

Szakmai zárójelentés

A témavezető neve: **dr. Antus Balázs**

A téma címe: **Krónikus obstruktív tüdőbetegség exacerbációinak biomarker-alapú fenotipizálása**

OTKA nyilvántartási szám: **K 124343**

Kutatási időtartam: **2017.12.01 – 2023.11.30**

A COPD patogenezise során a dohányfüst és más károsító anyagok belégzése a légutak és tüdőszövet fokozott gyulladással reagál, ami a tüdőparenchyma pusztulását (emphysema) és kislégúti fibrózist, következményes bronchialis szűkületet generál. A COPD poligenetikus betegség, de a genetikai predispozíció részleteit kevésbé ismerjük, a súlyos, örökletes α_1 -antitrypsin hiánnyal járó betegség kivétel. Ez utóbbi recesszíven öröklődik, és korai, ún. panlobularis emphysemát okoz.

A COPD-t kísérő krónikus légúti gyulladást a neutrophilsejtek, a macrophagok és a CD8⁺ T-lymphocyták nagyszámú jelenléte jellemzi. A betegek 10-30%-ában az eosinophilsejtek száma is megemelkedik a légutakban (légúti eosinophilia). A légúti eosinophilia az egyik legfontosabb kezelhető jellegzetesség („*treatable traits*”) a betegségben; jelentősége, hogy az eosinophiliát mutató betegek inhalációs kortikoszteroid (ICS) érzékenysége nagyobb. Felismerésében a perifériás vér abszolút eosinophil sejtszámának, mint biomarkernek egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak.

Mint ismeretes, a COPD-re jellemző gyulladás fenntartásában a dohányfüstnek van meghatározó szerepe, melynek belégzése a bronchialis epithelsejtek károsodását okozza, ami a nem-specifikus (neutrophilsejtek és macrophagok) és az adaptív (T-lymphocyták) immunsejtek aktiválásához vezet. Az epithelsejtekből és az aktivált gyulladással sejtekből különböző citokinek, kemokinek, proteázok, vasoaktív anyagok, reaktív oxigén származékok és egyéb szöveti károsodást okozó ágensek szabadulnak fel. Ezek közül a legismertebbek a leukotrién-B₄ (LTB₄), az interleukin (IL)-8, az IL-1 β , valamint a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α). A COPD-vel társuló szisztémás gyulladás kialakulásában az IL-6 játszik fontos szerepet. A légúti gyulladás perzisztálása a betegség progressziójához és a tüdőszövet átalakulásához vezet.

A morfológiai változások hátterében két alapvető patomechanizmus, az oxidatív stressz és a szöveti proteáz/anti-proteáz egyensúly megbomlása áll. A COPD-ben felszabaduló endogén oxidánsok részben a légutakat infiltráló neutrophilsejtekből és macrophagokból, részben a légúti epithelsejtekből származnak. Emellett a belélegzett dohányfüst is nagy mennyiségben tartalmaz szabadgyököket. A reaktív oxigén és nitrogén intermedierek (ROI és RNI) egyrészt direkt sejtkárosító hatásúak, másrészt indirekt módon hatva felelősek a légúti gyulladás fenntartásáért, a COPD-re jellemző szteroid-rezisztencia kialakulásáért és a proteáz-antiproteáz egyensúly eltolódásáért.

A COPD heterogén kórkép, számos fenotípusa ismert. Az 1950-es években leírt „*pink puffer*”, azaz a dominánsan emphysemás, és a „*blue bloater*”, azaz a dominánsan bronchitises típusok mellett az ismertebb fenotípusok közé a (1) gyors FEV₁-vesztő, (2) korai COPD, (3) ritkán exacerbáló (4) gyakran exacerbáló és (5) eosinophiliát mutató (asztmás karakterű) formák tartoznak. A gyakorlatban

a legnagyobb jelentősége a ritkán és gyakran exacerbálódo betegek elkülönítésének van, a differenciálásban szerepe lehet a kilégzett levegőből vagy vérből kimutatható biomarkernek is.

A COPD akut exacerbációi (fellángolásai) meghatározó jelentőségűek a betegség kórfejlődésében. Az exacerbációk kedvezőtlenül befolyásolják a betegek életminőségét, fokozzák a funkcionális romlás ütemét, rontják a prognózist, növelik hospitalizációk gyakoriságát és a mortalitást. Az exacerbáció során a légúti gyulladás súlyosbodása és a légúti áramláskorlátozottság fokozódása figyelhető meg. Az exacerbációk szintén különböző fenotípusokra oszthatók, bár ennek klinikai jelentősége ma még nem ismert. Szintén kevésbé feltárt, hogy a stabil és exacerbációban lévő betegek légúti citokin mintázata mennyiben különbözik egymástól.

Mindezen megfontolások alapján, az OTKA pályázatban leírt vizsgálataink részben a fent említett gyulladásos mediátorok és oxidatív stressz markerek kimutatására irányultak. Vizsgálataink egy másik észében a légúti eosinophiliát mutató COPD-s betegek kimutatásával és klinikai karakterizálásával, valamint a COPD genetikai hátterének elemzésével, mindenképp az α_1 -antitrypsin szerepével foglalkoztunk. Munkáink egy újabb csoportjában a köpetből kinyerhető RNS mennyiségének és minőségének optimalizálását tűztük ki célul különböző metodikák alkalmazásával.

A kutatási tervben leírt célkitűzések – altémánként csoportosítva – az alábbiak szerint kerültek megvalósításra:

1./ A köpetből kinyerhető RNS mennyiségének és minőségének optimalizálása.

Molekuláris vizsgálataink első részeként a köpetből kinyerhető RNS mennyiségének és minőségének maximalizálását tűztük ki célul a köpet feldolgozás, az RNS izolálás, valamint a reverz transzkripció-real-time PCR (RT-qPCR) egyes lépéseinek optimalizálásával. A köpetmintákat dithiothreitollal (DTT), N-acetil-ciszteinnel vagy RNAlater-rel dolgoztuk fel. Három féle RNS izoláló módszert/kitet (Tripep, Trizol, Direct Zol) teszteltünk. A minta DNS szennyezettségét RT nélküli PCR segítségével, GAPDH és univerzális bakteriális primerekkel ellenőriztük, míg az izolált RNA minőségére a GAPDH különböző bázispár hosszúságú amplikonjainak cycle threshold (Ct) értékeiből következtettünk. Eredményeink azt mutatják, hogy a köpet sejtszáma és RNS tartalma nagy variabilitást mutat. A három feldolgozási módszer közül a DTT eredményezett több RNS-t. Az izoláló kit, a centrifugálási sebesség és hőmérséklet jelentősen befolyásolta a kinyert RNS mennyiségét. Optimalizált köpetfeldolgozással és RNS kivonással 2-3-szor nagyobb mennyiségű RNS volt nyerhető. A minta DNáz kezelése 30-50%-kal csökkentette a nukleinsav tartalmat. A legnagyobb kihívás a szennyező bakteriális DNS tartalom eliminálása volt, a hosszadalmas emésztés a kinyert RNS minőségét is csökkentette. A RT-qPCR lépéseit optimalizálva a specifikus primerekkel, a Superscript VILO RT kit, valamint az Universal SYBR Green Mastermix használata mellett nyertük a legjobb minőségű RNS-t. Összességében, a köpetből kinyerhető RNS mennyiségét/minőségét számos faktor befolyásolja. A feldolgozás/RNS izolálás/RT-qPCR protokoll optimalizálásával a kinyerhető RNA mennyiségét 7.4-szeresére tudtuk növelni, amellet,

hogy az RNS minősége is javult. A bakteriális DNS hatékony eltávolítása jelentős mértékben hozzájárulhat a génexpressziós vizsgálatok sikerességéhez.

Vizsgálataink folytatásaként a köpetből történő RNS izolálás protokollját fejlesztettük tovább, és új módszert dolgoztunk ki a köpetmintákat nagymértékben kontamináló bakteriális DNS hatékony eltávolítására. A módszer lényege, hogy a COPD-s betegekből nyert köpetminták dithiothreitollal (DTT) való homogenizálása és feldolgozása után a köpet sejtvesztéses frakcióját rövid ideig (~5 min), kisméretű (0.5-1.0 mm), kereskedelmi forgalomban is kapható kerámia gyöngyökkel (Bashing beads) kezeljük elő (vortexeljük) még az RNS kivonásának megkezdése előtt. A gyöngyök által okozott mechanikai zúzó hatás a bakteriális fal felszakadását okozza, amelyet követően a köpet RNS tartalmának a kinyerése egy speciális elválasztó oszlopot (gDNA eliminator column) tartalmazó izoláló kit (RNeasy Plus Mini) segítségével kiválóan elvégezhető. A módszer előnye, hogy nincs szükség a köpet hosszadalmas, többszöri ciklusban végzett DNáz kezelésére, amely, - mint igazoltuk - nagymértékben (30-50%) csökkenti a kinyerhető RNS mennyiségét és minőségét. A vizsgálatainkban különböző gyöngyök és más izoláló kiték (Trizol, Tripep és Direct-Zol) kombinálásának lehetőségét is teszteltük, ezek azonban elmaradtak a gDNA elválasztó oszloppal való extrahálás hatékonyságától. Végül, vizsgálatunkban az izoláló protokoll néhány további lépését is optimalizáltuk a köpetre vonatkozóan, és meghatároztuk a legkedvezőbb DNS polimeráz típusát is (Phire DNA polymerase). Vizsgálatainkban, - hasonlóan a korábbi munkáinkhoz -, a köpetminták DNS szennyezettségét RT nélküli PCR segítségével, GAPDH és univerzális bakteriális primerekkel ellenőriztük, míg az izolált RNA minőségére a GAPDH különböző bázispár hosszúságú ampikonjainak Ct értékeiből következtettünk.

2./ A oxidáns/antioxidáns státusz vizsgálata az oxidatív stressz markerek és antioxidáns enzimaktivitás monitorozásán keresztül stabil és exacerbációban lévő COPD-s betegekben.

A pályázat ezen altémájában vizsgáltuk a malondialdehid (MDA), mint oxidatív stressz marker, valamint a szuperoxid dizmutáz (SOD) és a kataláz (KAT), mint antioxidáns enzimek aktivitását stabil állapotú és exacerbációban lévő COPD-s betegek köpetében, kilégtett levegő kondenzátumában és vérplazmájában. Kontrollként egészséges, COPD-ben nem szenvedő betegek mintáit használtuk fel. Eredményeink szerint a SOD és a KAT enzimek aktivitása a köpetben a stabil COPD-s betegekben és az egészségesekben azonos. Exacerbációban ugyanakkor az antioxidánsok aktivitásának szignifikáns emelkedését észleltük, amely az exacerbáció kórházi kezelése során csökkent. Hasonlóan a köpet MDA szintje szintjén is emelkedett exacerbációban, majd a kezelés a marker koncentrációjának csökkenését eredményezte. Exacerbációban a köpet SOD és KAT aktivitása szoros korrelációt mutatott a köpet százalékos és abszolút neutrophil és lymphocytá sejtjével, valamint MDA szintjével. Stabil állapotban szintén korreláció mutatkozott a köpet neutrophil sejtjének száma és az antioxidánsok aktivitása között. A SOD és CAT értékek egymással is korreláltak, ami az enzimrendszerek kapcsolat jellegét mutatja. A vérplazmában a SOD és a KAT enzimek aktivitása nem változott exacerbációban, ami arra utal, hogy az oxidatív folyamatok monitorozására a légúti minták alkalmasabbak, mint a vérplazma. A

kondenzátumban SOD és KAT aktivitás csak nyomokban volt kimutatható. Összességében, az antioxidánsok kapacitásának növekedése exacerbációban a szervezet protektív válaszreakciója lehet, ami ellensúlyozza az exacerbációval összefüggő oxidatív stressz-fokozódást.

Az oxidatív stressz markerek vizsgálatával kapcsolatos munkáink kiterjesztéseként méréseket végeztünk obstruktív alvási apnoe szindrómában (OSAS) szenvedő betegekben is. Eredményeink szerint az OSAS 2, illetve 6 hónapos folyamatos pozitív légúti nyomás (CPAP) terápiával való kezelése a 8-izoprosztán (8-IP) vérkoncentrációját csökkenti a diagnózis felállításakor mért értékekhez képest. Az 5 éve CPAP-pal kezelt betegekben ugyanakkor e marker szintje ismét megemelkedett és visszatért az alapvonali tartományába. A méréseket kiegészítettük a beteg lipid profiljának meghatározásával is, tekintettel arra, hogy az OSAS-sal összefüggő cardiovascularis szövődmények kialakulásában az oxidatív folyamatok mellett az atherogén lipideknek is szerepe lehet. Eredményeink szerint a súlyos OSAS-ban szenvedő betegek CPAP-pal való kezelése után a vér teljes koleszterin és LDL koleszterin szintje csökken a 2 és 6 hónapos kezelési periódus végén, és ezen lipid frakciók szintje még 5 évvel a kezelés megkezdése után is szignifikánsan alacsonyabb szinten marad. Fontos megjegyezni, hogy a CPAP terápia során a betegek BMI-je nem változott, ami kizárja, hogy a kedvező lipid szint változások hátterében az obesitas mérséklődése állna. A trigliceridek, illetve a HDL-koleszterin szintjében érdemi változások a CPAP terápia során nem látszóttak. Ezenfelül elemeztük az 1 hetes CPAP terápia megvonás alvásélettani és kardiovaszkuláris paraméterekre gyakorolt hatásait is. Kimutattuk, hogy e betegeknél az alvásparaméterek már 1 hetes CPAP megvonás hatására is a diagnóziskori értékek közelébe emelkednek, mellyel párhuzamosan a kardiális paraméterek (elsősorban szívfrekvencia, vérnyomás és aritmia index) gyors romlása is megfigyelhető.

Munkánk további kiegészítéseként vizsgáltuk a szolubilis alpha-klotho, mint potenciális anti-oxidáns és anti-aging fehérje expresszióját újonnan diagnosztizált tüdőrákos betegnél. Eredményeink alapján a keringő klotho fehérje nem tűnik ígéretes biomarkernek tüdőrákban, mivel vérszintje az egészséges és a tüdődaganatos betegekben azonos, és az expresszió mértéke sem a betegség szövettani típusával, sem annak kiterjedésével nem mutat összefüggést.

3./ A nukleinsavak oxidatív károsodásának vizsgálata COPD-s betegekben.

Munkánk során vizsgáltuk a nukleinsavak oxidatív károsodásakor keletkező termék, a 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin (8-OHdG) szintjét stabil állapotú és akut exacerbációban lévő COPD-s betegek köpetében és vérében. A 8-OHdG méréssel párhuzamosan meghatároztuk a minták SOD és KAT koncentrációját is. Eredményeink szerint a 8-OHdG szintje a köpetben exacerbációban emelkedik, majd az exacerbáció kezelése során szignifikánsan csökken, ami a nukleinsavak exacerbációval-összefüggő oxidatív károsodására utal. Hasonló kinetikájú változást mutatott a köpet SOD és KAT aktivitása is, és a 8-OHdG koncentráció, valamint az antioxidánsok aktivitása között szoros korreláció volt. A vérplazmában sem a 8-OHdG, sem a SOD és a KAT enzimek aktivitása nem változott exacerbációban, ami arra utal, hogy az oxidatív folyamatok monitorozására a légúti minták alkalmasabbak, mint a vérplazma.

4./ A légutak gyulladásos citokin mintázatának fehérje és mRNS szinten való összehasonlítása stabil és exacerbációban lévő COPD-s betegekben.

Pályázatunk ezen altémájában a proteomikai analízis során 120 citokin expresszióját antitest microarray technikával mértük a köpet felülúszóban, majd a szignifikáns eltérést mutató citokinek egy csoportjában meghatároztuk ezen faktorok mRNS szintjét real-time PCR segítségével ugyanezen mintákban. Összevetettük a fehérje és az mRNS szinten kapott adatokat a COPD-ben nem szenvedő (egészséges), valamint a stabil klinikai állapotú és az exacerbációban lévő COPD-s betegekben. A fehérje szinten kapott eredmények egyrészt arra utalnak, hogy a stabil és az exacerbációs állapotot teljesen eltérő citokin profil jellemzi, mivel más citokinek mutattak szignifikáns eltérést az egészséges vs. stabil, illetve a stabil vs. exacerbált összehasonlításokban. Így például a stabil COPD-ben a vizsgált citokinek/kemokinek közül csak az IL-6 és a GRO α mutatott szignifikáns emelkedést az egészséges kontroll csoporthoz képest. Exacerbációban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk - többek között - a RANTES, MIG, M-CSF, BMP-4, BMP-6, GDNF, Acrp30 és IL-1Ra faktorokban, míg csökkenés látszott az IL-8 szintjében. Másrészt méréseink azt is kimutatták, hogy az exacerbáció kezelése során számos citokin expressziójában markáns csökkenés jelentkezik (OPG, GDNF, Acrp30, M-CSF, MÍG, stb.). A csökkentést mutató citokinek a neutrophilsejtes gyulladás regulálásában játszanak általában központi szerepet, bár emellett más, a gyulladásos folyamatokban csak közvetett módon érintett faktorok is változást mutattak. A génextpresszióra vonatkozó vizsgálatok azt is jelezték, hogy az mRNS szintű változások sokszor nem jelennek meg fehérje szinten vagy - ha detektálhatóak is hasonló irányú változások - azok eltérő amplitúdóval és/vagy kinetikával jelentkeznek az exacerbáció kezelése során. A vizsgált citokinek mRNS expressziójában mind felül-, mind alulregulását is ki tudtuk mutatni az exacerbált állapotban a stabil állapothoz viszonyítva. Az mRNS szinten szignifikáns változást mutató citokinek az IL-1 α , MIG, BMP-4 és a BMP-6 faktorok voltak.

A citokinekkel kapcsolatos kutatómunkánk további folytatásaként elemeztük a COPD exacerbációt követő korai légzésrehabilitáció gyulladásos mediátor-mintázatra gyakorolt hatását. A rehabilitáció időtartama 6 hét volt, melynek nagy részét a betegek kórházi körülmények között töltötték és kontrollált formában vettek részt a különböző izomerősítő és állóképesség javító gyakorlatokon. Eredményeink szerint a rehabilitáció növelte a 6 perces járástávolságot (6MWD), a mellkas fali kitérést és a belégzési kapacitást, amely paraméterek közül a 6MWD és a szérumban IL-8, M-CSF, BMP-6 és MIG koncentrációja szignifikáns negatív korrelációt mutatott.

Ebben az altémában munkáink kiterjesztéseként méréseket végeztünk súlyos OSAS-ban szenvedő betegekben is, és meghatároztuk a mátrix metalloproteinázok (MMP) és ezek inhibitorainak (TIMP) szérumban koncentrációját különböző ideje CPAP terápiában részesült betegekben. Eredményeink szerint a rövid-távú, azaz a 2-, illetve 6-hónapos CPAP terápia csökkenti az MMP-8 és MMP-9 szintjét ezekben a betegekben, míg az általunk vizsgált több faktor (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2 és TIMP-3) szintjében nem tapasztaltunk változást ezen időszak alatt. Ezzel ellentétben, az

5 éve CPAP-pal kezelt betegekben az MMP-8, MMP-9 és TIMP-4 szintje pont ellentétesen változott, azaz ezek a szérumkoncentrációk emelkedtek a kiindulási értékekhez (OSA diagnózisának felállítása) képest. Az MMP és a TIMP szintek a klasszikus alvásparaméterekkel korrelációt nem mutattak, míg klinikai mutatók közül a fehérvérsejtszám (WBC) és a C-reaktív protein szintje összefüggést mutatott az MMP-8 alapvonalis koncentrációjával. Ezek a korrelációk a CPAP kezelés után már nem voltak kimutathatók. Ezenfelül, kapcsolatot találtunk a WBC és az MMP-3 és az MMP-9 szintje, valamint az MMP-1 és a body mass index (BMI) között is, de csak az alapvonalis állapotban. A kardiovaszkuláris paraméterek közül az átlagos szívfrekvencia mutatott korrelációt az MMP-9 és MMP-10 szintjével, de ez is csak az OSA diagnózisának felállításakor. A vizsgálatban további alcsoportelemzések is történtek annak eldöntésére, hogy a MMP vagy a TIMP koncentráció-változások vonatkozásában kapott eredmények összefüggnek-e a betegek életkorával, BMI-jével vagy a hipertóniára szedett gyógyszeres terápiájával, de ilyen összefüggéseket feltárni nem tudtunk.

5./ A α_1 -antitrypsin szerepének vizsgálata a dohányzás és a COPD kialakulása szempontjából.

Pályázatunk α_1 -antitrypsin (A1AT) vizsgálatával kapcsolatos altémájához kapcsolódóan több mint 700 vérmintát tudtunk begyűjteni az 5 betegcsoportban (dohányzó COPD, ex-dohányos COPD, dohányzó egészséges, ex-dohányos és nem dohányzó egészséges). A vizsgált személyek klinikai, demográfiai és légzésfunkciós adatai rögzítésre kerültek; minden személynél meghatározásra került az A1AT szint és a COPD-s betegeknel megtörtént az alacsony dózisú mellkas CT felvételek radiológiai kiértékelése. Az év során tovább folytattuk a vérmintákból a DNS-t izolálását, valamint az A1AT S, Z, M és 0 lokációkon SNP próbákkal a génpolimorfizmusok vizsgálatát real-time PCR módszerrel. Előzetes eredményeink szerint az A1AT szint szignifikánsan magasabb a COPD-s csoportban, mint az egészséges dohányzóknál és a nem dohányzóknál; míg az S, Z, M, 0 SNP-k között nem volt eloszlási különbség az egyes csoportokban. Az A1AT szintek fordítottan korreláltak a FEV1 értékkel az egészséges dohányosoknál és az ex-dohányos COPD-seknél. Az MZ és MS heterozigóták A1AT szintje alacsonyabb volt, mint az MM csoportoké, viszont a FEV1/FVC arány magasabbnak bizonyult az MS csoportban. Az A1AT szintek az emfizémás betegeknel magasabbak voltak, mint a nem emfizémás betegcsoportban. Adataink arra utalnak, hogy az A1AT mutációk heterozigóta formában nem különböztetik meg a COPD-s vagy nem COPD-s betegeket. Ugyanakkor az A1AT szintek különböznek a klinikailag releváns COPD fenotípusok között. Ezen vizsgálatokkal párhuzamosan a beszámolási időszak végén megkezdtük a BICD1, az MBL2, az A1AT aktivitás meghatározását a fent említett betegcsoportok szérummintáiban.

6./ A légúti eosinophiliát mutató stabil és exacerbációban lévő COPD-s betegek kimutatása és klinikai karakterizálása: a kilégzett levegő nitrogén-monoxid (FENO) koncentrációja és a vér eosinophil számának diagnosztikai értéke a légúti eosinophilia kimutatásában.

Kutatómunkánk első lépéseként elemeztük a FENO koncentrációjának és a vér, illetve a köpet eosinophil sejtszámának kapcsolatát stabil klinikai állapotú és exacerbált COPD-s betegekben. Eredményeink szerint stabil állapotban és exacerbációban eltérő összefüggések vannak az említett paraméterek között: stabil állapotban erős pozitív korreláció látszik a köpet és a vér eosinophil sejtszáma között, míg exacerbációban e két mutató között kapcsolat nincs. Az erős korreláció a stabil állapotban magas prediktív értéket (ROC AUC: >0.8) is jelent, azaz a vér eosinophil sejtszámának méréséből viszonylag magas szenzitivitással és specificitással (~75-80%) lehet a légúti eosinophilia (>3% eosinophil szám) fennállására következtetni. Ezzel ellentétben, a FENO szint stabil állapotban korrelációt nem mutatott sem a vér, sem a köpet eosinophil számával. Exacerbációban ugyanakkor a FENO jó prediktív értékű (ROC AUC: >0.8) biomarkernek bizonyult a légúti eosinophilia megjósolása szempontjából. A megfigyelések háttérében a légúti és a szisztémás gyulladásos válaszok különbözősége, illetve az exacerbációt kísérő relatív neutrophil túlsúly húzódhat.

Ezt követően az eosinophil és non-eosinophil betegek klinikai adatait hasonlítottuk össze. Kimutattuk, hogy (i) amíg az eosinophil és non-eosinophil stabil betegek klinikai paraméterei hasonlóak, addig az exacerbációban lévő és eosinophil jelleget mutató betegek enyhébb kórlefolyást mutatnak és köpetükben a gyulladásos sejtek száma kevesebb; (ii) a vér eosinophil sejtszám meghatározása - a FENO-méréshez hasonlóan - elsősorban a légúti eosinophilia hiányát vetíti előre nagy biztonsággal a magas negatív prediktív érték (89-95%) miatt; (iii) két biomarker együttes használata nem javítja érdemben a prediktív értéket. Méréseinket két különböző határérték (>2% és >3% köpet eosinophil sejtszám) mellett is elvégeztük, ez azonban az eredményeket lényegesen nem befolyásolta. Vizsgálatunkban azt is igazoltuk, hogy a vér abszolút eosinophil számának a pozitív prediktív értéke magasabb a vér százalékos eosinophil sejtszámához képest. Végül pedig kiemelendő az is, hogy a stabil betegek vérében meghatározott optimális eosinophil határérték nagyon közel esett a GOLD ajánlásban javasolt küszöbértékhez, ami jól jelzi eredményeink validitását.

7./ A vér eosinophil szám variabilitásának elemzése COPD-s betegekben.

Az eosinophil szám reprodukálhatóságát a korrelációs együtthatóval, a variációs koefficienssel (CV), illetve a Bland-Altman teszttel elemeztük. Eredményeink szerint a perifériás vér eosinophil sejtszáma a 3 hónapos és a 3 kontroll során hasonló tartományban volt, az értékek között erős szignifikáns korreláció mutatkozott (3 hónap: $r=0.902$, $p<0.0001$ és $r=0.889$, $p<0.0001$; 3 év: $r=0.635$, $p=0.0011$ és $r=0.729$, $p<0.0001$). Ennek ellenére, a 3 hónapos kontroll során a betegeknek csak a 65%-ka maradt ugyanabban a GOLD-szerinti eosinophil besorolásban (<100, 100-300 és >300 sejt/ μ L). Ez az arány a 3 éves kontrollnál 70% volt. Ha a besorolásnál csak az alsó eosinophil küszöböt vettük alapul (<100 és >100 sejt/ μ L), az érték 71%-ra, illetve 83%-ra emelkedett. A Bland-Altman teszttel meghatározott egyezési tartományok az abszolút eosinophil számra vonatkozóan a 3 hónapos mérésnél -0.48 és 0.33-nak, míg a 3 évesnél -0.18 és 0.13-nak bizonyultak. A CV értéke a 3 hónapos kontrollnál 35-37%, míg a 3 évesnél 22-23% körül mozgott. Összességében, a COPD-s betegek vérében az eosinophil sejtszám viszonylag

stabil értéket mutat rövid- és hosszú-távon. Ennek ellenére, az egymást követő kontroll vizitek során a betegek kb. 1/3-da egy másik GOLD eosinophil tartományba került át, ami nehézségeket okozhat a terápia meghatározása során.

8./ Vakcinált egészségügyi dolgozók SARS CoV-2 ellenes humorális immunválaszának vizsgálata.

A pályázati időszakban - kutatómunkánk kiterjesztéseként - egy követéses vizsgálatot végeztünk vakcinált egészségügyi dolgozók SARS CoV-2 ellenes humorális immunválaszának kimutatására. A humorális immunválaszt az Intézetünkben rendelkezésre álló, a Beckman Coulter által a vírusfertőzés utólagos kimutatására fejlesztett Access SARS-CoV-2 IgG szerológiai teszttel követtük. Ez a kemilumineszcencián alapuló teszt 100%-os szenzitivitással és 99,6% specificitással rendelkezik, viszont szűk spektrumú, csak a SARS-CoV-2 tüskefehérje receptorkötő helye ellen termelődött ellenanyagokat detektálja (mértékegysége S/CO [signal/cut-off]). A résztvevők egy alcsoportjában az első oltást megelőzően, a két oltás között félúton, illetve a 21. napon, azaz a második oltás napján is végeztünk méréseket annak érdekében, hogy a specifikus, vírusellenes IgG termelés kinetikáját megbecsüljük. Az eredmények azt mutatják, hogy az IgG termelés lassan fut fel, az első oltás utáni 10. napon még negatív tartományban van (átlag 0,68 S/CO), a 21. napon viszont már pozitív, védettséget feltételező tartományba kerül (átlag 9,5 S/CO). Nagyobb számú minta alapján elmondható, hogy a második oltást követő 7. npra az IgG termelés felgyorsul, az egy héttel korábbi értéknél jelentősen magasabb értéket mutat (átlag 49,9 S/CO). Ehhez képest előzetes eredmények alapján, a második oltást követő 5. hétre a keringő IgG szint szignifikánsan, átlagosan mintegy 30%-al csökken, ami a humorális immunválasz egyénekenként eltérő intenzitású lecsengésére utal.

A Pfizer-Biontech vakcinával történt kezdeti oltások idején 177 résztvevő, az emlékeztető oltás beadásakor 107 résztvevő került bevonásra. Az RBD-specifikus IgG antitestek szérumszintjét az oltások előtt, illetve az oltást követően meghatározott időpontokban mértük. Előzetes eredményeink szerint a korábban SARS-CoV-2-vel nem fertőzöttek esetében az első oltásra válaszul az IgG termelés lassan indult be, és csak röviddel a második oltás előtt, a 21. napon érte el a pozitív tartományt. Az első oltást követően az IgG-termelés a 28. napon érte el a csúcspontját, míg az emlékeztető oltást követően az IgG-szintek gyorsabban, de szignifikánsan alacsonyabb szinten tetőztek. A nemek, illetve a medián életkor alapján történő felosztás a maximális IgG-szintek tekintetében nem mutatott ki különbséget a csoportok között. A legtöbb résztvevőnél az IgG-szintek gyorsan csökkentek mind a kezdeti, mind az emlékeztető oltás után. Az emlékeztető oltás után 4 hónappal az IgG típusú antitestek a 28. napi IgG szintek százalékában mérve nagyobb arányban voltak jelen a keringésben. A COVID-pozitív esetek száma 4 hónappal az oltás után jelentősen magasabb volt az emlékeztető vakcina esetében. Összességben, az IgG-titerek alapján úgy tűnik, hogy a Pfizer-Biontech emlékeztető vakcina a kezdeti oltásokhoz képest hosszabb ideig tartó humorális immunválaszt biztosít, de ez nem jár együtt az új vírusvariánsokkal szembeni hatékonyabb védelemmel.

A fenti, tételes eredmények publikálása az *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *Scientific Reports*, *Journal of Sleep Research*, *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *Pathology and Oncology Research*, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* és a *PLoS One* c. folyóiratokban történt. E folyóiratok kettő kivétel (*Pathology and Oncology Research*, *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) Q1 besorolásúak.

Ezenfelül, az OTKA pályázat támogatásával összefoglaló közlemény is született. A közleményben részletesen tárgyaltuk a FENO- és a vér eosinophilszám-mérés diagnosztikai szerepét a légúti eosinophilia kimutatásában, és az eosinophil COPD, mint új fenotípus klinikai jelentőségét. A közleményt a *Biomedicines* c. folyóiratban publikáltuk, amely szintén Q1 besorolású nemzetközi folyóirat. A nemzetközi közlemények mellett számos hazai folyóiratban (*Medicina Thoracalis*, *Orvosi Hetilap*, *Medical Tribune*) is publikáltunk összefoglalókat.

Végül meg kell említeni, hogy a pályázatban leírt célkitűzések megvalósítását a COVID világjárvány és az emiatt fennálló egészségügyi veszélyhelyzet 2020 tavaszától közel 3 éven át számos formában nehezítette. A pályázatunk fókuszában lévő COPD-s betegek ambuláns forgalma csökkent, a bentfekvő betegek hozzáférhetősége korlátozottá vált, légúti minta (pl. köpet) gyűjtésére nem volt lehetőség, a mintagyűjtésben segédkező asszisztenseket oltópontokra vagy a COVID ellátásba átvezényelték, bizonyos mérések (pl. légzésfunkció, diffúziós kapacitás) elvégzését tesztekhez kötötték, amelyek megszervezésére viszont legtöbbször nem volt lehetőség. Egy ideig a kutatási helységek fizikai megközelítése is problematikus volt, és csak speciális járványügyi szabályok betartásával letett dolgozni. Mindezen tényezők következtében egyes altémák esetében a tervezett minták számát nem értük el vagy vérminták gyűjtésére kellett áttérnünk. Ezzel párhuzamosan ugyanakkor kutatómunkánk kiegészítéseként a SARS CoV-2 ellenes humorális immunválasz vizsgálatára is lehetőségünk nyílt.