sejtekhez képest.

A TGF β 1 további MMP9 növekedést eredményezett 24 óra után a mutációt tartalmazó sejtekben, azonban ez a TGF β 1 indukált MMP9 expresszió ETI jelenlétében jelentősen csökkent (26/C. ábra).

Eredményeink arra utalnak, hogy a TGF β 1 tartós jelenléte következtében az előrehaladott EMT során megfigyelhető HE4 expresszió csökkenés összefüggést mutat a kifejezettebb mezenchimális fenotípus kialakulásával a CF-es epithelsejtekben, míg a HE4 fehérje eleve hiányzik a mezenchimális sejtípusokból, így például a CF fibroblasztokból.

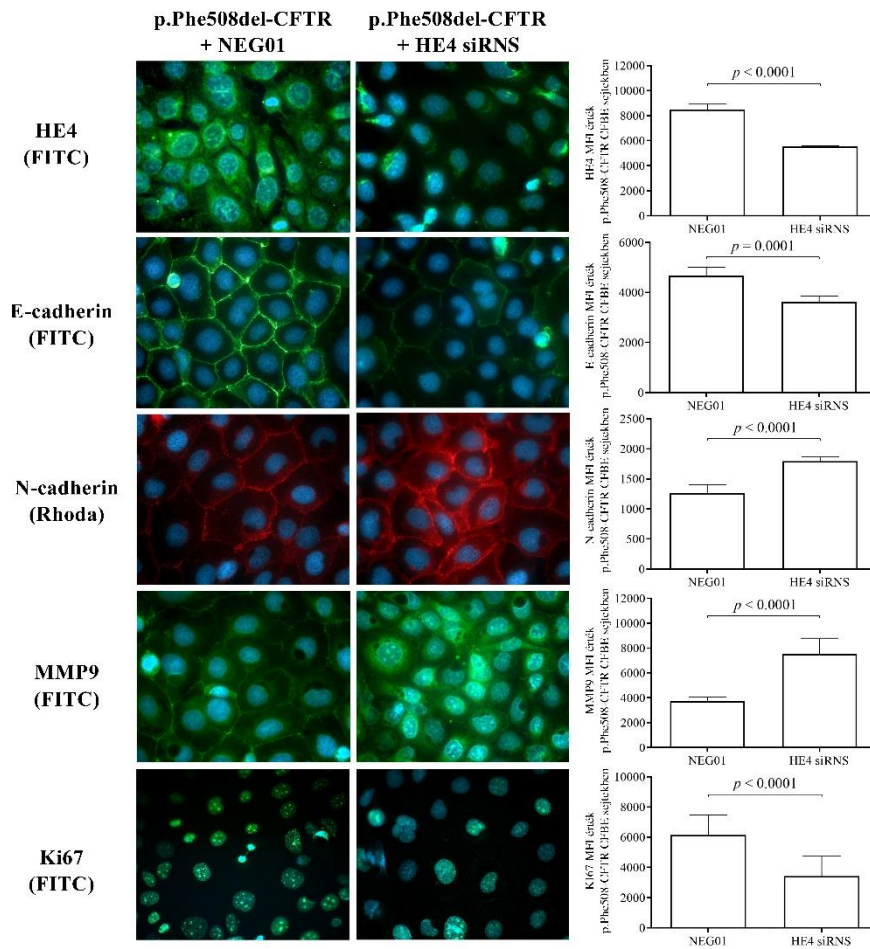
5.4.4. A HE4 csökkent expressziója hozzájárul az EMT kialakulásához, az MMP9 fokozott termelődéséhez és a csökkent sejtproliferációhoz

A HE4 fehérje kifejeződését géncsendesítéssel lecsökkentettük HE4 specifikus siRNS segítségével *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk a TGF β 1 által csökkentett HE4 szint hatásait az EMT-re CF-ben. A transzfekció hatására a sejtekben bekövetkező változásokat IF és RT-qPCR segítségével elemeztük az EMT markerek és az MMP9 megváltozott expressziója alapján a HE4 hiányában. 48 órával a HE4 siRNA kezelést követően a HE4 fehérje szintje jelentősen csökkent, és az mRNS szintje is alacsonyabb volt a mutációt tartalmazó CFBE sejtekben azokhoz a sejtekhez képest, amelyeket kontroll NEG-01 siRNS-sel kezeltünk, megerősítve ezzel a transzfekció hatékonyságát (27/A-B. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a normalizáláshoz kontroll génként alkalmazott *GAPDH* mRNS szintje nem változott (28/A. ábra).

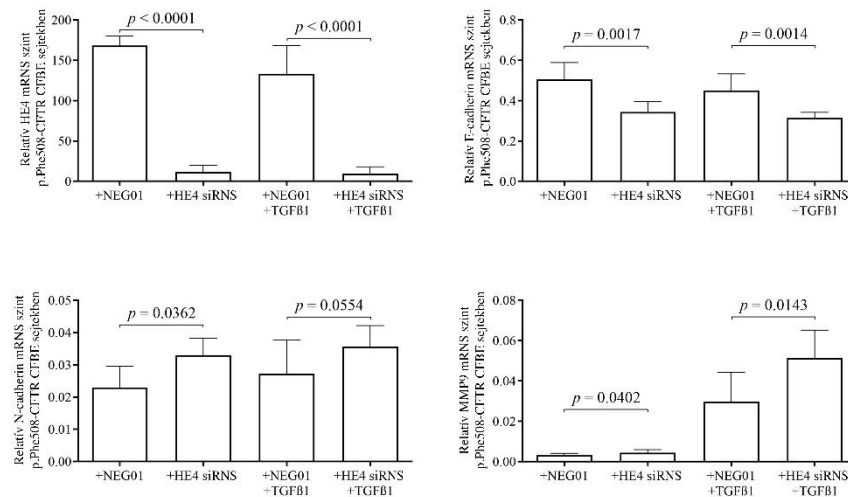
Az EMT kialakulását a HE4 expresszió csökkenés indukálta, amit az IF vizsgálat csökkent E-cadherin és fokozott N-cadherin és MMP9 pozitivitással igazolt (27/A. ábra). Továbbá elemeztük a csökkent HE4 expresszió hatását nem kezelt és TGF β 1 által stimulált sejtekben. Ennek érdekében HE4 siRNS-t és TGF β 1-et együttesen alkalmaztunk a *p.Phe508del*-CFTR CFBE 41o⁻ sejtekben, és az eredményeket a NEG-01 siRNS + TGF β 1 kezelést kapott sejtek adataival hasonlítottuk össze, valamint összevetettük a TGF β 1 stimuláció nélküli, HE4 siRNS-sel kezelt sejtek eredményeivel is. A vizsgált paraméterek mRNS szintű változásai a nem stimulált sejtekben megegyeztek a TGF β 1 kezelt mintákban tapasztaltakkal (27/B. ábra).

Ezen eredmények alapján úgy véljük, hogy a HE4 csökkent expressziója a CFBE sejtekben kulcsfontosságú szerepet tölt be az EMT folyamatában, valamint az MMP9 fehérje expresszió emelkedése jelentősebb, ha ez a csökkenés TGF β 1 kezeléssel is társul (28/B. ábra).

A



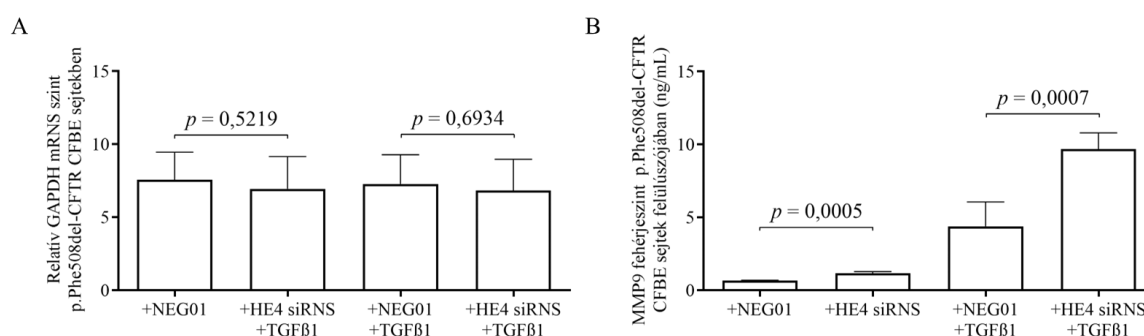
B



27. ábra: Az siRNA transzekcióval lecsökkentett HE4 expresszió hatása az EMT-re és az MMP9 expresszióra. Az EMT biomarkerek szintjét immunfluoreszcens (IF) festéssel (A) és RT-qPCR vizsgálattal (B) elemeztük. A transzekció hatékonyságát a HE4 mRNA szintjének vizsgálatával követtük nyomon, míg az MMP9 fehérjeszintjét a HE4 expresszió hiányában mértük (B). Az

eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk, $n=4-5$ minta/kondíció. Két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-tesztet alkalmaztunk.

Végül a csökkent HE4 expresszió indukálta EMT során a sejtproliferáció mértékét Ki67 pozitivitás alapján értékeltük, amely szignifikánsan csökkent a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben HE4 siRNS kezelés után a NEG-01 siRNS-sel kezelt kontroll sejtekhez képest (27/A. ábra), ami arra utal, hogy az EMT állapot a sejtproliferáció csökkenésével jár együtt.



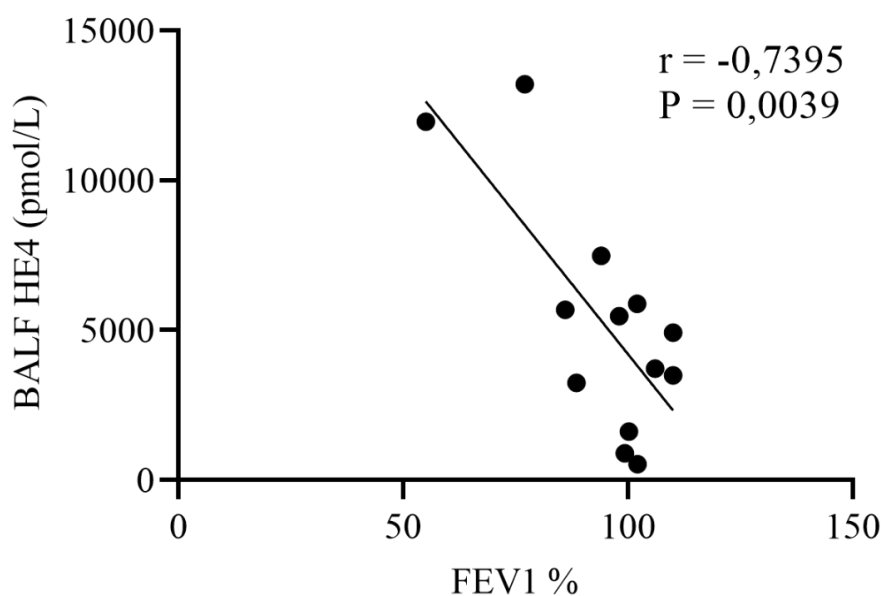
28. ábra: A kontroll génként alkalmazott *GAPDH* mRNA (A), valamint az MMP9 fehérje mennyiségi meghatározása a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben HE4 siRNS transzfekciót követően, TGFβ1 jelenlétében vagy hiányában. Az mRNA expresszió meghatározására RT-qPCR vizsgálatot végeztünk. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk, $n=4-5$ minta/kondíció. Két csoport összehasonlítására Mann–Whitney U-tesztet alkalmaztunk.

5.5. A CF-es légúti körülmények vizsgálata *ex vivo* CF-es BAL mintákban és annak hatása az EMT folyamatára *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben *in vitro*

A plazma és szérum HE4 vizsgálataink során kapott eddigi eredményeink alapján kíváncsiak voltunk, hogy vajon a CF-es betegek BAL mintáiban a HE4, mint potenciális biomarker milyen összefüggést mutat a légzésfunkció állapotával CF-es betegek esetén. Továbbá vizsgálni kívántuk a CF-re jellemző komplex légúti környezet hatását az EMT folyamatának kialakulásában és a gyulladásos folyamatokban játszott szerepét CF-es légúti epithelsejtekben *in vitro*.

5.5.1. A BAL HE4 koncentráció és a légzésfunkció közti korreláció vizsgálata CF-ben

A BAL minta alkalmas lehet különböző gyulladásos biomarkerek vizsgálatára CF-ben, mivel közvetlenül az alsó légutakból származik, így pontosan tükrözi a lokális gyulladásos, proteolitikus és szöveti remodelling folyamatokat. Ezáltal a BAL minták ideálisak lehetnek olyan lokális biomarkerek azonosítására és validálására, amelyek a betegség progresszióját és a terápiás válaszokat is tükrözhetik. A légzésfunkció vizsgálatára gyakran alkalmazott paraméter a FEV1, melyet CF-es betegekben rendszeresen mérnek a kontroll vizsgálatok alkalmával. Kíváncsiak voltunk, hogy a CF-es betegek BAL mintáinak HE4 koncentrációja összefüggésbe hozható-e a légzésfunkció állapotával, ahogyan a plazma és szérum mintákban is megfigyeltük. Ezért összegyűjtöttük 13 CF-es beteg BAL mintáját (4. táblázat), akiknek rendelkezésünkre álltak a FEV1 értékei. Meghatároztuk a HE4 szinteket a betegek BAL mintáiban, amelyek szignifikáns korrelációt mutattak a FEV1 értékekkel (29. ábra).

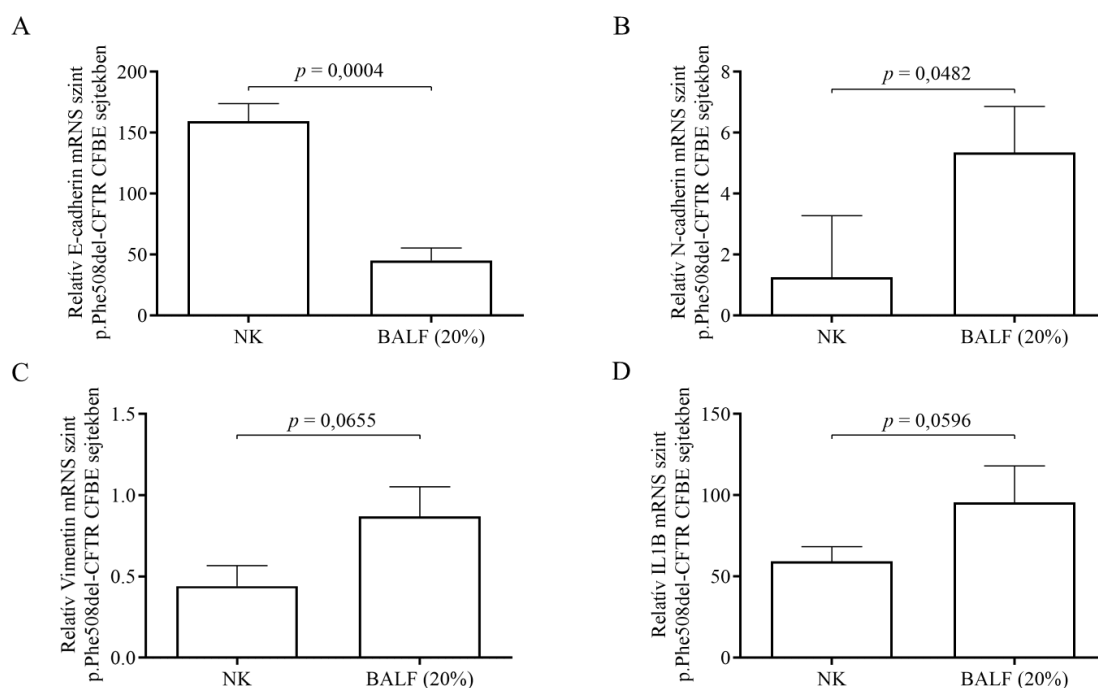


29. ábra: CF-es betegek BAL HE4 koncentrációja és a FEV1 értékek közötti korreláció vizsgálata.

Összegyűjtöttük 13 CF-es beteg BAL mintáit, melyekben meghatároztuk a HE4 koncentrációt és megvizsgáltuk az összefüggést a fehérje szintek és betegek FEV1 értékei között. A korrelációs analízist Spearman-korrelációs teszttel végeztük.

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

Végezetül a CF-es légúti körülmények bronchiális epithelsejtekre gyakorolt komplex hatását szeretnénk volna megvizsgálni *in vitro* körülmények között CF-es betegek BAL mintáit felhasználva kezelőanyagként. A BAL minta alkalmazása különösen alkalmas a CF-es légúti környezet modellezésére, mivel közvetlenül a tüdő alsó részéből származik, így hűen tükrözi a betegségre jellemző gyulladásos és mikrobiális miliőt. A CF-es BAL folyadék magas koncentrációban tartalmaz gyulladásos citokineket (pl. IL-8), proteázokat (pl. NE, MMP-k), valamint bakteriális komponenseket, amelyek kulcsszerepet játszanak a légúti epithelsejtek működésének és fenotípusának megváltozásában, beleértve az EMT folyamatát is. Ezáltal a BAL minták alkalmazása lehetővé teszi a komplex *in vivo* környezet modellezését *in vitro* CFBE sejt kultúrákon, különösen a *p.Phe508del*-CFTR mutáció esetén, amely a leggyakoribb a betegségben.^{130, 131}



30. ábra: Az EMT markerek és az IL1B mRNS szintű változásai BAL kezelés hatására a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben. A CF-es légúti miliő EMT folyamatára gyakorolt hatásának vizsgálata céljából CF-es betegekből származó BAL mintákkal 20%-os arányban kezeltük a mutációt tartalmazó légúti epithelsejteket 48 óráig. Az EMT markerek közül az E-cadherin (A), N-cadherin (B) és Vimentin (C), gyulladásos markerként pedig az IL-1 β (D) mRNS-ek expressziós változásait vizsgáltuk. A két csoport összehasonlítására t-próbát használtuk.

Ennek érdekében az összegyűjtött 13 CF-es beteg BAL mintáiból (4. táblázat) készítettünk egy mintapoolt, majd a sejtekhez adtuk 20%-os arányban és 48 órán keresztül inkubáltuk. Az EMT markerek, az IL-1 β , valamint a HE4 fehérje expressziós változásait kívántuk analizálni annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, vajon a betegektől származó BAL mintákkal modellezett CF-es légúti környezet hozzájárul-e az EMT kialakulásához a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben. A korábbi TGF β 1 kezelés hatására bekövetkező változásokhoz hasonló tendenciákat tapasztaltunk az EMT markerek és az IL-1 β mRNS szintek esetében is. A BAL kezelés hatására az E-cadherin (30/A. ábra) expresszió szignifikánsan csökkent, az N-cadherin (30/B. ábra) pedig nőtt, csakúgy, mint a Vimentin (30/C. ábra), habár az utóbbi esetén az emelkedés nem volt szignifikáns, a tendencia megmutatkozott. Az IL-1 β (30/D. ábra) szint is jelentős emelkedést mutatott a kezelés hatására.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy előzetes vizsgálataink alapján a CF-re jellemző komplex légúti milió hozzájárulhat az EMT kialakulásához és a gyulladásos folyamatok elindulásához a tüdőben, illetve a HE4, mint potenciális biomarker, jól korrelál a légzésfunkció állapotával BAL mintákban CF-es betegek esetén.

6. Megbeszélés

A CF patomechanizmusának középpontjában a CFTR ioncsatorna működési zavara áll, amely a neutrophil granulocyták által mediált, és általában valamilyen bakteriális infekció által kiváltott légúti gyulladást és strukturális változásokat indukál a légutakban. Ezek alapján kézenfekvőnek tűnik a gyulladásos biomarkerek meghatározása különböző testváladékokból a betegség aktivitásának követése céljából. Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányult olyan keringő biomarkerek azonosítására, amelyek képesek tükrözni a betegség aktivitását és a terápiás válaszokat. Jelenlegi és korábbi vizsgálataink középpontjában a HE4 fehérje áll, mint megbízható, nem invazív, standardizált és vérből mérhető potenciális biomarker CF-ben a CFTRm terápiák monitorozására. Ez az immunkémiai vizsgálat széles körben elérhető a legtöbb rutin klinikai laboratóriumban, mivel rutinszerűen mérik petefészekrákban tumor markerként,^{129, 132} illetve szintje nemcsak malignitásokban emelkedett, hanem egyéb nem daganatos betegségekben is, például krónikus veseelégtelenségben,¹³³ vagy tüdőtuberculosisban is.¹³⁴ Ennek megfelelően ez a viszonylag olcsó teszt könnyen elvégezhető a még mindig nagyon költséges CFTR modulátor gyógyszerekkel kezelt betegek kontroll vizsgálataival alkalmával a mindennapi gyakorlatban.

Munkánk során elsőként sikerült bizonyítékot találnunk a plazma és szérum HE4 szint és a tüdőfunkció javulása - különösen a delta ppFEV1 - közötti összefüggésre a LUM/IVA (Orkambi®) kezelés, valamint ELX/TEZ/IVA (Kaftrio®) hármas CFTR modulátorral történő kezelést követően CF-ben szenvedő betegek esetében. Korábban már vizsgálták ezeknek a terápiás kombinációknak a klinikai előnyeit, nagyrészt a ppFEV1-gyel, a BMI értékekkel, légúti és bélhámsejteken végzett CFTR funkcionális tesztekkel és a verejtékklorid koncentráció monitorozásával 2–5 éves¹³⁵ és 6–11 éves¹³⁶ gyermekeknél, továbbá 12 éves vagy idősebb serdülőknél és felnőtteknél^{24, 137, 138, 139, 140, 141, 142}, illetve mindkét korcsoport kombinált vizsgálatában.^{22, 143, 121} Fontos azonban megjegyezni, hogy ezeknek a funkcionális és laboratóriumi paramétereknek önmagukban meg vannak a korlátaik a CFTR modulátorok monitorozása szempontjából. Például a ppFEV1 diszkrimináló képessége korlátozott lehet azoknál a betegeknél, akik már mérsékelt vagy közel normális tüdőfunkcióval rendelkeznek.²⁹ Továbbá jelentős variabilitást figyeltek meg a ppFEV1-ben az életkor és a populációk közötti referenciaértékek eltéréseinek vonatkozásában, valamint a megbízható spirometriai vizsgálat kivitelezése is technikai kihívást jelenthet, különösen fiatalabb CF-es betegek esetében.²⁹ A verejtékklorid mérését a klinikai vizsgálatokban általában másodlagos végpontnak tekintik. A verejtékklorid szintjében bekövetkező jelentős csökkenést már a LUM/IVA kezelés 15. napján

leírtak, amely 24 hétig fennmaradt^{141, 142}. Azonban korlátozott összefüggést írtak le az abszolút vagy relatív változások között a verejtékklorid koncentrációban és a ppFEV1-ben, annak ellenére, hogy a tüdőfunkció egyértelmű javulást mutatott 1–6 hónappal a LUM/IVA terápiát követően.^{121, 144} Ugyanakkor a verejték vezetőképesség vizsgálatának standardizálása továbbra is kihívást jelent¹⁴⁵. Mindezek tükrében továbbra is fennáll az igény más, könnyebben hozzáférhető és robusztusabb biomarkerekre, lehetőleg perifériás vérből, amelyek hatékonyabban képesek nyomon követni a kezelésre adott választ a klinikai gyakorlatban.^{28, 146} Néhány perifériás vérben vizsgálható biomarkert már kutattak e célból, például a plazma C-reaktív proteint (CRP), amely 2 hónap IVA kezelés után csökkent, és összefüggést mutatott az verejtékklorid koncentrációval.¹⁴⁶ Az interleukin-18 (IL-18) és a tumornekrózis faktor- α (TNF- α) szérumszintjeinek jelentős, fokozatos csökkenését is kimutatták 1–3 hónap LUM/IVA kezelést követően, míg az IL-1 β szintje csak a TEZ/IVA kezelés után csökkent.¹⁴⁷ Nemrégiben a neutrophil szám, a fibrinogén és a CRP, valamint más citokinek, például a GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-12p70, IL-17A és TNF- α , szignifikáns csökkenését írták le Kaftrio[®] terápia alatt 12 hónapos követés során. Ezen kívül szignifikáns kapcsolatot mutattak ki ezek között a gyulladásos biomarkerek és a ppFEV1, BMI, valamint a verejtékklorid szintek között.¹⁴⁸ Hasonlóképpen, egy másik kutatócsoport kimutatta, hogy az ELX/TEZ/IVA csökkentette a neutrophilek számát, valamint érettebb, kevésbé gyulladáskeltő fenotípusú sejtek jelenlétét eredményezte, továbbá egy immunválaszt lecsendesítő állapot irányába történő eltolódást figyeltek meg, amely együtt járt a CD206 expressziójának növekedésével.¹⁴⁹ A hármas kombináció jótékony hatással van még a májfunkcióra és a tápanyagfelszívódásra is, javítva a koleszterin- és albuminszinteket 1 éves terápia után.¹⁵⁰

Az elmúlt években kutatócsoportunk igazolta, hogy a plazma/szérum HE4 koncentráció vizsgálata hasznos lehet a CF tüdőbetegség súlyosságának felmérésére cseh és magyar populációkban a CFTR modulátor kezelés megkezdése előtt.⁶⁸ Fontos, hogy a HE4 koncentráció és a CF tüdőbetegség súlyossága közötti pozitív korreláció független volt a betegek életkorától.⁶⁸ Ugyanakkor a betegek életkora, a dohányzás és a csökkent vesefunkció a HE4 szintet befolyásolhatja nem CF-es populációban.¹⁵¹ Ezt követően hatékonyan alkalmaztuk a tüdőfunkció változásainak nyomon követésére az IVA hatékonyságának vizsgálatok három egymástól független betegcsoportban^{69, 152}, valamint LUM/IVA kezelésben részesülő betegeknél.¹⁵²

Korábbi eredmények szerint a CFTR diszfunkció hozzájárulhat az abnormális HE4 expresszióhoz az NF- κ B útvonal aktiválásán keresztül. Továbbá LUM/IVA kezelés hatását is

vizsgáltuk a HE4 expressziójára a *p.Phe508del*-CFTR CFBE 41o sejtekben, ezáltal igazolva a fent említett proinflammatorikus útvonal lecsökkent aktivitását.⁷⁰ Mindazonáltal eddig még nem vizsgálták nagy betegszámú CF kohorszban a plazma/szérum HE4 koncentrációk *in vivo* alakulását LUM/IVA, valamint ELX/TEZ/IVA kezelés mellett a terápiás hatás értékelésére. Noha ezen CFTR modulátorok bevezetése nagy mértékű javulást eredményezett a légzésfunkcióban és az életminőségben - legfőképpen a hármas kombináció (ELX/TEZ/IVA) alkalmazása -, valamint csökkentette a tüdőtranszplantáció szükségességét is,¹⁵³ a CFTRm kezelés hatékonyságának rendszeres nyomon követése a mindennapi klinikai gyakorlatban továbbra is indokolt.

Ebben a vizsgálatban gondosan kiválasztott plazma és szérum mintákban elemeztünk a HE4 koncentrációját olyan CF-es betegcsoportokban, akik homozigóták a *p.Phe508del*-CFTR variánsra. A minták egy része a korábban a PROSPECT studyban részt vevő betegektől¹²⁰, másik része pedig különböző hazai és cseh intézmények CF-es betegeitől származik. Összesen 68 CF-t vontunk be a PROSPECT studyból, akik az átlagos ppFEV1-ben mérsékelt változást mutattak (2,6%) a kiindulási értékhez képest a LUM/IVA kezelés 6. hónapjára, szemben az egész vizsgálati populáció eredményeivel, ahol Sagel és munkatársai nem detektáltak jelentős változást (-0,2%) 6 hónap alatt.¹²¹ Továbbá 80 Kaftrio® kezelésben részesült beteg került bevonásra két független kohorszban. A betegek jelentős átlagos ppFEV1 változást mutattak (17,5%, illetve 4,0%) a kiindulási értékhez képest a terápia 3–6 hónapja során, ami összhangban áll más vizsgálati populációk eredményeivel is, amelyek szignifikáns átlagos ppFEV1 javulást igazoltak gyermekekben (11%)¹³⁶ és serdülőkben (14,3%) a 24. hétre.²⁴ A LUM/IVA kezelés hatására a HE4 koncentráció már az első kontroll vizsgálatkor szignifikánsan alacsonyabb volt, és ez a vizsgálati periódus végéig fennmaradt. A plazma HE4 változásai a legnagyobb delta érték mellett (-10,7 mmol/L) mutatták a legalacsonyabb abszolút HE4 szintet (61,5 [47,0–79,7] pmol/L) a 6. hónapra, ami közelítette, de nem érte el a HE4 referenciaértékét (36,3 [31,1–43,4] pmol/L), amelyet korábban egy másik tanulmányban határoztak meg.⁶⁸ Ezt a megfigyelést alátámasztották *in vitro* kísérleteink a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE 41o- sejtekben⁷⁰, ahol a LUM/IVA kezelés szignifikánsan csökkentette a HE4 expressziót a kezeletlen sejtekhez képest, de a HE4 szintek összességében nem normalizálódtak. Mindez azt mutatja, hogy a HE4 nem éri el a normál (vad típusra jellemző) szinteket CF-ben, még a CFTR funkció javulása mellett sem az LUM/IVA alkalmazását követően. Ugyanakkor a HE4 szintek átlagos változása a kiindulási értékhez képest korrelált a delta ppFEV1 értékkel az összes vizsgálati résztvevőnél. Amikor pedig ezt az összefüggést külön elemeztük a 18 év alatti CF-betegek

körében, erősebb korrelációt találtunk a fiatalabbaknál. Továbbá a plazma HE4 átlagos változását a kiindulási ppFEV1 kategóriák alapján is értékeltük. A legnagyobb átlagos különbséget a HE4 esetén azoknál a betegeknél mértük, akiknél a tüdőfunkció súlyosan károsodott ($< 50\%$) az LUM/IVA kezelés megkezdése előtt, míg a legkevésbé jelentős változásokat azoknál figyeltünk meg, akiknél a kiindulási ppFEV1 $\geq 90\%$ volt. Ezek a megfigyelések azért nem ellentmondóak, mert bár a kiindulási ppFEV1 nem különbözött a felnőtt és gyermek CF-betegek között, a gyermekeknél magasabb átlagos delta ppFEV1 érték alakult ki (3,7%) a felnőttekhez képest (1,1%) a 6. hónapra, a válaszadók aránya is magasabb volt (1. táblázat). Ennek következtében, a plazma HE4 és a ppFEV1 közötti erős korreláció miatt, a HE4 biomarker jobb diszkrimináló képességet mutatott a gyermekeknél. Másrészt, életkortól függetlenül, azok a résztvevők, akiknél a kezelés előtti tüdőfunkció rosszabb volt, jelentősebb javulást mutattak a CFTR modulátor terápia 6. hónapjára, ami a HE4 plazma szint nagyobb változását eredményezte. A PROSPECT studyban az életkor és a kiindulási légzésfunkció szerinti felosztás ugyanezt igazolta: a jelentős ppFEV1 javulás csak serdülőknél és fiatal felnőtteknél volt megfigyelhető a LUM/IVA kezelés utáni 3. hónapban, valamint azoknál, akiknél a kiindulási ppFEV1 50–89% között volt a 3. és 6. hónapban.^{120, 121, 144}

A második klinikai vizsgálatunk 1. kohorszába beválogatott CF-es betegek esetén ELX/TEZ/IVA kezelés hatására a szérum HE4 koncentráció szintén jelentős csökkenést mutatott a kiindulási értékhez képest 3 hónap kezelést követően, a HE4 átlagos változása $-45,7$ pmol/L volt. A 2. kohorsz ELX/TEZ/IVA terápiában részesülő betegei ennél kisebb mértékű, $-20,7$ pmol/L átlagos delta értéket mutattak. Ezzel párhuzamosan az LUM/IVA terápia alatt álló betegek szérum HE4 értékei szintén csökkentek ($-18,5$ pmol/L átlagos változás), ugyanakkor minden követéses időpontban szignifikánsan alacsonyabb HE4 szintek voltak mérhetőek az ELX/TEZ/IVA kezelt csoportban a LUM/IVA kezelt csoporthoz képest, mely csupán mérsékelt légzésfunkció javulást mutatott ($+1,6\%$). Ez összhangban van egy korábbi vizsgálattal, amelyben a LUM/IVA kezelés mellett a *p.Phe508del*-CFTR variánssal rendelkező betegek átlagos ppFEV1 javulása mindössze $+2,5\%$ volt.¹²¹

Korábban az IVA monoterápia (Kalydeco®) nagyobb mértékű HE4 csökkenést eredményezett ($-14,4$ pmol/L vs. $-10,7$ pmol/L) olyan CF-es betegekben, akik legalább egy *p.Gly551Asp*-CFTR variánst hordoztak transz helyzetben (III. osztályú CFTR variáns). Ezen betegek körében a ppFEV1 átlagos változása is magasabb volt (7,0%) 6 hónap után a GOAL studyban⁶⁹, mint a PROSPECT study résztvevőinél, akik a II. osztályú *p.Phe508del* variánst hordozták, és csupán 2,6%-os javulást mutattak.¹⁵² Mindezek az adatok összhangban állnak az

eredeti hipotézisünkkel, miszerint a plazma HE4 érzékenyen követi még a kis mértékű tüdőfunkció javulást is CF-es betegeknél, akik CFTR modulátor kezelésben részesülnek. Továbbá elmondhatjuk, hogy a ELX/TEZ/IVA jelentősebb terápiás hatása az LUM/IVA kezeléssel összehasonlítva jól nyomon követhető volt a plazma és szérum HE4 koncentráció segítségével. A delta és az abszolút HE4 szintek jól korreláltak a delta és az abszolút ppFEV1 értékekkel, és minden kohorszban szignifikáns, fordított irányú összefüggést figyeltünk meg a HE4 és a ppFEV1 között.

Nemrég Schmidt és munkatársai szintén vizsgálták a HE4-et és az MMP9-et az ETI kezelés monitorozására, és mindkét marker szintje szignifikánsan csökkent 6 hónap kezelés után.¹⁵⁴ Hasonlóképpen, egy kisebb Trikafta® kezelt CF-es csoportban az MMP9 plazma szintje, amelyet az NF- κ B útvonal közvetít a keringő mononukleáris sejtek által, szintén csökkenést mutatott a reszponder csoportba, míg a nem reszponder csoportban az MMP9 szintje tartósan magas maradt. Ez arra utal, hogy az MMP9 esetleg további potenciális biomarkerként szolgálhat a terápiás válasz megítélésére.¹⁵⁵

A plazma és szérum HE4 átlagos változásának diszkriminációs “erejét” ROC analízissel határoztuk meg különböző mértékű tüdőfunkció javulás esetén LUM/IVA kezelésnél (2,6% és 5%-os javulás a kezelés 6. hónapjában), illetve ELX/TEZ/IVA esetén (4%-os javulás a kezelés 3–6 hónapjában). LUM/IVA kezelésnél a delta HE4 esetében az AUC érték (0,9139) jelentős volt az összes CF-es betegnél. Különösen a gyermekeknél volt kifejezettebb, magas szenzitivitással (80%) és specificitással (83%). ELX/TEZ/IVA kezelés esetén a HE4 átlagos változása szintén jelentős AUC értéket mutatott mind az 1. kohorszban (0,765), mind a 2. kohorszban (0,789) ETI kezelés alatt, és életkor szerinti bontásban gyermekeknél (0,791) és felnőtteknél (0,788) egyaránt. Amikor a delta ppFEV1 5%-át vettük határértéknek, az AUC érték 0,6786 volt az összes betegnél, míg gyermekeknél ismét magasabb volt (0,7913).¹⁵² Nemrégiben hasonló AUC értéket (0,806) találtak a delta HE4 kapcsán, különösen 1–2 hónap kezelés után, 81% szenzitivitással és 89% specificitással.⁶⁹ A kezelésre jól reagáló reszponder betegeket ($\geq 5\%$) és a nem reszponder betegeket ($< 5\%$) az átlagos ppFEV1 változás alapján csoportosítottuk a kezelés 6. hónapjában. A kezelés előtti HE4 értékekhez viszonyítva a statisztikailag jelentősen csökkent plazma HE4 szintek csak a reszponder csoportban voltak megfigyelhetők.

Logisztikus regressziós elemzést végeztünk annak értékelésére, hogy milyen tényezők befolyásolják a reszponder státuszt. A delta HE4 és a kiindulási ppFEV1 független változóként kapcsolódott a reszponder csoporthoz a ppFEV1 változás tekintetében ($\geq 5\%$) a nem

reszponderekhez képest. Hasonlóképpen, a kiindulási változók (életkor, nem, verejtékklorid koncentráció, BMI) nem voltak statisztikailag összefüggésben a kezelésre adott válasz mértékével.¹²¹ Korábbi tanulmányunkban szintén szignifikáns, független kapcsolatot mutattunk ki a delta ppFEV1 és a delta HE4 között CF-es betegeknél, akik IVA kezelést kaptak.⁶⁹

A HE4 szintjét leginkább a beszűkült vesefunkció tudja fals módon növelni, ezt munkacsoportunk korábban más betegcsoportban levizsgálta.¹³³ Ennek elkerülése érdekében a vizsgálatba bevont CF-es betegeknek bekértük a szérum kreatinin szintjét, és sem önmagában, sem a kezelés hatására nem alakult ki csökkent vesefunkció a betegekben, ami befolyásolhatta volna a HE4 koncentrációkat.

A teljesség kedvéért meg kell említeni, hogy a CF klinikai állapotának értékelése napjainkban nem korlátozódik kizárólag a légzésfunkciós paraméterek vagy a laboratóriumi biomarkerek vizsgálatára. Az állapot komplex megítéléséhez fontos klinikai végpontnak tekinthető a pulmonális exacerbációk gyakorisága, mivel azok ismétlődése gyorsabb tüdőfunkció-romlással, gyakoribb kórházi kezeléssel és kedvezőtlenebb hosszú távú prognózissal jár.¹⁵⁶ Az exacerbációk számának csökkenése ezért a terápiás hatékonyság egyik legfontosabb indikátora. Emellett a betegek életminőségének értékelése – például a Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised (CFQ-R) segítségével – egyre nagyobb jelentőséggel bír, mivel közvetlen információt nyújt a tünetek, a fizikai aktivitás és a mindennapi élet változásairól, amelyek nem mindig tükröződnek a hagyományos klinikai paraméterekben.¹⁵⁷ A mellkas nagyfelbontású CT-vizsgálata szintén érzékeny módszer a strukturális tüdőkárosodás nyomon követésére, és a bronchiectasiák, a nyáktretenció vagy a légcsapdázás változásainak értékelésével a betegség progressziójáról is pontos képet adhat.¹⁵⁸ Ezen klinikai végpontok együttes értékelése a laboratóriumi és funkcionális vizsgálatokkal együtt átfogóbb és pontosabb képet nyújthat a CF-ben szenvedő betegek állapotáról, valamint a terápiás beavatkozások valódi klinikai hatásáról. A jövőben a HE4 szint változás és ezen klinikai paraméterek közötti összefüggések vizsgálatára is érdemes lesz fókuszálni.

A CFTR funkció helyreállítását teljes sejtes patch-clamp technikával igazoltuk *in vitro*, összhangban korábbi közleményekkel.⁷⁰ Eredményeink alapján a *p.Phe508del*-CFTR funkcióját helyreállítottak tekintettük, mivel Boinot és munkacsoportja szerint, ha a kezelés után a mérhető áram sűrűség meghaladja a 4 pA/pF küszöbértéket, akkor a CFTR aktivitás korrigáltnak tekinthető.¹²⁶ Ennek megfelelően mind az ELX/TEZ/IVA, mind a LUM/IVA kombináció szignifikánsan csökkentette a HE4 értékeket. Fontos, hogy az ELX/TEZ/IVA nagyobb mértékű változást okozott mind a Cl⁻ áramokban, mind a HE4 koncentrációban, mint

a LUM/IVA. Ezt megerősítették korábbi *in vitro* kísérleteink is a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE 41o sejtekben, ahol mind TEZ/IVA, mind LUM/IVA kezelés szignifikánsan csökkentette a HE4 expressziót a kezeletlen sejtekhez képest, ugyanakkor a HE4 szintje összességében nem normalizálódott^{70, 153}. Mindezek alátámasztják, hogy a HE4 koncentráció nem éri el a normál szintet CF-ben, még akkor sem, ha CFTR funkció javulása figyelhető meg CFTRm kezelés hatására. Ez összhangban áll azzal, hogy CFTR modulátorok csak részlegesen képesek korrigálni a *p.Phe508del*-CFTR működését: vizsgálatok szerint az ELX/TEZ/IVA terápia az orr- és bélhám CFTR funkcióját csupán ~40–50%-ban állítja helyre az egészséges referencia értékhez képest.^{139, 159, 160} Összességében az ELX/TEZ/IVA nagyobb mértékű HE4 csökkenést idézett elő *in vitro* sejt kultúrákban, amely jól korrelált az *ex vivo* mintákban mért szérumszintekkel.

Klinikai vizsgálatainkat, melyek főként véralapú mintákat céloztak meg, kiegészítettük a betegektől nem invazív módon nyerhető köpetminták analízisével. A vizsgált betegekben a mintavételt követően különböző súlyosságú exacerbáció (enyhe, közepes és súlyos) lépett fel, amelynek hatására gyulladásos mediátorok szabadulnak fel a légutakban. CF-es betegekben a köpetminta vizsgálata esetén a legfőbb nehézséget az jelenti, hogy kisgyermekekben nem nyerhető alsó légúti köpetminta a megfelelő együttműködés hiányában. Ezen felül a vérből történő vizsgálatokkal összehasonlítva kevésbé reprodukálhatóak az eredmények, mivel a minta a tüdő különböző részeiből származhat, ahol eltérő lehet a gyulladás mértéke. A CF-es betegek köpetében többek között ezért mutatnak nagy intra- és interindividuais variabilitást a gyulladásos citokinek.¹⁶¹ Korábbi vizsgálatokban a szérumszint IL-1 β , MPO, CRP⁵⁰, a plazmaszint IL-8¹⁶² ugyan előre jelezte az akut pulmonális exacerbációt, de csak rövid távon, így mi kíváncsiak voltunk, hogy vajon a CF-ben gyakran előforduló pulmonális exacerbáció előrejelzésére esetleg alkalmas lehet-e a köpet HE4 vizsgálata. Eredményeink alapján azt találtuk, hogy a köpet HE4 koncentráció szignifikánsan megemelkedett a súlyos exacerbációt mutató CF-es betegeknél az enyhe, illetve közepes mértékű exacerbációhoz képest, ugyanakkor az utóbbi két csoport között nem találtunk jelentős különbséget. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a köpetben mért HE4 szint jól korrelál a pulmonális exacerbáció súlyosságával CF-ben. A gyulladás egyik legérzékenyebb biomarkere CF-ben az aktivált neutrophil granulocyták által termelt neutrophil elasztáz (NE), mely szignifikáns korrelációt mutatott a köpet HE4 szintekkel, illetve a szintén gyulladásos marker, az IL-1 β eredmények még jelentősebb összefüggést mutattak a HE4 koncentrációkkal. A legjelentősebb korrelációt pedig másik két gyulladásos marker, a neutrophil granulocyták által termelt MPO, valamint az extracelluláris mátrixot bontó enzim, a

MMP9 mutatta, amely szintén a neutrophil granulocytákból és makrofágokból szabadul fel gyulladásos folyamatok során. CF-ben az MMP9 szintje gyakran emelkedett a légutakban, és hozzájárul a szöveti károsodáshoz és átépüléshez.

A plazma, szérum és köpetmintákon túl 13 CF-es beteg BAL mintájában is megvizsgáltuk, hogy vajon van-e összefüggés a HE4 és a tüdőkapacitás állapota között. Ezeknek a betegeknek rendelkezésünkre álltak a FEV1 értékei. Meghatároztuk a HE4 szinteket a betegek BAL mintáiban, amelyek szignifikáns korrelációt mutattak a FEV1 értékekkel.

Összefoglalva, a plazma és szérum HE4 szint negatív korrelációt mutat a tüdőfunkció javulásával, és jobban tükrözi a gyógyszeres kezelés hatékonyságát CF-es betegekben ELX/TEZ/IVA kezelés alatt, mint LUM/IVA esetén. Eredményeink alapján javasoljuk, hogy a CF tüdőbetegséget LUM/IVA kezelés esetén a plazma HE4 abszolút és delta értékeinek vizsgálatával érdemes lehet monitorozni, amelyek fordítottan korrelálnak az abszolút és delta FEV1 értékekkel, különösen CF gyermekeknél és serdülőknél. Összességében a HE4 plazmaszint folyamatos mérése előre meghatározott időpontokban megkönnyítheti a CFTR modulátor kezelés hatékonyságának monitorozását a rutinszerű klinikai gyakorlatban. Emellett az ETI jelentősebb mértékben csökkentette a HE4 expressziót CFBE sejt kultúrákban *in vitro*, mint a LUM/IVA, ami összhangban áll az *ex vivo* CF mintákban megfigyelt, CFTRm hatására bekövetkező szérum HE4 szint változásokkal. Elmondhatjuk továbbá, hogy a köpet HE4 koncentráció korrelál a pulmonális exacerbáció súlyosságával CF-ben, illetve összefüggést mutat olyan klasszikus köpetben mért gyulladásos paraméterekkel, mint a NE, IL1- β , MPO és MMP9. Továbbá a CF-es betegek esetén a HE4, mint potenciális biomarker nem csak a plazma és szérum mintákban mutat összefüggést a légzésfunkció állapotával, hanem a tüdő gyulladásos állapotát jól reprezentáló BAL mintákban is.

Az eddig bemutatott vizsgálatainknak ugyanakkor vannak korlátai. Egyrészt a szérum HE4 szinteket legfeljebb 6 hónapig vizsgáltuk, és nem állt rendelkezésre hosszabb távú után követéses minta annak megítélésére, hogy vajon a CFTR modulátorok tartós hatása nyomon követhető-e HE4 koncentráció mérésén keresztül. Másrészt a már említett vizsgálatainkban a CFTR modulátorok által korrigált CFTR funkció és a HE4 expresszió közötti kapcsolatot nem tártuk fel teljes részletességgel a CFBE sejtekben, így további *in vitro* vizsgálatokat végeztünk a jobb megértés érdekében.

Az utóbbi évek kutatásai meggyőző bizonyítékokkal szolgáltak az epiteliális–mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatának aktivációjára olyan krónikus

tüdőbetegségekben, mint a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), az idiopátiás tüdőfibrózis (IPF) és a CF.¹¹¹ A TGF β 1 az EMT fő mediátora és erőteljes induktora, az említett kórképekben jelentősen emelkedett expressziót mutat a betegek légútjaiban.^{111, 163} Ezen betegségek hasonlóságot mutatnak számos klinikai és molekuláris tényezőben, beleértve a légúti obstrukciót, a krónikus gyulladást, a fibrotikus szöveti átépülést és génexpressziós mintázatokat.¹⁶⁴ A károsodott CFTR funkcióval rendelkező endothelsejtek kifejezetten proinflammatorikus fenotípust mutatnak, amely fokozott reaktív oxigéngyök termeléssel, különböző aktivációs markerek emelkedett expressziójával, károsodott autofágiával és mitokondriális diszfunkcióval társul.¹⁶⁵ Érdekes módon CF-ben az EMT gyakran részleges, ami hibrid EMT fenotípussal rendelkező sejtek kialakulásához vezet.^{109, 165} Ez összhangban áll azzal a koncepcióval, hogy az EMT nem egy teljes epitheliális–mezenchimális átalakulás, hanem rugalmas, átmeneti állapotok spektrumaként értelmezhető.¹⁰⁴

További *in vitro* vizsgálatainkban a HE4 és az MMP9 expresszióját elemeztük CF-hez társuló EMT folyamatában légúti epithelsejtekben. Célunk volt annak igazolása, hogy a megváltozott HE4 szint összefüggésben van az EMT kialakulásával a CFBE sejtekben, ami hozzájárul az MMP9 fokozott expressziójához. Ennek érdekében megvizsgáltuk különböző EMT biomarkerek expresszióját a *p.Phe508del*-CFTR mutációt expresszáló CFBE sejtekben kontroll wt-CFTR CFBE sejtekkel összehasonlítva IF mikroszkópos, RT-qPCR és ELISA módszerekkel. A mutációt tartalmazó CFBE sejtekben csökkent E-cadherin, valamint emelkedett N-cadherin, Vimentin és IL1B expressziót figyeltünk meg. Emellett mind a HE4, mind az MMP9 fehérjeszintje magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejtekben a kontroll sejtekhez képest. A fehérjeszintekkel összhangban mRNS szinten is jelentős különbségek mutatkoztak ezen markerek expressziójában a két sejtvonal között. Mindezek összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, amelyekben a CF-es bronchiális epitheliumban az E-cadherin kisebb mértékben festődött, míg az N-cadherin, Vimentin és I típusú kollagén nagyobb mértékű pozitivitást mutatott a normál epitheliumhoz képest. Továbbá a polarizált *p.Phe508del*-CFTR CFBE 41o– sejtekben ezeknek a mezenchimális markereknek az expressziója magasabb volt, mint a wt-CFTR sejtekben.^{102 109} Érdekes módon az N-cadherin és a Vimentin szintje alacsonyabb volt a *p.Gly551Asp*-CFTR mutációt expresszáló CFBE sejtekben, mint a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben.¹⁰⁹ Összességében ezek az eredmények a CF-es légúti epitheliális sejtek mezenchimális irányba történő eltolódását és proinflammatorikus fenotípusát jelzik, amely az epitheliális integritás zavarára és EMT-hez kapcsolódó molekuláris változásokra utal a CF-es epitheliumban.

Annak vizsgálatára, hogy az EMT tovább fokozható-e CF-es légúti epithelsejtekben, a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket TGF β 1 kezelésnek tettük ki. A várakozásoknak megfelelően a TGF β 1 expozíció szignifikánsan csökkentette az E-cadherin szintjét, miközben növelte az N-cadherin és az MMP9 fehérje expresszióját, amit IF és ELISA vizsgálatok is igazoltak. Érdekes módon a HE4 expressziója jelentősen csökkent a TGF β 1 stimulációt követően a *p.Phe508del*-CFTR homozigóta CFBE sejtek emelkedett kiindulási szintjéhez képest, ami arra utal, hogy az aktivált EMT a HE4 csökkenésével társul CF-ben. Eredményeinkkel összhangban korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a TGF β 1 kezelés EMT-t indukál CFBE sejtvonalakban, amely az epitheliális markerek (pl. E-cadherin, Claudin-1) csökkenésével és az N-cadherin növekedésével társult. A Vimentin emelkedése jelentősebb volt a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben, mint a *p.Gly551Asp*-CFTR-t expresszáló sejtekben.¹⁰⁹ Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HE4 normál epitheliális sejtekben expresszálódik, de szintje fokozatosan csökken, amikor az epithelium elveszíti epitheliális jellegét.

Az EMT kialakulásának vizsgálata során amellet, hogy bizonyos molekulákkal (TGF β 1, ELX/TEZ/IVA) kezelésnek tettük ki a légúti epithelsejteket, kíváncsiak voltunk arra, hogy a komplex légúti gyulladásos miliót jól modellező stimulus hogyan hat ezekre a sejtekre az EMT folyamatában. Erre a célra CF-es betegek BAL mintáit találtuk megfelelőnek. A klinikai vizsgálatainkban használt mintatípusokhoz (köpet, vér) képest jóval invazívabb eljárással nyerhető BAL mintából is kimutathatóak olyan gyulladásos biomarkerek, melyek erős prognosztikai vagy prediktív értékkel rendelkeznek pl. NE⁹², azonban a klinikumban ez a lehetőség csak korlátozottan áll rendelkezésre a mintavétel invazivitása miatt. Mivel azonban ez a mintatípus jól reprezentálja a légúti környezetet a gyulladásos citokinek (pl. IL-8), proteázok (pl. NE, MMP-k), valamint bakteriális komponensek révén a CF-es tüdőben, így CF-es BAL minták hatását vizsgáltuk *in vitro* körülmények között a légúti epithelsejtek működésére és fenotípusának megváltozására az EMT folyamatában. Az EMT markerek, az IL-1 β , valamint a HE4 fehérje expressziós változásait vizsgáltuk a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben. A korábban bemutatott TGF β 1 kezelés hatására bekövetkező változásokhoz hasonló tendenciákat figyeltünk meg az EMT markerek és az IL-1 β mRNS szintek esetében is. A BAL kezelés hatására az E-cadherin expresszió szignifikánsan csökkent, az N-cadherin pedig nőtt, hasonlóan a Vimentinhez, habár az utóbbi esetén az emelkedés nem volt szignifikáns, a tendencia megmutatkozott. Az IL-1 β is jelentős mértékben emelkedett a kezelés hatására. Mindezen vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a CF-re jellemző komplex légúti milió hozzájárulhat az EMT kialakulásához és a gyulladásos folyamatok elindulásához a tüdőben.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a CFTR funkció gyógyszeres kezeléssel történő helyreállítása képes-e visszafordítani az EMT-hez köthető változásokat. Ennek érdekében a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket a hármas kombinációjú CFTR modulátorral, az ELX/TEZ/IVA-val kezeltük, illetve TGFβ1 és ETI együttes alkalmazását is vizsgáltuk. A CFTR funkció helyreállítását már korábban teljes sejt patch-clamp módszerrel igazoltuk *in vitro* körülmények között, ahol az ELX/TEZ/IVA kezelés korrigálta a *p.Phe508del*-CFTR működését a csúcsáramsűrűségek változása alapján.¹⁶⁶ Az epitheliális jelleg helyreállításának vizsgálata során IF festéssel az E-cadherin expresszió emelkedését és az N-cadherin csökkenését mutattuk ki. Az RT-qPCR megerősítette az E-cadherin, N-cadherin, Vimentin és IL1B mRNS szintek normalizálódását a kezelés hatására. Ugyanakkor a HE4 és MMP9 mRNS szintek szignifikánsan alacsonyabbak maradtak ELX/TEZ/IVA kezelés hatására, illetve TGFβ1 + ELX/TEZ/IVA jelenlétében a csak TGFβ1 kezeléshez képest. Más vizsgálatok szerint a *p.Phe508del*-CFTR sejtek esetén egyértelmű összefüggés mutatható ki a mutáns CFTR korrekciójának hatékonysága és a mezenchimális markerek szintjének csökkenése között: a VX-661 (TEZ) önmagában nem változtatta meg szignifikánsan az EMT markerek expresszióját. Ezzel szemben a VX-661/VX-770 (TEZ/IVA) kombináció jelentősen csökkentette a Vimentin szintjét. Amikor a VX-661/VX-445 (TEZ/ELX) kombinációt VX-770-nel (IVA) együtt alkalmazták *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben, a korrekció lényegesen hatékonyabbnak bizonyult, és jelentős mértékben csökkentette az N-cadherin és a Vimentin szinteket. Azonban ugyanezen kezelés alkalmazása során a wt-CFTR CFBE sejtekben nem figyeltek meg szignifikáns változást sem az epitheliális, sem a mezenchimális markerek szintjében.¹⁰² A VX-770 (IVA) és a VX-809 (LUM) növelte a CFTR expresszióját, és csökkentette a mezenchimális markerek, a CDH2 és a TAGLN szintjét.¹⁶⁵

Az ELX/TEZ/IVA kezelés részben helyreállította a tight junction integritását a mutáns CFBE sejtekben, növelve a claudin-1 szintjét és az E-/N-cadherin arányt.¹⁰⁹ Patkánymodellben kimutatták, hogy az EMT-ben részt vevő jelátviteli útvonalak a CFTR mutációtól függenek, mivel az I-es típusú kollagén expressziója alacsonyabb volt a CFTR-knock-out (CFTR-KO) patkányok tüdőszövetében és primer sejt kultúráiban, mint a *p.Phe508del*-CFTR esetén, különösen TGFβ1 kezelést követően. Emellett a Rho-asszociált protein-kináz inhibitora, a Y27632, visszafordította az EMT-hez kapcsolódó gének változásait CFTR mutáns, de nem CFTR-KO sejtekben.¹⁶⁴ Összességében a funkcionális CFTR szintje szoros összefüggést mutat a CFBE sejtek epitheliális/mezenchimális állapotával.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a HE4 szabályozása miként alakul hosszú távon, folyamatos stimuláció mellett. A TGFβ1 tartós jelenléte (0-120 óra) a HE4 szintjének fokozatos és szignifikáns csökkenését eredményezte. A HE4 expresszióját nem epitheliális sejtvonalakban is megvizsgáltuk azért, hogy megtudjuk, vajon ez a hatás sejttípus specifikus-e. Érdekes módon sem pulmonális mezenchimális őssejtekben (MSC), sem CF-ből származó tüdő eredetű fibroblasztokban (DHLF-CF) nem volt kimutatható a HE4 fehérje, ami megerősíti, hogy a HE4 expressziója epitheliális sejtekre korlátozódik. Wang és munkatársai szintén a WFDC2 (HE4) szintjének csökkenését figyelték meg krónikus rhinosinusitisben szenvedő betegek ornyálkahártya epithelsejtjeiben, ami az EMT következtében kialakuló, epitheliális és mezenchimális sejtek abnormális keveredésére utal krónikus gyulladás során. Fontos megjegyezni, hogy megfigyeléseinkkel összhangban a fibroblasztok nem expresszálták a HE4-et.¹⁶⁷

Ezen kívül meghatároztuk az MMP9 fehérjeszintjét a wt-CFTR és a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben, valamint TGFβ1 kezelt mutáns sejtekben ELX/TEZ/IVA jelenlétében és hiányában. Az immunfluoreszcens és RT-qPCR eredményekkel összhangban a kiindulási MMP9 szint magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek felülúszójában, mint a vad típusú kontroll sejtekben, amelyet az ETI önmagában csökkentett. A TGFβ1 stimuláció tovább növelte az MMP9 expresszióját, azonban ez a növekedés szignifikánsan csökkent az ETI együttes alkalmazása mellett. CF-es betegekben a plazma MMP9 szintje emelkedett volt a CFTR-specifikus kezelés előtt, és csökkent a Trikafta® (azaz ELX/TEZ/IVA) alkalmazását követően.¹⁵⁵ Mivel a TGFβ1 más humán sejtekben, például meningeális sejtekben is képes indukálni az MMP9 expresszióját az ERK és Smad jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül¹⁶⁸, valószínűsíthető, hogy a TGFβ1 magas szintje részben szabályozza a CF-ben megfigyelhető fokozott MMP9 expressziót.^{104, 115, 163}

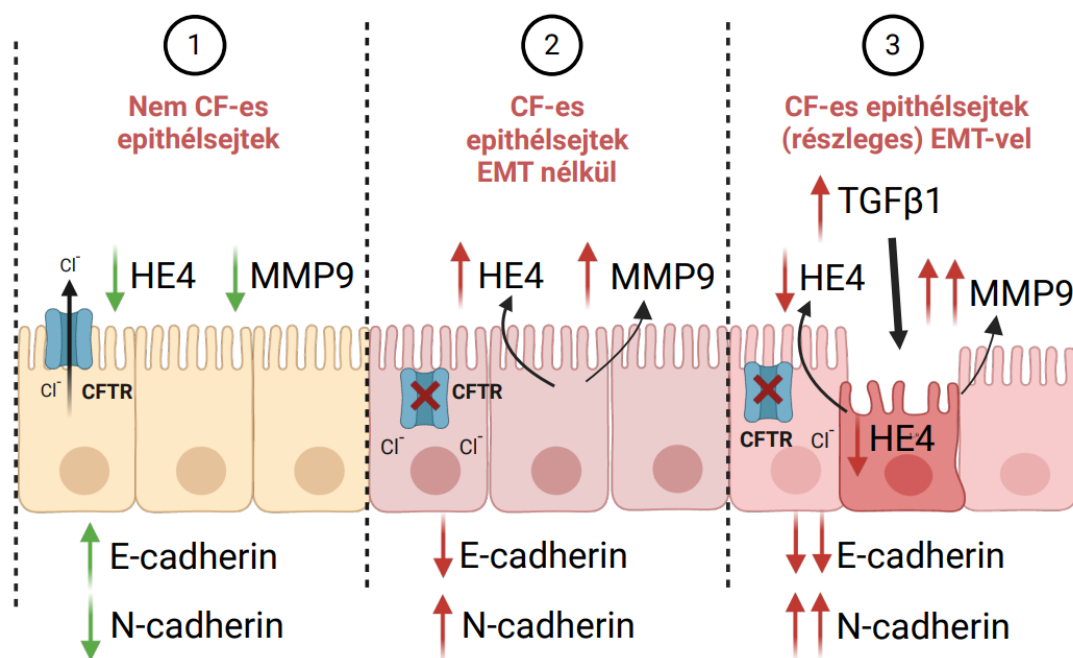
A HE4 expresszióját mesterségesen lecsendesítettük a nem kezelt és TGFβ1 stimulált *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben HE4 specifikus siRNS transzfekcióval. A HE4 szint csökkenése EMT-re jellemző változásokat indukált. Emellett az MMP9 mRNS és fehérjeszintje is emelkedett, ami a HE4 és az MMP9 expresszió közötti közvetlen funkcionális kapcsolatra utalhat. Ezt a molekuláris kapcsolatot korábban mások is kimutatták, amikor igazolták, hogy a HE4 közvetlenül kölcsönhatásba lép az MMP9 fehérjével fibrotikus vese lizátumokban, amit immunprecipitációt követő Western blot analízissel demonstráltak.¹⁶⁹

Az IL1B mRNS szintjét is vizsgáltuk EMT körülmények között, párhuzamosan az EMT markerekkel, valamint a HE4 és az MMP9 expressziójával. A CF-es légúti epithelium krónikus

gyulladást mutat, amelyet a proinflammatorikus citokinek emelkedett szintje jellemez, beleértve az IL-1 β /NLRP3 aktivációt, ami alapvető szerepet játszik a CF-es tüdő patofiziológiájában és meghatározza az epitheliális sejtek viselkedését.¹⁷⁰ Bár nem CF eredetű bronchiális epitheliális sejtekben kimutatták, hogy az IL-1 β fokozza a TGF β 1 által indukált EMT-t, ez a tüdőepithelium biológiájában ismert kapcsolat alátámasztja annak valószínűségét, hogy az IL-1 β hasonló módon hathat a gyulladt CF-es légutakban is.¹⁷¹ Eredményeink alapján az EMT magasabb IL-1 β mRNS szinttel társult, különösen TGF β 1 expozíciót követően, ami a gyulladás és az EMT közötti kapcsolatra utal CF-ben.

Végül a sejtproliferáció Ki67 IF festéssel történő vizsgálata szignifikáns csökkenést mutatott a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a HE4 géncsendesítését követően a NEG-01 kezelt kontroll sejtekhez képest. Ez arra utal, hogy a csökkent HE4 expresszió mellett indukált EMT csökkent proliferációs képességet eredményez. Hasonlóképpen, a HE4 knock-down csökkentette az EMT kialakulását, a sejtproliferációt és a Ki67 expresszióját petefészekrák sejtekben *in vitro*.¹⁷²

A vizsgálatnak vannak korlátai: nem végeztünk további kísérleteket az EMT részletesebb jellemzésére CFBE sejtekben, például sebzáródási (wound healing) assay-t. A HE4 mérésével egyidejűleg nem vizsgáltuk az EMT kialakulásának közvetlen hatását a CFTR expressziójára CFBE sejtekben. Végül a TGF β 1 által módosított HE4 expresszió hátterét, valamint a HE4 és MMP9 közötti kapcsolat részleteit nem tártuk fel teljes mértékben; ezért további kutatások szükségesek a szabályozási mechanizmus pontosításához a jövőben. Az *in vitro* vizsgálataink eredményei megerősítik, hogy az EMT HE4 expresszió csökkenéssel és az MMP9 expresszió emelkedéssel jár együtt CF-es légúti epithelsejtekben és alátámasztják, hogy közvetlen összefüggés van a CFTR működési zavara és az EMT kialakulása között CF-ben. Az alacsony HE4 expresszió pedig hozzájárul az EMT-re jellemző fenotípus és a csökkent sejtproliferáció kialakulásához a légúti epithelsejtekben. (31. ábra).



31. ábra: A CF-ben zajló progresszív epithelsejt változások és az EMT kialakulásának sematikus ábrázolása. A megfelelően működő CFTR fenntartja a normál iontranszportot és az epitheliális integritást az egészséges légutakban, magas E-cadherin és alacsony N-cadherin expresszió mellett (1. fázis). A CFTR működési zavara és az intrapulmonális gyulladás CF-ben megemeli a HE4 és az MMP9 szintjét (2. fázis). A TGFβ1 tartós jelenléte esetén az epitheliális sejtek az EMT folyamatán (részleges) mennek keresztül, amelyet csökkent E-cadherin, megemelkedett N-cadherin és MMP9, valamint csökkent HE4 expresszió jellemez (3. fázis).

7. Összefoglalás

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

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

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

8. Summary

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive inherited genetic metabolic disorder in the Caucasian population, characterized by the absence or dysfunction of the CFTR ion channel. This results in the production of altered, viscous secretions by exocrine glands, leading to progressive damage of the affected organs. Early mortality in CF patients is primarily caused by the gradual decline in pulmonary function and the development of pulmonary fibrosis on the basis of chronic inflammation dominated by neutrophil granulocytes. Pulmonary fibrosis is preceded by the process known as epithelial–mesenchymal transition (EMT).

Currently available clinical parameters for monitoring the efficacy of novel CFTR modulator therapies in CF are limited. Airway inflammation characteristic of the disease can be detected even at early stages; therefore, measuring the concentrations of mediators involved in these processes in blood or airway samples represents a feasible approach for assessing therapeutic effectiveness. These therapies improve lung function, reduce inflammation, and decrease the frequency of infections. However, there remains a need to identify reliable biomarkers that enable the monitoring of disease progression and treatment efficacy. Plasma and serum HE4 concentrations have shown a strong correlation with disease severity, suggesting their suitability for monitoring the effectiveness of Orkambi® and Kaftrio® therapies. Based on our findings *in vitro*, the CFTR correcting effect of Kaftrio® was significantly greater compared to Orkambi®. Furthermore, a properly functioning CFTR maintains normal ion transport and epithelial integrity in healthy airways, whereas in CF, CFTR dysfunction and inflammation lead to elevated levels of HE4 and MMP9. In the long-standing presence of TGFβ1, the process of EMT progresses, accompanied by increased MMP9 levels and decreased HE4 expression.

In summary, plasma and serum HE4 concentration correlates with the improvements in pulmonary function in CF and may serve as novel, reliable, and easily measurable biomarker for monitoring the efficacy of both Orkambi® and Kaftrio® CFTR modulator therapies. Moreover, our findings indicate that EMT-induced downregulation of HE4 expression is accompanied by an increase in MMP9 levels in CF airway epithelial cells, and decreased HE4 expression contributes to the development of an EMT-associated phenotype and reduced cell proliferation.

9. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai

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

10. Irodalomjegyzék és publikációs lista

10.1. Irodalomjegyzék

1. Wu M, Chen JH. CFTR dysfunction leads to defective bacterial eradication on cystic fibrosis airways. *Front Physiol.* 2024;15:1385661.
2. Widdicombe JH. Regulation of the depth and composition of airway surface liquid. *J Anat.* 2002;201:313–8.
3. Zajac M, Dreano E, et al. Airway Surface Liquid pH Regulation in Airway Epithelium Current Understandings and Gaps in Knowledge. *Int J Mol Sci.* 2021;22:3384.
4. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016;4:662–674.
5. Courtney JM, Ennis M, et al. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2004;3:223–231.
6. Bannon A, Zhang SD, et al. Cystic Fibrosis from Laboratory to Bedside: The Role of A20 in NF- κ B-Mediated Inflammation. *Med Princ Pract.* 2015;24:301–310.
7. Yonker LM, Cigana C, et al. Host-pathogen interplay in the respiratory environment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015;14:431–439.
8. Turton KB, Ingram RJ, et al. Macrophage dysfunction in cystic fibrosis: Nature or nurture? *J Leukoc Biol.* 2021;109:573–582.
9. Grasemann H, Ratjen F. Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 2023;389:1693–1707.
10. Karimulla S. A Focus on Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) Genetic Lesions, Phenotype Expressions and Emerging Therapies for Cystic Fibrosis: An Update. *J Young Pharm.* 2025;17:299–305.
11. Tsui LC, Dorfman R. The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:a009472.
12. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020;109:893–899.
13. Hanssens LS, Duchateau J, et al. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells.* 2021;10:2844.

14. Bell SC, Mall MA, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med*. 2020;8:65–124.
15. Ratjen F, Bell SC, et al. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;14:1:15010.
16. Veit G, Avramescu RG, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis *Mol Biol Cell*. 2017;27:424–433.
17. Farrell PM, White TB, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017;181:S4-S15.e1.
18. Zaher A, ElSaygh J, et al. A Review of Trikafta: Triple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulator Therapy. *Cureus*. 2021;13(7):e16144.
19. Edwards SJ, Farrar BG, et al. Ivacaftor-tezacaftor-elexacaftor, tezacaftor-ivacaftor and lumacaftor-ivacaftor for treating cystic fibrosis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2025;29(19):1-111.
20. Van Goor F, Hadida S, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:18843–18848.
21. Van Goor F, Hadida S, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:18825–18830.
22. Wainwright CE, Elborn JS, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015;373:220–231.
23. Burgel PR, Munck A, et al. Real-Life Safety and Effectiveness of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:188–197.
24. Middleton PG, Mall MA, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med*. 2019;381:1809–1819.
25. Ridley K, Condren M. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor: The First Triple-Combination Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulating Therapy. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2020;25:192–197.
26. Taylor-Cousar JL, Munck A, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377:2013–2023.

27. Zemanick ET, Taylor-Cousar JL, et al. A Phase 3 Open-Label Study of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children 6 through 11 Years of Age with Cystic Fibrosis and at Least One F508del Allele. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;203:1522–1532.
28. Bene Z, Fejes Z, et al. Laboratory biomarkers for lung disease severity and progression in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2020;508:277–286.
29. Szczesniak R, Heltshe SL, et al. Use of FEV1 in cystic fibrosis epidemiologic studies and clinical trials: A statistical perspective for the clinical researcher. *J Cyst Fibros*. 2017;16:318–326.
30. Elbehairy AF, Boorman DY, et al. Lung clearance index in patients with cystic fibrosis: Can we avoid repeating the test three times? *J Cyst Fibros*. 2025;24:979–981.
31. Stanojevic S, Bowerman C, et al. Multiple breath washout: measuring early manifestations of lung pathology. *Breathe*. 2021;17:210016.
32. Tiddens HAWM, Meerburg JJ, et al. The radiological diagnosis of bronchiectasis: what's in a name? *Eur Respir Rev*. 2020;29:1–9.
33. Stahl M. Sensitive markers to detect progression of lung disease in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2021;58(1):2100236.
34. Martin C, Guzior D V., et al. Longitudinal microbial and molecular dynamics in the cystic fibrosis lung after Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor therapy. *Respir Res*. 2023;24:1–14.
35. Rowe SM, Heltshe SL, et al. Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190:175–184.
36. Chilvers MA, Davies JC, et al. Long-term safety and efficacy of lumacaftor–ivacaftor therapy in children aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation: a phase 3, open-label, extension study. *Lancet Respir Med*. 2021;9:721–732.
37. Koerbin G, Greaves RF, et al. Total intra-individual variation in sweat sodium and chloride concentrations for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2008;393:128–129.

38. Vermeulen F, Lebecque P, et al. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat tests: A retrospective analysis. *J Cyst Fibros*. 2017;16:30–35.
39. Fidler MC, Beusmans J, et al. Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *J Cyst Fibros*. 2017;16:41–44.
40. Shoki AH, Mayer-Hamblett N, et al. Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *Chest*. 2013;144:1659–1670.
41. Cantin AM, Bilodeau G, et al. Plasma biomarkers and cystic fibrosis lung disease. *Clin Invest Med*. 2012;35:E173–E181.
42. Waters V, Stanojevic S, et al. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2012;40:61–66.
43. Goss CH, Heltshe SL, et al. A Randomized Clinical Trial of Antimicrobial Duration for Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbation Treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;204:1295–1305.
44. Stockley RA, Halpin DMG, et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Biomarkers and Their Interpretation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199:1195–1204.
45. Ratjen F, Saiman L, et al. Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 2012;142:1259–1266.
46. Sagel SD, Wagner BD, et al. Utilizing centralized biorepository samples for biomarkers of cystic fibrosis lung disease severity. *J Cyst Fibros*. 2020;19:632–640.
47. Reid PA, McAllister DA, et al. Measurement of serum calprotectin in stable patients predicts exacerbation and lung function decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:233–236.
48. Gray RD, Imrie M, et al. Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. *J Cyst Fibros*. 2010;9:193–198.
49. Meyer KC. Neutrophils, myeloperoxidase, and bronchiectasis in cystic fibrosis: Green is not good. *J. Lab. Clin. Med*. 2004;144:124–126.
50. Pereira LCR, Moreira EAMH, et al. Influence of inflammatory response, infection, and pulmonary function in cystic fibrosis. *Life Sci*. 2014;109:30–36.

51. Kohlhoff S, Köhler E, et al. Serum myeloperoxidase in cystic fibrosis patients receiving systemic antibiotics. *Scand J Infect Dis*. 2007;39:163–166.
52. Singh A, He M, et al. Blood biomarkers to predict short-term pulmonary exacerbation risk in children and adolescents with CF: A pilot study. *J Cyst Fibros*. 2020;19:49–51.
53. Bergin DA, Hurley K, et al. Airway inflammatory markers in individuals with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Inflamm Res*. 2013;6:1-11.
54. Roderfeld M, Rath T, et al. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros*. 2009;8:338–347.
55. Rath T, Zwaschka L, et al. Identification of neutrophil activation markers as novel surrogate markers of CF lung disease. *PLoS One*. 2014;9(12): e115847.
56. Forrester DL, Barr HL, et al. sTREM-1 is elevated in cystic fibrosis and correlates with proteases. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52:467–471.
57. Hendry J, Elborn JS, et al. Cystic fibrosis: inflammatory response to infection with *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J*. 1999;14:435–438.
58. Bell SC, Bowerman AM, et al. Metabolic and inflammatory responses to pulmonary exacerbation in adults with cystic fibrosis. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:553–559.
59. Zhai J, Emond MJ, et al. Club cell secretory protein and lung function in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2022;21(5):811-820.
60. Laguna TA, Williams CB, et al. Biomarkers of inflammation in infants with cystic fibrosis. *Respir Res*. 2018;19:6.
61. Tarique AA, Sly PD, et al. CFTR-dependent defect in alternatively-activated macrophages in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2017;16:475–482.
62. Muhlebach MS, Clancy JP, et al. Biomarkers for cystic fibrosis drug development. *J Cyst Fibros*. 2016;15:714–723.
63. Clauss A, Lilja H, et al. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J*. 2002;368:233–242.
64. Bingle L, Cross SS, et al. WFDC2 (HE4): A potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respir Res*. 2006;7:61.

65. Galgano MT, Hampton GM, et al. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Path.* 2006;19:847–853.
66. Bignotti E, Ragnoli M, et al. Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2011;104:1418–1425.
67. Nagy B, Bhattoa HP, et al. Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:1639–1648.
68. Nagy B, Nagy B, et al. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. *Chest.* 2016;150:661–672.
69. Nagy B, Bene Z, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) levels inversely correlate with lung function improvement (delta FEV1) in cystic fibrosis patients receiving ivacaftor treatment. *J Cyst Fibros.* 2019;18:271–277.
70. Bene Z, Fejes Z, et al. Enhanced Expression of Human Epididymis Protein 4 (HE4) Reflecting Pro-Inflammatory Status Is Regulated by CFTR in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Front Pharmacol.* 2021;14:12:592184.
71. Giddings O, Esther CR. Mapping targetable inflammation and outcomes with cystic fibrosis biomarkers. *Pediatr Pulmonol.* 2017;52:S21–S28.
72. Liou TG, Argel N, et al. Airway inflammation accelerates pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *iScience.* 2024;27(3):108835.
73. Breuer O, Caudri D, et al. Predicting disease progression in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med.* 2018;12:905–917.
74. Sagel SD, Chmiel JF, et al. Sputum Biomarkers of Inflammation in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(4):406–417.
75. Colombo C, Costantini D, et al. Cytokine levels in sputum of cystic fibrosis patients before and after antibiotic therapy. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40:15–21.
76. Ordoñez CL, Henig NR, et al. Inflammatory and microbiologic markers in induced sputum after intravenous antibiotics in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:1471–1475.
77. Colombo C, Faelli N, et al. Analysis of inflammatory and immune response biomarkers in sputum and exhaled breath condensate by a multi-parametric biochip array in cystic fibrosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24:423–432.

78. Nixon LS, Yung B, et al. Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1764–1769.
79. Dickerhof N, Turner R, et al. Oxidized glutathione and uric acid as biomarkers of early cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*. 2017;16:214–221.
80. Hector A, Kormann MSD, et al. The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One*. 2011;6(9):e24399.
81. Forrest OA, Chopyk DM, et al. Resistin is elevated in cystic fibrosis sputum and correlates negatively with lung function. *J Cyst Fibros*. 2019;18:64–70.
82. Kilcoyne A, Lavelle LP, et al. Chest CT abnormalities and quality of life: relationship in adult cystic fibrosis. *Ann Transl Med*. 2016;4(5):87.
83. Sagel SD, Wagner BD, et al. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:857–865.
84. Twigg MS, Brockbank S, et al. The Role of Serine Proteases and Antiproteases in the Cystic Fibrosis Lung. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:293053.
85. Reihill J, Moffitt K, et al. Sputum trypsin-like protease activity relates to clinical outcome in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2020;19:647–653.
86. Müller U, Hentschel J, et al. Changes of Proteases, Antiproteases, and Pathogens in Cystic Fibrosis Patients' Upper and Lower Airways after IV-Antibiotic Therapy. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:626530.
87. Guyot N, Butler MW, et al. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem*. 2008;283:32377–32385.
88. Ramsey KA, Schultz A, et al. Biomarkers in Paediatric Cystic Fibrosis Lung Disease. *Paediatr Respir Rev*. 2015;16:213–218.
89. Simpson SJ, Mott LS, et al. Novel end points for clinical trials in young children with cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2013;7:231–243.
90. Armstrong DS, Hook SM, et al. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2005;40:500–510.

91. Sagel SD, Gibson RL, et al. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2009;154(2):183-188.
92. Sly PD, Brennan S, et al. Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:146–152.
93. Montgomery ST, Dittrich AS, et al. Interleukin-1 is associated with inflammation and structural lung disease in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2018;17:715–722.
94. Fayon M, Kent L, et al. Clinimetric properties of bronchoalveolar lavage inflammatory markers in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2014;43:610–626.
95. Harris WT, Muhlebach MS, et al. Transforming growth factor- β 1 in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44:1057–1064.
96. Drumm ML, Konstan MW, et al. Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med*. 2005;353:1443–1453.
97. Brody AS, Tiddens HAWM, et al. Computed Tomography in the Evaluation of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;172:1246–1252.
98. Sly PD, Gangell CL, et al. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2013;368:1963–1970.
99. Esther CR, Turkovic L, et al. Metabolomic biomarkers predictive of early structural lung disease in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2016;48:1612–1621.
100. Yang J, Antin P, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21:341–352.
101. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20:69–84.
102. Quaresma MC, Pankonien I, et al. Mutant CFTR Drives TWIST1 mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis*. 2020;11(10):920.
103. Vincent CT, Fuxe J. EMT, inflammation and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2017;47:168–169.

104. Rout-Pitt N, Farrow N, et al. Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology. *Respir Res.* 2018;19(1):136.
105. Sohal SS, Reid D, et al. Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2011;12(1):130.
106. Jonsdottir HR, Arason AJ, et al. Basal cells of the human airways acquire mesenchymal traits in idiopathic pulmonary fibrosis and in culture. *Lab Investig.* 2015;95:1418–1428.
107. Jolly MK, Ward C, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Dev Dyn.* 2018;247:346–358.
108. Nieto MA, Huang RYYJ, et al. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166:21–45.
109. Rodrigues CS, Canto M, et al. CFTR ion transport deficiency primes the epithelium for partial epithelial-mesenchymal transition in cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2025;16:1655479.
110. Ford CE, Jary E, et al. The Wnt gatekeeper SFRP4 modulates EMT, cell migration and downstream Wnt signalling in serous ovarian cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e54362.
111. Mottais A, Riberi L, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Mechanisms in Chronic Airway Diseases: A Common Process to Target? *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):12412.
112. Rodrigues CS, Canto M, et al. CFTR ion transport deficiency primes the epithelium for partial epithelial-mesenchymal transition in cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2025;16:1655479.
113. LeSimple P, Liao J, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J Physiol.* 2010;588:1195–1209.
114. Trinh NTN, Bardou O, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J.* 2012;40:1390–1400.
115. Hajj R, Lesimple P, et al. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol.* 2007;211:340–350.
116. Maisonneuve P, Marshall BC, et al. Cancer risk in cystic fibrosis: a 20-year nationwide study from the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:122–129.

117. Than BLN, Linnekamp JF, et al. CFTR is a tumor suppressor gene in murine and human intestinal cancer. *Oncogene*. 2016;35:4191–4199.
118. Zhang JT, Jiang XH, et al. Downregulation of CFTR promotes epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis of breast cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2013;1833:2961–2969.
119. Rowe SM, Miller S, et al. Cystic Fibrosis. *N Eng J Med*. 2005;352:1992–2001.
120. Montemayor K, Lechtzin N. The PROSPECT Is Bright for CFTR Modulators. *Ann Am Thorac Soc*. 2021;18:32–33.
121. Sagel SD, Khan U, et al. Clinical Effectiveness of Lumacaftor/Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for F508del-CFTR. A Clinical Trial. *Ann Am Thorac Soc*. 2021;18:75–83.
122. Quanjer PH, Stanojevic S, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J*. 2012;40:1324–1343.
123. Hunter MJ, Treharne KJ, et al. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One*. 2010;5(7):e11598.
124. Wang H, Cebotaru L, et al. CFTR Controls the Activity of NF-κB by Enhancing the Degradation of TRADD. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40:1063–1078.
125. Kmit A, Marson FAL, et al. Extent of rescue of F508del-CFTR function by VX-809 and VX-770 in human nasal epithelial cells correlates with SNP rs7512462 in SLC26A9 gene in F508del/F508del Cystic Fibrosis patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865:1323–1331.
126. Boinot C, Souchet MJ, et al. Searching for combinations of small-molecule correctors to restore F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and processing. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;350:624–634.
127. Billet A, Froux L, et al. Development of Automated Patch Clamp Technique to Investigate CFTR Chloride Channel Function. *Front Pharmacol*. 2017;8:195.
128. Small DM, Doherty DF, et al. The role of whey acidic protein four-disulfide-core proteins in respiratory health and disease. *Biol Chem*. 2017;398:425–440.

129. Heliström I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:3695–3700.
130. Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50 Suppl 40:S39–S56.
131. Gilchrist FJ, Salamat S, et al. Bronchoalveolar lavage in children with cystic fibrosis: how many lobes should be sampled? *Arch Dis Child.* 2011;96:215–217.
132. Moore RG, Brown AK, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2008;108:402–408.
133. Nagy B, Krasznai ZT, et al. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem.* 2012;49:377–380.
134. Liu W, Yang J, et al. Evaluating the clinical significance of serum HE4 levels in lung cancer and pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17:1346–1353.
135. Goralski JL, Hoppe JE, et al. Phase 3 Open-Label Clinical Trial of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children Aged 2-5 Years with Cystic Fibrosis and at Least One F508del Allele. *Am J Respir Crit Care Med.* 2023;208:59–67.
136. Mall MA, Brugha R, et al. Efficacy and Safety of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children 6 Through 11 Years of Age with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del and a Minimal Function Mutation: A Phase 3b, Randomized, Placebo-controlled Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;206:1361–1369.
137. Heijerman HGM, McKone EF, et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;394:1940–1948.
138. Sutharsan S, McKone EF, et al. Efficacy and safety of elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor versus tezacaftor plus ivacaftor in people with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a 24-week, multicentre, randomised, double-blind, active-controlled, phase 3b trial. *Lancet Respir Med.* 2022;10:267–277.
139. Graeber SY, Vitzthum C, et al. Effects of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor Therapy on CFTR Function in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two F508del Alleles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;205:540–549.

140. Boyle MP, Bell SC, et al. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2:527–538.
141. Taylor-Cousar JL, Jain M, et al. Lumacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis and advanced lung disease homozygous for F508del-CFTR. *J Cyst Fibros*. 2018;17:228–235.
142. Ratjen F, Hug C, et al. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2017;5:557–567.
143. Burgel PR, Munck A, et al. Real-Life Safety and Effectiveness of Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:188–197.
145. Masson A, Schneider-Futschik EK, et al. Predictive factors for lumacaftor/ivacaftor clinical response. *J Cyst Fibros*. 2019;18:368–374.
146. Greaves RF, Jolly L, et al. Laboratory performance of sweat conductivity for the screening of cystic fibrosis. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:559–564.
147. Guerra L, D’Oria S, et al. CFTR-dependent chloride efflux in cystic fibrosis mononuclear cells is increased by ivacaftor therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52:900–908.
148. Jarosz-Griffiths HH, Scambler T, et al. Different CFTR modulator combinations downregulate inflammation differently in cystic fibrosis. *Elife*. 2020;9:e54556.
149. García MS, Madrid-Carbajal CJ, et al. The Role of Triple CFTR Modulator Therapy in Reducing Systemic Inflammation in Cystic Fibrosis. *Lung*. 2025;203(1):55.
150. Maher RE, Cytlak-Chaudhuri UM, et al. Effect of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor on systemic inflammation in cystic fibrosis. *Thorax*. 2025;80:604–615.
151. Carnovale V, Scialò F, et al. Cystic Fibrosis Patients with F508del/Minimal Function Genotype: Laboratory and Nutritional Evaluations after One Year of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor Treatment. *J Clin Med*. 2022;11(23):6900.
152. Lycke M, Ulfenborg B, et al. Consideration should be given to smoking, endometriosis, renal function (eGFR) and age when interpreting CA125 and HE4 in ovarian tumor diagnostics. *Clin Chem Lab Med*. 2021;59:1954–1962.

153. Pócsi M, Fejes Z, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) plasma concentration inversely correlates with the improvement of cystic fibrosis lung disease in p.Phe508del-CFTR homozygous cases treated with the CFTR modulator lumacaftor/ivacaftor combination. *J Cyst Fibros*. 2023;22:1085–1092.
154. Salvatore D, Pepe A. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators in Cystic Fibrosis: A Review of Registry-Based Evidence. *J Clin Med*. 2025;14(11):3978.
155. Schmidt H, Höpfer LM, et al. Multimodal analysis of granulocytes, monocytes, and platelets in patients with cystic fibrosis before and after Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor treatment. *Front Immunol*. 2023;14:1180282.
156. Sanders DB, Li Z, et al. Chest computed tomography scores of severity are associated with future lung disease progression in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:816–821.
157. Quittner AL, Buu A, et al. Development and validation of the cystic fibrosis questionnaire in the United States: A health-related quality-of-life measure for cystic fibrosis. *Chest*. 2005;128:2347–2354.
158. Brody AS, Sucharew H, et al. Computed tomography correlates with pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:1128–1132.
159. Tümmler B. Post-approval studies with the CFTR modulators Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor. *Front Pharmacol*. 2023;14:1158207.
160. Liu J, Bihler H, et al. Partial rescue of F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating with modest improvement of protein processing, but not stability, by a dual-acting small molecule. *Br J Pharmacol*. 2018;175(7):1017–1038.
161. Chmiel JF, Konstan MW, et al. Use of ibuprofen to assess inflammatory biomarkers in induced sputum: Implications for clinical trials in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015;14:720–726.
162. Wojewodka G, De Sanctis JB, et al. Candidate markers associated with the probability of future pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2014;9(2):e88567.

163. Harris WT, Muhlebach MS, et al. Transforming growth factor-beta(1) in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44:1057–1064.
164. Rout-Pitt N, Boog B, et al. Insights into epithelial-mesenchymal transition from cystic fibrosis rat models. *J Cyst Fibros.* 2025;24:149–156.
165. Treps L, Declercq M, et al. Comparative meta-analysis of cystic fibrosis cell models suggests partial endothelial-to-mesenchymal transition. *J Cyst Fibros.* 2021;20:876–880.
166. Pócsi M, Fila L, et al. Comparison of the Effect of CFTR Modulators elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor and lumacaftor/ivacaftor via Serum Human Epididymis Protein 4 Concentration in p.Phe508del-CFTR Homozygous Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Med.* 2025;14(17):6188.
167. Wang Y, Li Z, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the epithelial cell, fibroblast, and key gene alterations in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Sci Rep.* 2024;14(1):2270.
168. Okamoto T, Takahashi S, et al. Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in human meningeal cells via ERK and Smad pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383:475–479.
169. LeBleu VS, Teng Y, et al. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med.* 2013;19:227–231.
170. Conese M, Di Gioia S. Pathophysiology of Lung Disease and Wound Repair in Cystic Fibrosis. *Pathophysiology.* 2021;28:155–188.
171. Doerner AM, Zuraw BL. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res.* 2009;10(1):100.
172. Wang A, Jin C, et al. Knockdown of HE4 suppresses aggressive cell growth and malignant progression of ovarian cancer by inhibiting the JAK/STAT3 pathway. *Biol Open.* 2019;8:bio043570.

10.2. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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





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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 75,211

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

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

Debrecen, 2026.07.01.



11. Tárgyszavak – keywords

Biomarker kutatás – biomarker research

Cisztás fibrózis – cystic fibrosis

CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CFTR modulátor – CFTR modulator

ELX/TEZ/IVA – elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor

EMT – epithelial-mesenchymal transition

HE4 – human epididymis protein 4

Kezelés hatékonyság – treatment efficacy

Légzésfunkció – spirometry (ppFEV1)

LUM/IVA – lumacaftor/ivacaftor

Verejtékklorid – sweat chloride

12. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

Hálásan köszönöm **Dr. Szántó Tibor Gábornak**, **Dr. Mészáros Beátának**, **Dr. Fegyvesi Ferencnek** és **Dr. Rusznyák Ágnesnek** a metodikai beállításokban nyújtott segítségét.

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

Tudományos pályázatok, támogatások:

A kutatómunka az OTKA „FK-135327” kódszámú pályázat (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal) (NB), a Cseh Egészségügyi Minisztérium (00064203/60 03), valamint az LM2018132 támogatás a Cseh Oktatási, Ifjúsági és Sportminisztériumtól (MM), a portugál FCT/MCTES által biztosított UID/04046/2025 és UID/04046/2023 központi támogatás az MDA labor számára (BioISI részére), valamint a Cseh Egészségügyi Minisztérium 00064203/6003 számú támogatása és a Nemzeti Kiválóság Program, Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíj (ÚNKP-17-4, III. típus) támogatásával (NB) készült.

13. Függetlenség