

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Bene Zsolt

**A HE4 új gyulladásos biomarker szerepének és
bronchoepitheliális expressziójának vizsgálata
cisztás fibrózisban**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A HE4 új gyulladásos biomarker szerepének és
bronchoepithaliális expressziójának vizsgálata
cisztás fibrózisban**

Dr. Bene Zsolt

Témavezető: Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. A cisztás fibrózis és a betegség genetikai háttere.....	9
2.2. A CF-es tüdőbetegség patomechanizmusa	12
2.3. A CF jellemző klinikai tünetei.....	14
2.4. A CF laboratóriumi diagnosztikája.....	14
2.5. A CF-es tüdőbetegség kezelési lehetőségei	15
2.5.1. A mutációspecifikus CFTR modulátorok szerepe a CF terápiában.....	16
2.6. A CF-es tüdőbetegség monitorozásának lehetőségei	16
2.7. A légúti gyulladásal összefüggő biomarkerek cisztás fibrózisban.....	18
2.7.1. Biomarkerek a CF-es köpetmintákban.....	18
2.7.2. Biomarkerek a bronchoalveoláris mosófolyadékban.....	21
2.7.3. Biomarkerek szérumban és plazmában.....	22
3.1. A szérum HE4 vizsgálata potenciális diagnosztikai és prognosztikai biomarkerként CF-ben	29
3.2. A plazma HE4 szintek hatékonyságának analízise a CF kezelésének nyomon követésében	29
3.3. A fokozott HE4 expresszió patomechanizmusának és az intraepitheliális gyulladásal való kapcsolatának vizsgálata bronchoepitheliális sejtkultúrákban	30
4. Anyagok és módszerek.....	31
4.1 Betegek és kontrollok	31
4.2. Reagensok a sejtes kísérletekhez	36
4.3. Sejtkultúrák és kezelési körülményeik	36
4.4. Laboratóriumi mérések.....	37
4.5. Elektrofiziológia a CFTR-csatornán keresztül folyó kloridáram vizsgálatára	38
4.6. Össz RNS izolálás	39
4.7. Valós idejű kvantitatív PCR analízisek	39
4.8. Immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok	40
4.9. Etikai engedélyek.....	41
4.10. Statisztikai számítások.....	41
5. Eredmények.....	43

5.1. A szérumban HE4 koncentráció összehasonlítása CF-es gyermek és felnőtt betegekben, valamint nem CF-es tüdőbetegekben és kontroll csoportokban	43
5.1.1. Az első vizsgálatba bevont betegpopulációk főbb laboratóriumi jellemzői	43
5.1.2. CF-ben jelentősen emelkedett szérumban HE4 szintek mérhetők a CFTR gén variánsától függetlenül.....	44
5.1.3. A magas szérumban HE4 szoros összefüggést mutat a CF-es tüdőbetegség súlyosságával, a kóros légzésfunkcióval és az emelkedett CRP szinttel	46
5.1.4. A szérumban HE4 kapcsolatának vizsgálata a krónikus bakteriális kolonizációval és a CF-hez társuló egyéb komorbiditásokkal	49
5.1.5. A szérumban HE4 labor diagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálata CF-ben	49
5.1.6. Emelkedett HE4 mRNS szint mutatható ki CF-es hörgőnyálkahártya biopsziás mintákban.....	50
5.2. A HE4 plazmakoncentrációjának követése <i>ivacaftor</i> kezelés alatt álló CF-es betegcsoportokban	51
5.2.1. A három független, <i>ivacaftor</i> kezelt CF-es kohorsz legfontosabb demográfiai és klinikai jellemzői	52
5.2.2. A kiindulási plazma HE4 szintek szignifikánsan csökkentek <i>ivacaftor</i> kezelés alatt álló CF-es betegekben.....	52
5.2.3. A plazma HE4 szintje korrelációja a FEV ₁ % értékkel és a CRP koncentrációval <i>ivacaftor</i> kezelés alatt.....	54
5.2.4. A plazma HE4 szint képes jelezni a légzésfunkció javulását <i>ivacaftor</i> kezelés során CF-es betegekben.....	56
5.2.5. A plazma HE4 változás jelentősége már az <i>ivacaftor</i> kezelés korai szakaszában különböző súlyosságú légzésfunkció mellett.....	56
5.3. A fokozott HE4 expresszió mechanizmusának vizsgálata CFBE sejtekben <i>in vitro</i> körülmények között	59
5.3.1. A CFTR funkció befolyásolja a HE4 koncentrációt a CFBE 41o ⁻ sejtek felülszójában <i>in vitro</i>	59
5.3.2. A CFTR modulátorok részlegesen helyreállítják a klorid áramot a F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben	61
5.3.3. A LUM/IVA kezelés csökkenti a plazma HE4 szinteket a p.Phe508del-CFTR mutációra homozigóta CF-es betegekben.....	63
5.3.4. A TNF- α indukálja a HE4 mRNS szintet a CFBE 41o ⁻ sejt kultúrákban.....	64
5.3.5. A CFTR modulátorok hatással vannak az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivitására a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o ⁻ sejtekben	67
5.3.6. A CFBE 41o ⁻ sejt kultúrák felülszójában mért HE4 koncentrációt nemcsak az aktiválódott NF- κ B útvonal, hanem a CFTR diszfunkció is modulálja	70
6. Megbeszélés	74
7. Összefoglalás.....	86

8. Summary	87
9. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai.....	88
10. Irodalomjegyzék és publikációs lista	89
10.1. Irodalomjegyzék	89
10.2 Publikációs lista.....	106
11. Tárgyszavak – keywords	108
12. Köszönetnyilvánítás	109
13. Függelék.....	111

Rövidítések jegyzéke

ABC: ATP binding cassette

AMP: adenzin monofoszfát

ASL: airway surface liquid (légúti felszíni folyadékréteg)

AUC: area under the curve

BAL: bronchoalveoláris lavage (mosófolyadék)

CBAVD: congenital bilateral absence of the vas deferens (veleszületett ondóvezeték hiány)

CF: cisztás fibrózis

CFBE: cisztás fibrózisos bronchoepitheliális sejt

CFTR: Cisztás Fibrózis Transzmembrán Regulátor

CI: konfidenciaintervallum

COPD: krónikus obstruktív tüdőbetegségben

CRP: C-reaktív protein

DMSO: dimetil-szulfoxid

DTT: ditio-threitol

FEV₁: forced expiratory volume in 1 sec

FSK: forskolin

G-CSF: granulocyte colony stimulating factor

HE4: humán epididymis protein 4

HMGB1: high mobility group box 1 protein

IBMX: 3-isobuthyl-1-methylxanthine

ICM: intestinal current measurement

IGF-1: insulin-like growth factor 1

IL-1 β : interleukin-1-béta

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin-8

IVA: ivacaftor

LPS: lipopoliszacharid

LUM: lumacaftor

MAPK: mitogen-activated protein kinase

miR: mikroRNS

MMP: mátrix metalloproteináz

MMP-2: mátrix metalloproteináz-2

MMP-8: mátrix metalloproteináz-8

MMP-9: mátrix metalloproteináz-9

MPO: myeloperoxidáz

mRNS: messenger RNS (hírvivő RNS)

NE: neutrophil elasztáz

NE-APC: neutrophil elasztáz antiproteáz komplex

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NO: nitrogén-monoxid

NPD: nasal potential difference

NPV: negatív prediktív érték

OR: odds ratio (esély hányados)

PBMC: polimorphonukleáris sejt

PPV: pozitív prediktív érték

ROC: receiver operator characteristic

RT-qPCR: real-time quantitative PCR (valós idejű kvantitatív PCR)

SAA: serum amyloid A

sCD14: szolúbilis CD14

SD: standard deviáció

SLPI: secretory leukocyte protease inhibitor

sTREM: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1

TEZ: tezacaftor

TGF- β 1: transforming growth factor β 1

TLP: trypsin-like protease

TLR: toll-like receptor (toll-szerű receptor)

TLR4: toll-like receptor 4 (toll-szerű receptor 4)

TNF- α : tumor necrosis factor- α

YKL-1: chitinase 3-like 1

WFDC: whey acidic protein four-disulfide-core

1. Bevezetés

A cisztás fibrózis (CF) az élettartamot lerövidítő autoszomális recesszív módon öröklődő szisztémás megbetegedés, melynek hátterében a Cisztás Fibrózis Transzmembrán Regulátor (*CFTR*) gén több, mint 2000 patogén defektusa áll. A genetikai mutációk eredményeképpen a *CFTR* klorid/bikarbonát csatorna vagy nem expresszálódik az epithelsejtek felszínén, vagy kijut a sejtmembránba, de diszfunkcionális lesz, ami abnormális ion- és víztranszporthoz vezet. A CF klasszikus formája több szervet érintő megbetegedés, melyben a külső elválasztású mirigyek megváltozott, kóros minőségű váladéka olyan patológiás folyamatokhoz vezet, melyek az érintett szervek végleges károsodását okozzák. Legsúlyosabban a tüdő és a gasztrointesztinális rendszer érintett. Az utóbbi eltérések akár már csecsemőkorban kialakuló súlyos felszívódási zavarban és malnutrícióban nyilvánulnak meg. A CF-es légúti betegség progressziójában alapvető szerepet játszik a légutak öntisztulásának károsodása, az infekciók által provokált nagy mértékű neutrophil granulocytá jelenléttel együtt járó krónikus intrapulmonális gyulladás, és a *CFTR*-csatorna diszfunkció következményeként az immunrendszer folyamatainak kóros szabályozása is.

A CF-es betegek gondozása egy multidiszciplináris feladat, amelyben nagyon sokféle szakember vesz részt, ezért a gondozás csak jól szervezett CF centrumokban folyhat hatékonyan. Bár a betegek nyomon követése során - szisztémás megbetegedés lévén - holisztikus szemléletet kell követni, tekintettel arra, hogy az életkilátásokat leginkább a tüdőbetegség súlyossága határozza meg, a legnagyobb figyelmet a légzőszervek állapotának monitorozása és kezelése kapja. A CF ellátásban bekövetkező folyamatos és gyors fejlődésnek köszönhetően a múlt század derekán a csecsemőkorban halálhoz vezető betegségben ma már sokkal jobb életkilátásaik vannak a betegeknek. A legjobb ellátást nyújtó országokban a várható élettartam elérheti a 40-50 év közötti életkort is. Azonban a tüdőbetegség progressziója, melynek végstádiumában már csak a tüdőtranszplantáció segíthet, még a mai kezelési lehetőségekkel is jelentősen rövidíti a betegek élethosszát. A CF-es tüdőbetegség nyomon követése ezért kulcsfontosságú a gondozás során. Ugyanakkor a légúti érintettség detektálásának lehetőségei, különösen fiatalabb életkorban napjainkban is korlátozottak. A légúti gyulladást reprezentáló különböző gyulladásos mediátorok mérése vérből vagy légúti mintából lehetőséget teremthet a tüdő gyulladásos folyamatainak szoros követésére. Jelenleg kevés vérből meghatározható biomarker áll rendelkezésünkre a tüdőbetegség követésére vagy a különböző terápiás lehetőségek hatásosságának ellenőrzésére, ezért szükségesnek látszik új

gyulladásos biomarkerek azonosítása és azok expressziójának, valamint a betegség patomechanizmusában betöltött szerepének tisztázása.

A disszertációban a CF vonatkozásában egy új biomarkernek, a humán epididymis protein 4 (HE4) fehérjének a lehetséges szerepét vizsgáltuk a CF-es tüdőbetegség súlyosságának megítélésében és követésében, valamint a CF mutáció-specifikus farmakoterápiájának monitorizálásában. Emellett célunk volt, hogy részleteiben is megismerjük az abnormális HE4 fehérje expresszió mechanizmusát CF-es légúti epithelsejtekben, amelynek érdekében *in vitro* körülmények között fenntartott és kezelt sejt kultúrákat vizsgáltunk.

2. Irodalmi áttekintés

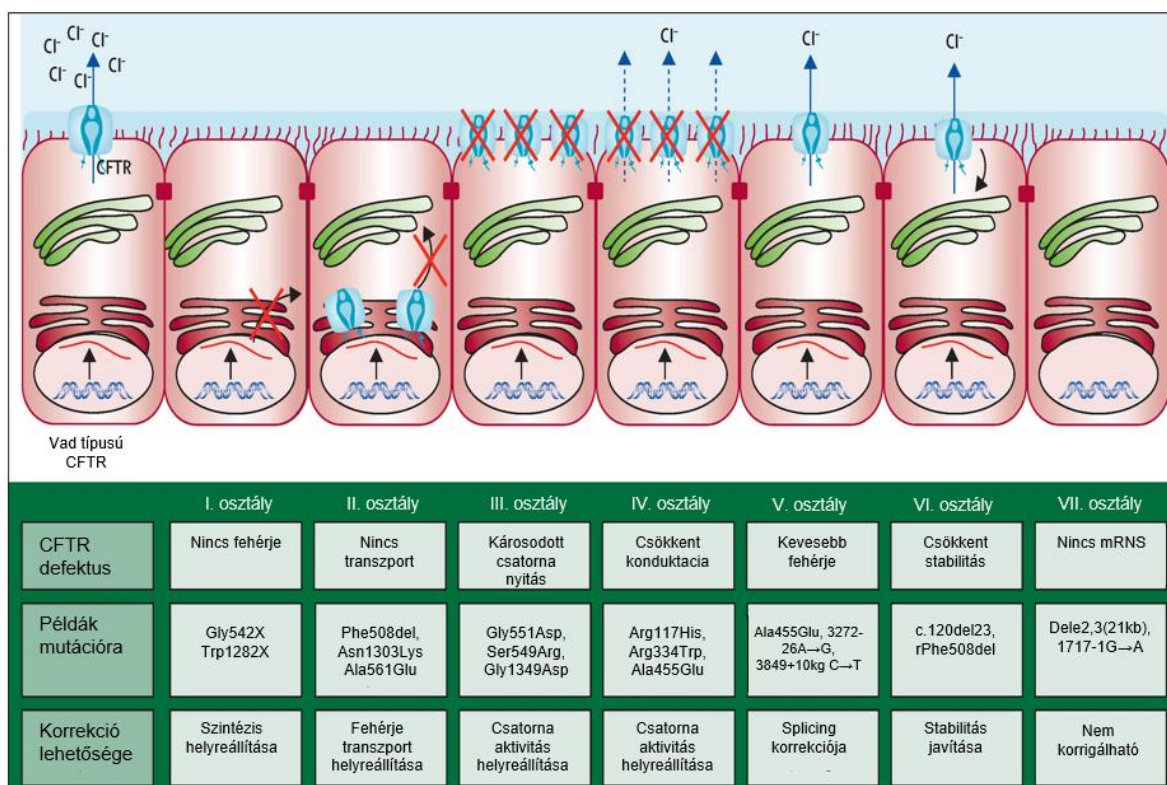
2.1. A cisztás fibrózis és a betegség genetikai háttere

A CF vagy régies néven mucoviscidosis a leggyakoribb életet lerövidítő, autoszomális recesszív öröklődésmentet mutató betegség a kaukázusi populációban, ahol az incidenciája kb. 1:2000-1:3000 közé tehető. Az európai populációban a hordozók, vagyis az egészséges heterozigóták aránya kb. 4% [1]. A betegséget a *CFTR* gén két kóros variánsának együttes jelenléte okozza. A 7-es kromoszóma hosszú karján található nagy méretű, kb. 200.000 bázispárból álló gén az 1480 aminosavból felépülő CFTR-csatornát kódolja, mely az ABC (ATP binding cassette) protein szupercsalád tagja. Ezen fehérjék közé olyan membrán proteinek tartoznak, melyek a különböző molekulák sejtmembránon keresztüli transzportjában vesznek részt. A CFTR funkcióját tekintve egy ciklikus adenosin monofoszfát (AMP) függő klorid (Cl^-)/bikarbonát (HCO_3^-) ioncsatorna, mely többnyire a polarizált epithelsejtek apikális membránján helyezkedik el. A szervezet különböző szöveteiben expresszálódik, többek között a tüdőben, a verejtékmirigyekben, a hasnyálmirigyben és az ondóvezetékben [2].

A *CFTR* gént 1989-ben azonosították [3]. Eddig több, mint 2000 mutációját írták le, melyek nem mindegyikének ismert a klinikai következménye, de közülük legalább 1500 bizonyítottan patogén [4]. Egyes populációkra a variánsok különböző előfordulási aránya jellemző. A legtöbb mutáció igen ritka előfordulást mutat, világszerte csak kb. 20 *CFTR* génmutáció éri el a 0,1%-os gyakoriságot, ezen túlmenően az egyes populációkra meghatározható az a 20-30 variáns, amely lefedi a betegekben kimutatható eltérések nagy részét [1]. Az európai, köztük a magyarországi betegpopulációban a leggyakoribb CFTR variáns a

p.Phe508del (F508del, a régi nómenklatúra szerint delta-F508), melyet hazánkban a betegek kb. 80-85%-a hordozza homozigóta vagy összetett („compound”) heterozigóta formában [4]. Ennek a mutációnak a lényege egy 3 bázispárt érintő deléción a gén 11-es exonjában, amely az aminosavlánc 508-as pozíciójában lévő fenilalanin kieséséhez vezet. A különböző mutációk eltérő mértékben okozhatják a CFTR mennyiségi és/vagy minőségi zavarát, ami alapvetően befolyásolja a klinikai tünetek spektrumát és a betegség súlyosságát [5].

A CFTR mutációkat funkcionális következményük mechanizmusa alapján jelenleg 7 osztályba soroljuk [6] (1. ábra).

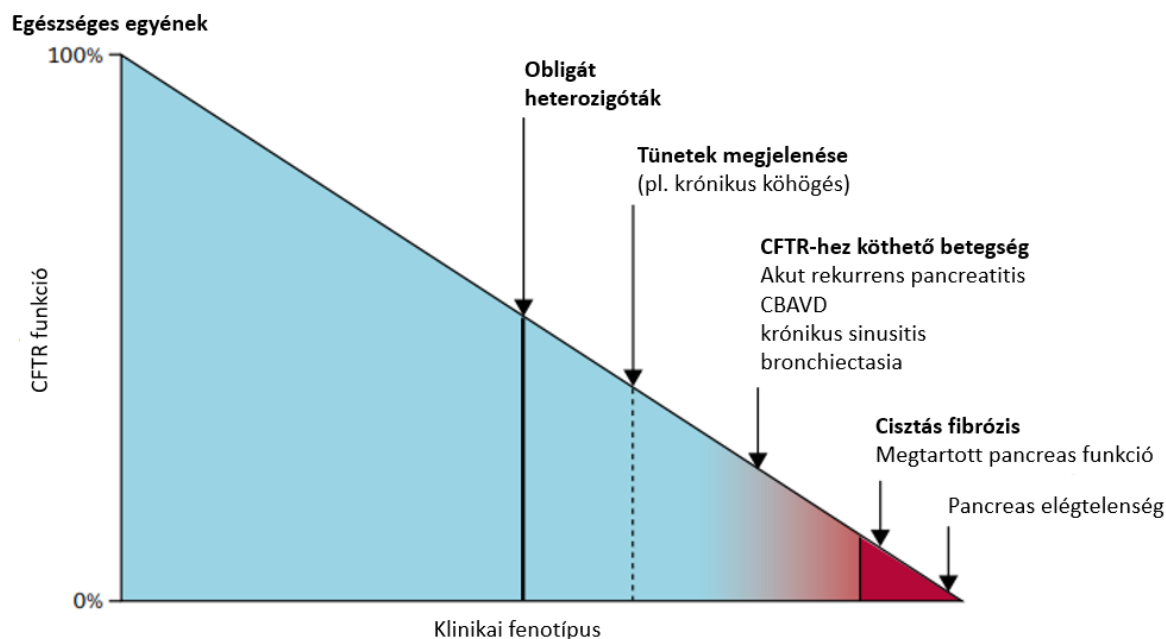


1. ábra: A CFTR mutációk különböző típusai. A CFTR defektus főbb mechanizmusai az alábbiak: a szintézis hiánya (I. osztály), a fehérjeérés zavara és korai degradáció (II. osztály), a csatorna károsodott szabályozása, alacsony nyitási frekvencia (III. osztály), az ioncsatorna csökkent konduktanciája (IV. osztály), a promotor vagy splicing eltérések miatti csökkent CFTR transzkripció (V. osztály), a sejtfelszíni CFTR-csatorna fokozott lebomlása (VI. osztály) és a CFTR mRNS hiánya (VII. osztály). Az utóbbi osztály mutációinak következménye ellen jelenleg nincs terápiás megoldás (De Boeck 2020-as közleményéből adaptálva [6]).

Egyes mutációk elsősorban a működő CFTR-csatorna csökkent mennyiségét okozzák, például az I. és V. osztályú mutációk a fehérjeszintézis zavarával járnak (pl. korai stop kodon,

csökkent transzkripció, stb.). A II. osztályba tartozó mutációk esetén a CFTR fehérje poszttranszlációs módosítása és a sejtmembránba történő transzportja károsodott. A III-IV. osztály mutációi a csatorna nyitási frekvenciájának, illetve konduktanciájának zavarát okozzák normális mennyiségű CFTR-csatorna mellett. A VI. típusba sorolt variánsok esetén a működőképes CFTR instabil, ezért fokozott a lebomlása a sejtmembránban, míg a VII. osztály mutációi esetén hiányzik maga a CFTR hÍrvivő RNS-e (mRNS) a sejtéből, ezért nem tud a CFTR egyáltalán expresszálni [6] (1. ábra).

A genotípus alapvetően, de nem kizárólagosan befolyásolja a betegség súlyosságát. Az I., II., III., VI. és VII. osztályú mutációk a hiányzó vagy minimálisan jelenlévő CFTR-csatorna funkció miatt rendszerint súlyos klinikai képet okoznak, míg a változó mértékű, reziduális sejtfelszíni CFTR aktivitással járó IV-V. osztályba sorolt defektusok esetén a klinikai lefolyás, a súlyosság és a szervi érintettség spektruma egyénenként nagy mértékben különbözhet [7, 8] (2. ábra). A klasszikus - súlyos CFTR géndefektussal járó - CF-ben sokszor már csecsemőkorban manifesztálódó többszervi érintettség jellemző, míg más mutációk esetén későbbi életkorban megjelenő, enyhébb tünetekkel járó lefolyással, vagy csak egy-egy szervrendszerre korlátozódó megbetegedéssel találkozunk, mint például bronchiectasia, krónikus sinusitis vagy rekurrens pancreatitis [5].

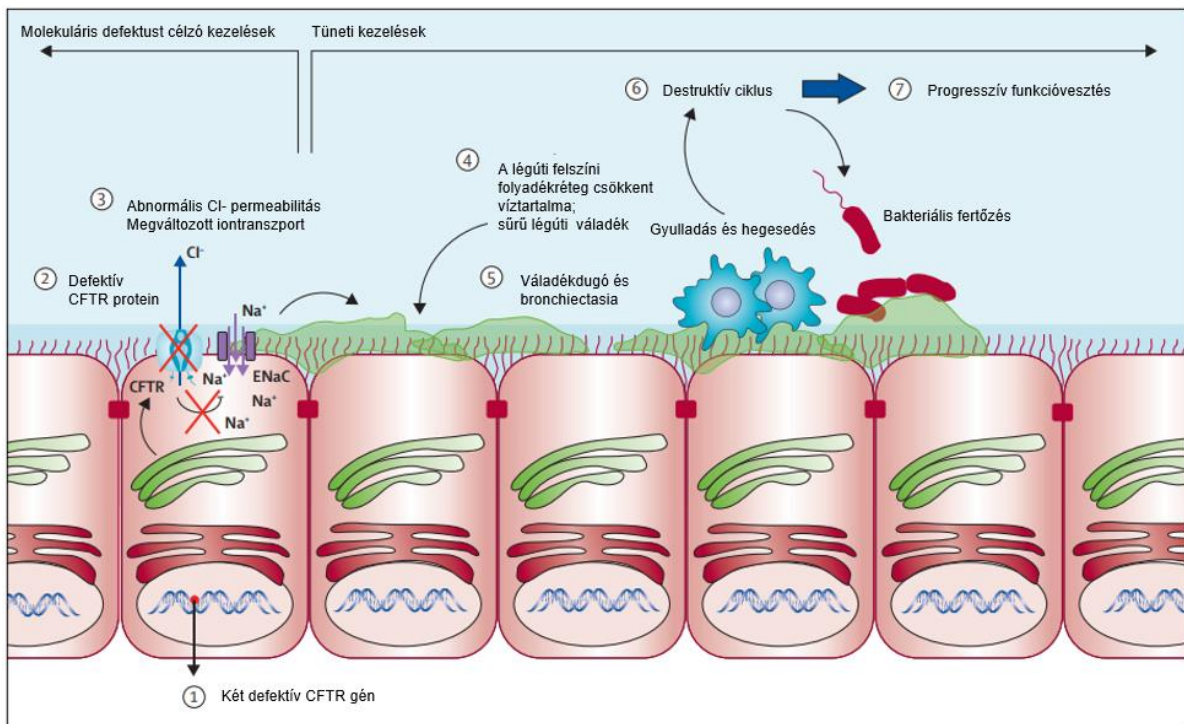


2. ábra: A CFTR funkció és klinikai fenotípus kapcsolata. A CFTR funkció csökkenésének mértékével fokozódik a tünetek súlyossága. A CFTR funkció mértéke, amely a normális működést biztosítja, függ az érintett szervtől is. (Bell és munkatársainak 2020-as közleményéből adaptálva [9]). Rövidítés: CBAVD: Congenital bilateral absence of the vas deferens, veleszületett ondóvezeték hiány.

2.2. A CF-es tüdőbetegség patomechanizmusa

A csökkent vagy abnormális CFTR funkció - a szabályozása alatt álló egyéb transzporterek révén - a Na^+ , a Cl^- és a HCO_3^- transzport zavarához vezet az epithelsejtekben, melynek következtében a külső elválasztású mirigyek epitheliális felszínén, így a légutakban, a gasztrointesztinális és az urogenitális traktusban megváltozik a szekrétumok minősége, ami az érintett szervek funkcionális károsodásához vezet. A korábbi elképzelések a Cl^- és az összefüggő víztranszport zavarának szerepét és a szekrétumok dehidrációját tartották elsődlegesnek a CF patomechanizmusában [10]. Újabb megfigyelések azonban a HCO_3^- szekréció zavarát és a szekrétumok csökkenő pH-jának savas irányba történő eltolódását is hangsúlyozzák [11]. A légutak öntisztulási működésében (mucociliáris clearance) központi szerepe van a normál összetételű felszíni folyadék rétegnek (airway surface liquid, ASL). Az ASL-ben megtalálható mucinok olyan fehérjék, amelyek összezsugorított állapotban szekretálódnak, és normális pH mellett történő kicsomagolásuk biztosítja a légúti váladék megfelelő viszkozitását. Ugyanakkor a CF-es savas közegben a légúti váladékban lévő mucinok összezsugorítottak maradnak, ami a víztartalomtól függetlenül is nagy mértékben rontja a mucociliáris clearance-t [11].

A betegség prognózisát, az életminőséget és a mortalitást leginkább a tüdőbetegség súlyossága határozza meg, melynek folyamatai már csecsemőkorban elkezdődnek [12]. A dehidrált, viszkózus váladék eleinte kislégúti obstrukcióhoz vezet, emellett kedvező környezetet teremt különböző kórokozók megtelepedésének. A leggyakoribb kórokozó fiatal korban a *Staphylococcus aureus*, az életkor előrehaladtával pedig a progressziót nagy mértékben fokozó *Pseudomonas aeruginosa* kolonizáció válik egyre gyakoribbá [12]. A bakteriális fertőzés gyulladást indukál, amit masszív neutrophil granulocytá beáramlás, valamint a gyulladáshoz citokinek, úgy, mint az interleukin-8 (IL-8), IL-6 és tumor necrosis factor- α (TNF- α) fokozott expressziója jellemez. A Toll-szerű receptorok (TLR) számos bakteriális termék, pl. a Gram-negatív baktérium eredetű lipopoliszacharid (LPS) felismerése révén, részben a nuclear factor-kappa B (NF- κ B) jelátviteli útvonalon keresztül, közvetítik a gyulladáshoz aktivációt [13]. A krónikus légúti gyulladás végső soron a hörgők, majd a tüdőszövet károsodásához, és következményesen légzési elégtelenséghez, valamint a tüdőfunkció végleges romlásához vezet (3. ábra).



3. ábra: A tüdőbetegség fő kóroki folyamatainak sematikus ábrázolása cisztás fibrózisban. A CFTR defektus a légúti hámfelszínen lévő folyadékréteg megváltozott összetételének köszönhetően károsítja a légúti clearance-t, és kedvező feltételeket teremt a kórokozók megtelepedésének, ami krónikus légúti gyulladásához, végsősoron szöveti károsodáshoz és progresszív funkcióromláshoz vezet. A folyamat elején beavatkozó, molekuláris defektus helyreállítására törekvő (CFTR-specifikus) terápiák megelőzhetik a végstádiumú tüdőbetegségig, a tüdőfibrózishoz vezető progressziót. (De Boeck és Amaral 2016-os közleményéből adaptálva [14]).

Meggyőző adatok utalnak arra, hogy a CF-re jellemző fokozott gyulladásos válasz a légutakban nem kizárólag szekunder módon, tehát infekciók hatására alakul ki, hanem szerepet játszik a defektív CFTR-hez köthető pro-inflammatorikus folyamatok is. A CFTR diszfunkció számos immunológiai funkció kóros regulációjához vezet, mint pl. az alacsonyabb nitrogén-oxid (NO) szintézis az alsó légutakban, anti-inflammatorikus és antioxidáns mechanizmusok csökkent működése, valamint a macrophagok gátolt sejtölő aktivitása [13]. Ezen túlmenően az epithelsejtekben a mitogen-activated protein kinase (MAPK) fehérje és az NF- κ B-dependens jelátviteli útvonalak fokozott aktivitása is jellemző [15]. Hunter és munkacsoportja korábban kimutatta, hogy a vad típusú CFTR-csatorna – eddig még nem pontosan ismert mechanizmussal – gátló hatást fejt ki a bazális és a TNF- α által indukált NF- κ B útvonal aktivitásra légúti epithelsejtekben, míg a CFTR ioncsatorna szelektív funkció gátlása jelentősen növelte az NF-

κB jelátvitel aktivitását. Mindezek alapján a CFTR gyulladáscsökkentő hatásának kifejtéséhez a fehérje ép csatornafunkciója látszik szükségesnek [16]. Bár megszületéskor még csak enyhe gyulladás mutatható ki a CF-es légutakban, a kóros immunológia szabályozási folyamatok és a kórokozók elleni nem effektív védekezés eredményeképpen az igen hamar bekövetkező pulmonális fertőzések hatására a normálisnál intenzívebb gyulladásos válasz alakul ki, amit a neutrophil granulocyta dominanciája és a tüdőkárosodással összefüggő fokozott neutrophil elasztáz (NE) aktivitás jellemez [15, 17].

2.3. A CF jellemző klinikai tünetei

A leggyakoribb légúti tünetek csecsemőkorban a szapora légzés, epizodikus nehézlélegzés, elhúzódó köhögéses epizódok, míg későbbi életkorban a krónikus köhögés dominál gennyes köpetürítéssel, előrehaladott állapotban pedig az emphysemás mellkas, a dobverőujjak, a csökkent fizikai terhelhetőség és a fokozatosan romló légzésfunkciós értékek jelzik a tüdőbetegség progresszióját. A folyamatos morfológiai és funkcionális progressziót a légúti infekciók súlyosbodásával és klinikai állapotromlással jellemezhető légúti akut exacerbációk tartják.

A külső elválasztású pancreas mirigysejtek diszfunkciójának következményei gyakran már kora csecsemőkorban megnyilvánulnak: az újszülöttek meconium ileusa, felszívódási zavar jelei (pl. zsíros széklet, haspuffadás, gyarapodási zavar) lehetnek a CF első tünetei. Az egyéb extrapulmonális manifesztációk közül a krónikus sinusitis, a cirrhosishoz vezető hepatobiliáris betegség, a serdülőkorra kialakuló diabetes mellitus és a férfiak infertilitása említendő [18].

2.4. A CF laboratóriumi diagnosztikája

A CF diagnózisának alappilléreit a klinikai gyanú felismerése (klinikai tünetek, családi anamnézis és/vagy az újszülöttkori szűrés pozitív eredménye alapján) és a CFTR diszfunkció bizonyítása jelenti. Ez utóbbi igazolható kórosan magas verejtékklorid koncentráció (> 60 mEq/L) két, egymás utáni időpontban történt mérésével, illetve két, *transz*-helyzetű patogén *CFTR* mutáció azonosításával [19]. Mára hazánkban is rutinszerűen történik a teljes *CFTR* gén szekvenálása, mely képes $> 98\%$ -os szenzitivitással detektálni a kóros allélpárt [20, 21]. A mutációanalízis kiemelt szerepet kapott nemcsak a végső diagnózis felállításában és a

prognózisbecslésben, hanem az új mutációspecifikus gyógyszeres kezelési lehetőségek kiválasztásában is [9]. Amennyiben a rutin diagnosztikai vizsgálatok nem konklúzív eredményt adnak (pl. CF-re jellemző klinikai kép ellenére heterozigóta genotípus vagy intermedier verejtékklorid érték), a CFTR fehérje funkcionális vizsgálatai segíthetnek. Ezek közül az *in vivo* végezhető NPD (nasal potential difference) vagy az *ex vivo* végzett ICM (intestinal current measurement) tesztek az elfogadott módszerek, bár a kivitelezés technikai nehézségei miatt még kevésbé terjedtek el a klinikai gyakorlatban [19].

2.5. A CF-es tüdőbetegség kezelési lehetőségei

A CF-es betegek gondozása multidiszciplináris megközelítést igényel. A kezelési lehetőségek eddig döntően a betegség következményeinek elhárítására irányultak. A terápia legfőbb céljai a tüdőbetegség progressziójának és a légzésfunkció romlásának fékezése, valamint a megfelelő energetikai állapot elérése és fenntartása, így az életminőség javítása. A gyógyszeres beavatkozás alappillérei a komplex légúti terápia, az infekció kontroll, a táplálásterápia, a gyulladáscsökkentő kezelés és a napjainkban – már hazánkban is egyéni elbírálás alapján megigényelhető - *CFTR* mutáció specifikus farmakoterápia. A napi rendszerességgel alkalmazott inhalációs váladékoldó kezelések (pl. hipertóniás sóoldat, DNáz oldat inhalációja) és a mellkasi fizioterápia a légúti váladék hatékony eltávolítását, az agresszív és hosszú ideig alkalmazott antimikrobás kezelések (szisztémás és inhalatív antibiotikumok) pedig a légúti fertőzések előrehaladásának megelőzését vagy kezelését célozzák [22]. A légúti gyulladás csökkentését célzó kezelési lehetőségek közül jelenleg a nem szteroid gyulladáscsökkentő *ibuprofen* és az anti-inflammatorikus hatással is bíró antibiotikum, az *azithromycin* hosszútávú alkalmazása elfogadott CF-ben. Ezen terápiák csökkentik a légzésteljesítmény romlásának ütemét és a légúti exacerbáció kockázatát [23, 24]. Bár a szisztémás kortikoszteroidok alkalmazása során is javulhat a légzésteljesítmény, az eredmény fenntartásához folyamatos adásukra lenne szükség, ami viszont jelentős mellékhatásokkal jár (pl. növekedési elmaradás, glükóz intolerancia). Az inhalatív kortikoszteroidok alkalmazásának randomizált placebokontrollált vizsgálatokban nem mutatkozott előnye. Így sem a szisztémás, sem az inhalatív kortikoszteroidok rutinszerű használata nem javasolt CF-ben [15].

A betegek tápláltsági állapota a túlélés független rizikófaktora CF-ben, így a légúti állapotjavulást célzó kezeléseknél nem kisebb jelentőségű a táplálásterápia. A megfelelő energetikai állapot a hiányzó pancreas enzimek pótlásával és magas kalória tartalmú étrend,

illetve speciális tápszerek biztosításával, vagy akár esetenként szondatáplálással tartható fenn [25].

2.5.1. A mutációspecifikus CFTR modulátorok szerepe a CF terápiában

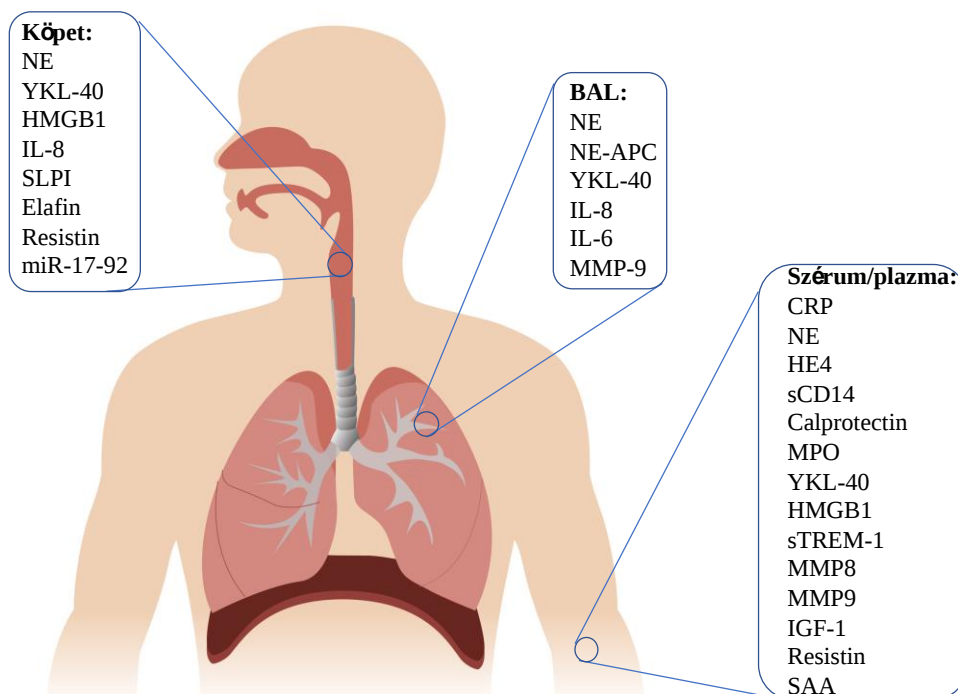
A kezelési stratégiák az elmúlt évtizedben olyan gyógyszeres lehetőségek irányába fordultak, amelyek a reziduális CFTR aktivitással járó mutációk egy részénél képesek fokozni a működő CFTR-csatorna mennyiségét a sejtmembránon (korrektorok), vagy javítani a sejtfelszínre expresszált CFTR ioncsatorna funkcióját (potenciátorok) [26]. A CFTR potenciátor *ivacaftor* (Kalydeco®) a kloridcsatorna nyitási frekvenciáját fokozza, így eredményesen alkalmazható a III. osztályú ún. kapumutációt (pl. G551D, p.Gly551Asp) hordozó CF-es betegekben [27]. A CFTR korrektorok, mint például a *lumacaftor*, *tezacaftor* vagy *elxacaftor* a csatornafehérje intracelluláris érési folyamatait és a sejtfelszínre való kijutását fokozzák. A CF-es betegek többsége által hordozott p.Phe508del mutáció esetén a CFTR defektus molekuláris mechanizmusa összetettebb, a fehérje érési folyamatai, abnormális csatornanyitás és a fokozott „turnover” is szerepet játszik. Így nem volt igazán meglepetés, hogy sem az *ivacaftor*, sem a korrektorok önmagukban nem voltak kellően hatásosak ezekben a betegekben. Ugyanakkor egy korrektor és egy potenciátor molekula kombinált alkalmazása már hatásosabb kezelési lehetőséget jelentett [28-32]. A *lumacaftor/ivacaftor* (Orkambi®) [28-30] vagy a *tezacaftor/ivacaftor* (Symdeco®, Symkevi®) a p.Phe508del homozigóta betegekben [31, 32], míg a legújabb hármas kombináció, a *tezacaftor/elxacaftor/ivacaftor* (Kaftrio®) már a CF-es betegek többségét kitevő p.Phe508del összetett heterozigóta genotípus esetén is hatásosnak bizonyult [33, 34]. A CFTR modulátorok korai, még a kifejezett strukturális hörgő- és tüdőkárosodás bekövetkezése előtt történő bevezetése jelentősen lassítja a tüdőbetegség progresszióját, csökkenti a légúti akut exacerbációk, a kórházi kezelések és az antibiotikum kezelések gyakoriságát, ráadásul az extrapulmonális következményeket is mérsékli, többek között javítja a betegek tápláltsági állapotát [27-34].

2.6. A CF-es tüdőbetegség monitorozásának lehetőségei

A CF-es betegek nyomon követésének fő céljai a beteg általános klinikai és tápláltsági állapotának felmérése, a tüdőbetegség progressziójának követése, az infekciók és a légúti exacerbációk korai felismerése, valamint az egyéb extrapulmonális manifesztációk követése. A

légúti betegség monitorozására mikrobiológiai, radiológiai, légzésfunkciós és laboratóriumi vizsgálatok állnak rendelkezésünkre. A tüdőbetegség előrehaladását egyik legjobban jelző, leggyakrabban hivatkozott paraméter a légúti obstrukció mértékét kifejező FEV₁ (forced expiratory volume in 1 sec, az elvárt érték %-ában kifejezve), melyet spirometriával mérnek. A FEV₁ % csökkenése prediktív értékkel bír a pulmonális exacerbáció, a bakteriális kolonizáció, és az esetleges elhalálozás előrejelzésében, míg csökkent értéke jól korrelál a tüdőbetegség előre haladásával [35, 36]. Ugyanakkor fiatal CF-es betegekben, valamint enyhe tüdőérintettség esetén nem elég érzékenyen követi az intrapulmonális folyamatok változásait és bizonyos terápiás beavatkozások hatékonyságát, ráadásul kisgyermekeknél a spirometria sok esetben technikai nehézségekbe is ütközik [36]. A CFTR modulátor kezelések alatt a verejtékklorid koncentráció gyors csökkenése indirekt módon igazolja a javuló CFTR funkciót [27, 29]. Elegendő mennyiségű verejtékminta gyűjtése csecsemőkorban azonban újabb technikai nehézséget jelenthet. A verejtékklorid koncentráció mérés értékelését ráadásul nehezíti a nagy mértékű intra- és interindividuális 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].

Tekintettel arra, hogy a CF-es légúti betegség patomechanizmusának alapvető folyamatait jelenti a krónikus légúti gyulladás, a betegség követésének fontos lehetőségét adhatja a gyulladásos mediátorok detektálása vérből vagy légúti felszínről származó mintákból (köpet és/vagy bronchoalveoláris mosófolyadék, BAL) (4. ábra). Az elmúlt két évtizedben számos klinikai tanulmány jelent meg azzal kapcsolatban, hogy a fenti folyamatokra érzékeny és specifikus biomarkerek mennyire alkalmasak a pulmonális gyulladás korai detektálására és előrejelzésére. Az alábbiakban különböző mintatípusokból analizált laboratóriumi paraméterekről gyűjtöttük össze a legfontosabb ismereteket.



4. ábra: A köpet, BAL és szérum/plazma mintákban mérhető, a CF-es tüdőbetegség, illetve a CF-hez társuló gyulladásos folyamatok követésére alkalmas biomarkerek. 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.

2.7. A légúti gyulladással összefüggő biomarkerek cisztás fibrózisban

2.7.1. Biomarkerek a CF-es köpetmintákban

A biomarkerek köpetmintából történő kimutatása esetén szem előtt kell tartani néhány fontos technikai szempontot, ami a vizsgálatok kivitelezését és értékelését nehezítheti. A köpetminta levétele ugyan nem egy invazív módszer, de szoros együttműködést igényel a beteg részéről, így kisgyermekkorban nem jön szóba releváns mintavételi lehetőségként. A köpetmintát ráadásul azonnal fel kell dolgozni a begyűjtést követően [40], mivel a nem megfelelő szállítási körülmények preanalitikai hibát okozhatnak [41]. A köpetben számos pro-inflammatorikus citokin (pl. IL-8) szintje mérhető, ugyanakkor nagy intra-individuális variabilitást mutathat akár stabil állapotú CF-es betegekben is, melynek oka nem teljesen

tisztázott [42]. A gyulladásos mediátorok koncentrációja egyébként attól is függhet, hogy a tüdő milyen súlyosan érintett részéből származik a minta [40]. Bár az egységes mintavételi protokollok és mérési eljárások hiányában a rutin klinikai gyakorlatba nem került bevezetésre a biomarkerek köpetben történő meghatározása [43], egyes gyulladásos mediátorok mérése alkalmas a légzésfunkció romlásának előre jelzésére, valamint terápiás sémák hatásának monitorizálására.

Neutrophil elasztáz

A légúti gyulladás egyik legérzékenyebb biomarkere CF-ben az aktivált neutrophil granulocyták által termelt NE, egy destruktív szerin proteáz, melynek magas szintje a köpetben a hosszú távú légzésfunkció romlás előrejelzője volt, bár a túléléssel nem mutatott összefüggést [44, 45]. Tizennégy napos antibiotikum kezelés után a köpet NE aktivitás jelezte a kedvező klinikai választ, míg a perzisztáló magas szintje további exacerbációk fokozott kockázatával járt [46]. Hat hónapos orális *azithromycin* kezelés krónikus *P. aeruginosa* fertőzött betegekben javuló FEV₁ %-os értékkel párhuzamosan csökkent NE aktivitással járt a köpetben a placebót kapott kontrollokhoz viszonyítva [47]. *Ivacaftorral* kezelt G551D-CFTR (p.Gly551Asp) mutációt hordozó CF-es betegekben a köpet NE aktivitás jelentősen nem változott [27], míg más vizsgálatban a köpet NE szint - az IL-1 β és IL-8 koncentrációkkal együtt - a csökkenő baktérium kolonizációval párhuzamosan szignifikánsan csökkent már az *ivacaftor* kezelés első hetében [48]. Ráadásul a krónikus *P. aeruginosa* fertőzött betegekben ezen biomarkerek akár 2 éven keresztül tapasztalt alacsonyabb szintje jól jelezte a gyulladás tartós csökkentését az *ivacaftor* terápia által [48].

Egyéb szerin proteázok és antiproteázok

A neutrophil granulocyták erőteljes 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 öntisztulásához, fokozott gyulladásához és károsodott immunválaszhoz vezet [49]. Az epitheliális eredetű TLP (trypsin-like protease) aktivitás fordítottan arányos volt a FEV₁ %-kal és azoknál mérték magasabb értékeket, akik a méréstől számított 5 éven belül nem éltek túl a betegséget [50]. Az antiproteáz tulajdonsággal bíró ún. whey acidic protein four-disulfide-core (WFDC) fehérjék

közül a köpetben az SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) fehérje nem mutatott különbséget a CF-es és az egészséges egyének között, viszont a FEV₁ %-os értékekkel pozitív korrelációt mutatott [44]. Más szerzők csökkent köpet SLPI szintet találtak a nem kezelt CF-es betegekben a kontrollhoz képest, ami növekedett antibiotikum kezelést követően [51]. Végül az Elafin, ami szintén a WFDC fehérjecsalád tagja és hasítja a NE-t, alacsonyabb szintet mutatott *P. aeruginosa* fertőzött CF-es betegekben [52]. Ugyanakkor a korábbiakban ezen proteinek közé tartozó HE4-et mások még nem vizsgálták.

Citokinek

A CF-es légúti betegséget rekurrens infekciók és krónikus gyulladás jellemez, mely neutrophil granulocytá aktivációval és pro-inflammatórikus citokinek (pl. IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β) fokozott termelődésével jár együtt [53, 54]. Ezek a mediátorok nem csak a patomechanizmusban töltnek be funkcionális szerepet, de potenciális biomarkerként is tekinthetünk rájuk CF-ben [40]. A köpet IL-8 szintje szignifikánsan csökkent pulmonális exacerbáció intravénás antibiotikum kezelését követően, és a FEV₁ %-os értékkel fordítottan korrelált [55]. Hasonló eredmények születtek később az IL-1 β vonatkozásában is, amely a szérum C-reaktív proteinnel (CRP) is erős összefüggést mutatott [56]. Egy korai vizsgálatban a köpet IL-6 tartalma szintén magasabb volt a CF-es betegekben a kontrollokhoz képest, és akut exacerbáció alatt a FEV₁ %-kal fordított irányban korrelált [57]. Mások azt találták, hogy az IL-6 volt az egyetlen a köpetben, mely nagy mértékben csökkent 4 hetes *ibuprofen* kezelést követően [42]. Ebben a vizsgálatban azonban a köpet gyulladásos paraméterei igen nagy egyének közötti és egyénen belüli variabilitást is mutattak. Ezért mindenképpen figyelembe kell venni ezt olyan klinikai vizsgálatok tervezésekor, ahol a köpet gyulladásos biomarkereit végpontként alkalmazzák [42].

A HMGB1 (high mobility group box 1 protein) fehérje kromatinkötő nukleáris faktorként és szekretált citokinként is működik [58]. A HMGB1-et az aktivált monocyták és makrophágok szekretálják, de nagy mennyiségben kiszabadulnak az elhalt sejtekből is [58]. Ennek a fehérjének antitesttel történő semlegesítése jelentősen csökkentette a neutrophil beáramlást és kemotaxist, ami arra utal, hogy a HMGB1 hozzájárul a CF-es légúti gyulladásához és a tüdőmatrix degradációjához [59]. Magas koncentrációja mérhető a CF-es betegek köpet és szérum mintáiban egyaránt szemben az egészséges személyektől származó mintákkal [58, 59]. Fontos kiemelni, hogy a köpetben mért szintje viszont szorosabb összefüggést mutatott a

légzésfunkció romlásával, mint a szérumszintje [58]. Összeségében a HMGB1 fehérje egy hasznos biomarkernek mutatkozott az első pulmonális exacerbáció előrejelzésében és hasonló jövőbeni történések, továbbá a felmerülő tüdőtranszplantáció szükségességének előrejelzésében egy következő 5 éves periódusban [60].

A neutrophil granulocyta aktivációja során egy másik fehérje, a YKL-40 (chitinase-3-like protein) is termelődik, mely a CF-es köpetben magas szintet mutatott, és a légúti obstrukció súlyosságával hatékonyan korrelált [61]. A monocyták és neutrophilek által termelt Resistin fehérje a TLR4 receptorhoz kötődve fejti ki a hatását, így az NF- κ B útvonal egyik induktora. A CF-es köpetben nemrégiben emelkedett szintjét mérték, mely negatívan korrelált a légzésfunkcióval és szorosan összefüggött a CF-hez társuló diabétesszel [62].

2.7.2. Biomarkerek a bronchoalveoláris mosófolyadékban

A bronchoalveoláris mosás során nyert BAL folyadék szintén egy alkalmas mintatípus a légúti gyulladást közvetlenül reprezentáló mediátorok mérésére. A BAL hátrányát viszont a mintavétel invazivitása jelenti. A tüdőnek azt az adott anatómiai régióját reprezentálja, ahonnan a minta származik, ezen belül a kislégutak és alveolusok állapotát tükrözi, így flexibilis bronchoscoppal szelektíven vizsgálható a tüdő egy-egy része [63]. Legfőbb előnye, hogy korai és enyhe lefolyású CF-es tüdőbetegség esetén is alkalmazható [64]. A BAL gyulladással és infekció asszociált biomarkereinek alkalmazhatóságát így elsősorban a csecsemő- és kisgyermekkor jelenti, amikor a légúti gyulladás az ezidáig tünetmentes és intakt légzésfunkcióval bíró betegekben is érzékenyen követi a légutak állapotában bekövetkező változást [63]. Ugyanakkor a BAL eredetű mediátorok hasznossága nem bizonyított a CF-es tüdőbetegség longitudinális követésében [65], de alkalmasak lehetnek a CF-es és nem CF-es egyének elkülönítésére [66, 67], továbbá a különböző fenotípust mutató CF-es betegek megkülönböztetésére [68-71], valamint a terápiás eljárások monitorizálására [66, 72].

Citokinek és neutrophil granulocyta eredetű egyéb markerek

A CF-es betegekből származó BAL minták magas citokin tartalmúak. Ezen citokinek (pl. IL-8, IL-6, stb.) expresszióját maguk a baktériumok és produktumaik, illetve a pro-inflammatorikus citokinek által aktivált NF- κ B útvonal indukálja különböző sejttípusokban [64]. Erre tipikus példa a BAL IL-8 és a NE szintek szoros összefüggése az infekciós státusszal

[66]. Továbbá, a fibrotikus folyamatokat elősegítő transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) a CF-es BAL-ban szintén emelkedett a nem CF-es állapothoz képest, és szintje összefüggött a légzésfunkciós romlás mértékével és a kórházi kezelés szükségességével [73]. Magas NE, mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2) és MMP-9 aktivitás szinteket mértek CF-es bronchiectasiában a nem CF eredetű bronchiectasiás esetekhez képest [67]. Ugyanakkor a BAL-ban mért IL-1 α mutatta a legerősebb összefüggést a strukturális tüdőkárosodással egy nagy CF-es gyermekkohorszban [71]. A tüdőbetegség 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 CF betegséggel diagnosztizált csecsemők jelentős hányadát aktív pulmonális gyulladás jellemzi: az esetek 30%-ában emelkedett NE aktivitás mérhető, 20%-ban légúti infekció van jelen, míg 80%-ban CT vizsgálattal kimutatható a strukturális tüdőkárosodás jelei már 3 hónapos korban [69]. Fontos hangsúlyozni, 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 (odds ratio, OR: 3,02), mely 12 hónapos korra hétszeres, 3 éves korra négyszeres kockázatot jelent [70]. Különösen igaz ez azokra a CF-es kisgyermekekre, akiknél a felső és alsó légutakból egyaránt kitenyészik a *P. aeruginosa*, magasabb NE és IL-8 szintek, valamint emelkedett neutrophil sejtszám mutatható ki szemben azokkal, akiknek csak a felső légútja kolonizált [68]. Ráadásul a *S. aureus* és a *P. aeruginosa* együttes jelenléte additív hatású ezen biomarkerek szintjére [68]. Végül a BAL YKL-40 koncentrációja szintén jól tükrözte a korai pulmonális gyulladásos és infekció státuszt [74].

A jelenleg ismert biomarkerek limitált használhatósága miatt próbálkozások történtek új proteinek BAL-ból történő identifikálására a CF-es tüdőbetegség követése céljából. Iskoláskor előtti gyermekek BAL mintáiban a különböző analitok komplex tömegspektrometriás analízise során összesen 93 metabolitot találtak a neutrophilekhez köthető gyulladással összefüggésben, és közülük számos molekula prediktív értékkel bírt a strukturális károsodás szempontjából [75].

2.7.3. Biomarkerek szérumban és plazmában

A légúti gyulladás monitorizálásának talán legkézenfekvőbb és analitikailag leginkább standardizálható és reprodukálható módját a biomarkerek vérmintából - plazmából vagy

szérumból - történő meghatározása jelenti. A vérminták levétele általánosságban könnyű és kevésbé invazív eljárás bármely életkorban és betegségcsoportban [76, 77]. A különböző véralapú biomarkerek a CF-es tüdőbetegség eltérő aspektusaiban a klinikum számára hasznos információt hordoznak:

1. megbízhatóan megkülönböztetik a CF-es beteget a nem CF-es személytől [61, 78],
2. követik a CF-es tüdőbetegség súlyosságát [79],
3. előre jelzik az akut pulmonális exacerbáció kialakulását [80-82],
4. jelentős koncentráció változást mutatnak a pulmonális exacerbáció lezajlása alatt [83, 84], és
5. követik a gyulladás mértékének csökkenését antibiotikum vagy CFTR-specifikus kezelés alatt és után [83, 85-88].

Ugyanakkor a gyulladásos biomarkerek szintjét a masszív nem légúti gyulladás befolyásolhatja, ami csökkentheti ezen biomarkerek specifitását a CF-es tüdőbetegség követése szempontjából [40]. Ennek ellenére számos általános gyulladás specifikus biomarker került letesztelésre CF-ben, hogy a fentiekben összefoglalt legfontosabb diagnosztikai szempontokból alkalmazzák őket (1. táblázat).

Biomarker	Betegek száma	Korcsoport	Egészséges és CF-es egyének elkülönítése	Összefüggés a tüdőbetegség súlyosságával (FEV ₁)	Összefüggés <i>P. aeruginosa</i> fertőzéssel	Jelentős változás PEx esetén	PEX előrejelzése	Kezelés monitorizálása (regimen, időtartam)	Referencia
CRP	26	13-45 év	+			+		ciprofloxacin, 14 nap	89
CRP	63	39.8 ± 6.3 év		+					90
CRP	55	1 - 16 év		+	+				91
CRP	51	33 ± 13.6 év		+			+		92
CRP	88	14 ± 1.8 év		+					79
CRP	67	6 - 18 év					+		82
CRP	53	32.8 ± 1.8 év					+	i.v. ab, 21 nap	93
CRP	260	6 - 18 év		+				azithromycin, 28 / 128 nap	94
CRP	43	33.7 ± 12.6 év					+	i.v. ab, 5 nap	81
CRP	7	9 - 42 év						IVA, 6 hónap	87
IL-6	22	34.8 ± 12.9 év		+				i.v. ab, 14 nap	84
IL-6	12	20 - 26 év		+				i.v. ab, 14 nap	57
IL-6	103	23.5 ± 9.9 év					+	i.v. ab, 28 nap	85
IL-8	53	32.8 ± 1.8 év					+	i.v. ab, 21 nap	93
IL-8	103	23.5 ± 9.9 év					+	i.v. ab, 28 nap	85
IL-1β	21	23-50 év						IVA/LUM vagy IVA/TEZ, 1-3 hónap	88
IL-18	21	23-50 év						IVA/LUM vagy IVA/TEZ, 1-3 hónap	88
TNF-α	21	23-50 év						IVA/LUM vagy IVA/TEZ, 1-3 hónap	88
TGF-β1	40	12.2 ± 0.7 év			+		+	i.v. ab, 14 nap	83
NE-APC	60	17 - 46 év	+	+					78
NE-APC	88	14 ± 1.8 év		+					79
NE-APC	26	13-45 év	+			+		ciprofloxacin, 14 nap	89
NE-APC	22	N/A				+		i.v. ab, 15 nap	95
MPO	55	1 - 16 év		+	+				91
MPO	260	6 - 18 év		+				azithromycin, 28 / 128 nap	94
MPO	27	12.2 ± 4.0 év			+			i.v. ab, 1 év	96
MPO	67	6 - 18 év					+		82
MMP8	54	31 ± 8.8 év	+			+			97
MMP8	54	31.6 ± 6.7 év		+		+			98
MMP9	54	31 ± 8.8 év	+			+			97
MMP9	54	31.6 ± 6.7 év		+		+			98
Calprotectin	260	6 - 18 év		+				azithromycin, 28 / 128 nap	94
Calprotectin	40	9.8 ± 3.1 év					+	azithromycin, 28 nap	86
Calprotectin	27	23.9 ± 7.6 év		+			+	TOBR + CEFT/MPR, 28 nap	99
Calprotectin	57	26.4 ± 7.7 év		+			+		100
Calprotectin	88	14 ± 1.8 év		+					79
YKL-40	59	22 ± 15 év	+	+					61
YKL-40	54	31 ± 8.8 év	+			+			97
HE4	77	1 - 17 év	+	+		+			101
HE4	60	20.6 ± 12.2 év		+				IVA, 1-6 hónap	102
sCD14	30	20 - 37 év					+		80
SAA	260	6 - 18 év		+				i.v. ab, 28 / 128 nap	94
SAA	88	14 ± 1.8 év		+					79
SAA	67	6 - 18 év					+		82

1. táblázat: Vérmintából lement biomarkerek legfontosabb klinikai tulajdonságai különböző CF-es betegcsoportokban. Rövidítések: CF: cisztás fibrózis, FEV₁: erőltetett kilégzési térfogat 1 másodperc alatt, PEx: pulmonáris exacerbáció, CRP: C-reaktív protein, IL-8: interleukin-8, IL-6: interleukin-6, TNF-α: tumor necrosis factor-α, TGF-β1: transforming growth factor β1, NE-APC: neutrophil elastase α-1 antitrypsin complex, MPO: myeloperoxidase, MMP8: matrix metalloproteinase 8, MMP9: matrix metalloproteinase 9, HE4: human epididymis protein 4, sCD14: szolubilis CD14, SAA: szérumb amyloid A. A “+” jelöli az adott biomarker korábban igazolt diagnosztikai szerepét, NA: nem elérhető információ. Az életkor átlag ± SD vagy tartomány (range) formában van kifejezve. IVA: *ivacaftor*, LUM: *lumacaftor*, TEZ: *tezacaftor*, i.v. ab: intravénás antibiotikum (olyan esetekben van a terápia így megjelölve, ahol pontosan nem ismert az antibiotikum típusa). [103].

C-reaktív protein (CRP)

Egy régi klinikai vizsgálatban a plazma CRP-t már emelkedettnek találták CF-es betegekben, ugyanakkor egy kéthetes *ciprofloxacin* kezelést követően szignifikánsan csökkent a szintje, ami lehetővé tette a terápiás eljárások hatásosságának követését [89]. Azóta a szérumban mért CRP szint is megbízhatóan korrelált a FEV₁ %-os értékkel, magas értékét pedig összefüggésbe hozták a *P. aeruginosa* kolonizációval és az allergiás bronchopulmonális aspergillosissal [90, 91, 104]. Az emelkedett CRP koncentráció (>5,2 mg/L) a felnőtt CF-es betegekben súlyosabb tüdőbetegséggel és a pulmonális exacerbáció magasabb kockázatával járt együtt [92]. A tüdőbetegség súlyosságával a CF-es gyermekekben is megfelelően korrelált az értéke [79]. Egyhónapos *azithromycin* kezelést követően a szérum CRP szintje jelentősen csökkent a myeloperoxidáz (MPO) és a szérum amyloid A (SAA) szintekkel együtt, továbbá ezen biomarkerek fordított korrelációt mutattak a FEV₁ %-kal és a testsúly változásával [94]. Pulmonális exacerbáció kezelése alatt a perzisztáló magas CRP (>75 mg/L) előre jelezte az antibiotikumra adott válasz hiányát és a következő exacerbációig eltelt időt [81]. A CFTR-specifikus terápia hatásosságának monitorizálásában betöltött szerepéről kevesebb információ áll még rendelkezésünkre. Két hónapos *ivacaftor* kezelést követően kismértékben ugyan, de csökkent a szérum CRP szint, és jól korrelált a fehérvérsejtszámmal, valamint a verejtékklorid koncentrációval [87].

Citokinek

A pro-inflammatorikus citokinek fokozott tüdőben zajló termelődése az emelkedett szérumszintekben is megmutatkozik. Az IL-6 magasabb szintet mutat CF-ben, és hasonlóan az IL-8-hoz, alkalmas az antibiotikum kezelések monitorizálására [84, 57, 93]. A CFTR-specifikus terápiák gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata arra az eredményre vezetett, hogy az *ivacaftor/tezacaftor* kezelés szignifikánsan csökkentette a szérum IL-1 β , IL-18 és TNF- α szinteket, míg az *ivacaftor/lumacaftor* csak az IL-1 β szintet 3 hónapos kezelést követően [88]. A TGF- β 1, mely a légúti „remodeling” folyamataiban is fontos szerepet játszik, *P. aeruginosa* fertőzésben emelkedett szintet mutatott, és szignifikánsan csökkent antibiotikum kezelést követően [83].

Neutrophil granulocyták aktiváció dependens biomarkerek

Az aktivált neutrophil granulocyták gyulladásos körülmények között számos fehérjét termelnek, amelyek nagy mennyiségben kerülnek be a keringésbe, mint például a NE, MPO, calprotectin és YKL-40. Az NE az extracelluláris mátrix fehérjével, az antiproteázokkal kölcsönhatásba lépve neutrophil elasztáz antiproteáz komplexet (NE-APC) képez [67]. 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 [78]. A különböző biomarkerek kombinált vizsgálata lehetővé tette az enyhe és a súlyos CF-es betegcsoportok elkülönítését a receiver operator characteristic (ROC) görbe area under the curve (AUC) értékének analízise alapján [79]. Az NE-APC + granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) vagy NE-APC + G-CSF + linolénsav együttes vizsgálata 0,74, illetve 0,73 AUC értéket adott, míg a legjobb egyéni biomarker a G-CSF volt (AUC: 0,75) [79]. Magas NE-APC szinteket mértek magas lázzal és kifejezett leukocytosissal járó pulmonális exacerbáció alatt, míg intravénás antibiotikum adása jelentősen csökkentette a plazma NE-APC szintjét [95].

A neutrophilekben nagy mennyiségben jelen lévő és különböző stimulusok hatására fokozottan szekretálódó MPO a baktericid hatású reaktív oxigén gyök, a hipoklórsav termelés katalizátora [105]. 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 rövid távú előre jelzésére is [91, 94, 96, 82]. Az sTREM-1 (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1) a neutrophilek egyik felszíni receptora, amelynek plazma koncentrációja ugyan nem változott szignifikánsan a pulmonális exacerbáció antibiotikummal történt kezelését követően, de jól korrelált a plazma NE és MMP-8 és MMP-9 szintekkel [106]. A neutrophilek TNF- α hatására különböző MMP-eket is termelnek, melyek indukálják a légúti gyulladást és „remodeling” folyamatát CF-ben [67]. Az MMP-k felelősek az sTREM-1 lehasításáért a neutrophilek felszínéről [106]. A szérum vagy plazma MMP-8 és MMP-9 szintek sokkal magasabbak voltak CF-ben a kontrollokhoz képest, különösen a légúti exacerbáció idején [106, 97, 98]. Az MMP-8 összefüggött a FEV₁ % értékével is, míg antibiotikum kezelést követően az MMP-1, MMP-8 és MMP-9 csökkent szintjét figyelték meg [98].

A calprotectin fehérjének fontos antimikrobiális hatása ismert, és szintje megemelkedik szisztémás gyulladás és fertőzés hatására [94]. A szérum calprotectin koncentráció változása

klínikailag releváns változásokat jelezhet a CF betegség aktivitásában felnőttekben és gyermekekben egyaránt [79, 100]. Az immunmoduláns hatású *azithromycinnel* kezelt CF-es gyermekekben a calprotectin plazma szintjének csökkenése korrelált a FEV₁ %-os érték javulásával a placebo csoporthoz képest [94], míg a szérumban calprotectin gyógyszeres terápiára adott korai változása a 28. napon prediktív értékkel bírt a pulmonális exacerbáció hosszú távú (168 nap) kockázata szempontjából (ROC-AUC: 0,76) [86]. A calprotectin továbbá hasznosnak bizonyult az akut exacerbáció antibiotikum kezelésének monitorizálásában és a következő exacerbációig eltelt idő előrejelzésében is (9,1 mg/mL-es cut-off értékkel az exacerbáció végén) [99]. Mindezekon túl a szérumban a calprotectin koncentrációja összefüggött a klínikailag jelentős állapotváltozásokkal mind CF-es felnőttekben és gyermekekben [100, 79]. Végül a számos gyulladásos betegségben megemelkedő YKL-40 szérumszintje jelentősen emelkedett volt CF-es betegekben [107, 108, 61], és koncentrációja összefüggést mutatott a CF-es tüdőbetegség súlyosságával [61, 97] és a pulmonális exacerbáció kialakulásával, ráadásul csökkent glükóztolerancia esetén szignifikánsan magasabb szinteket mértek [97]. Ugyanakkor a szérumban mért aktivitásához képest a köpetben mért szintje szorosabb korrelációt mutatott a CF-es tüdőbetegség súlyosságával [109].

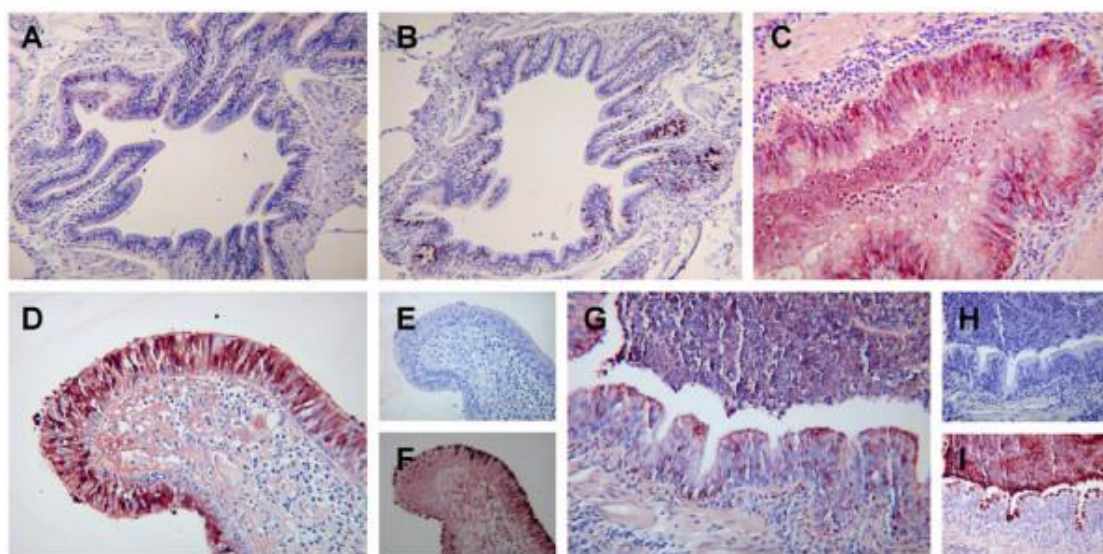
A HE4 mint potenciális CF biomarker

Annak ellenére, hogy számos biomarkert vizsgáltak már a CF-es tüdőbetegség gyulladásos folyamatainak monitorizálása céljából (4. ábra), ezek analitikai körülményei vagy az értékelésük során megnyilvánuló limitációk miatt a mindennapi rutin gyakorlat számára még nem váltak elérhetővé. Jelenleg még nincsenek egyértelműen bizonyított és kellően érzékeny plazma/szérumban alapú paraméterek a CFTR modulátorok vagy akár a hagyományos kezelések hatásosságának követésére, ezért szükséges lenne új, jól reprodukálható, könnyen mérhető és sok rutin laboratóriumban hozzáférhető biomarkerek bevezetésére a CF-es betegek követése érdekében [118].

A WFDC proteincsalád kis méretű fehérjéket foglal magában, amelyek különböző, rendszerint protektív funkciót látnak el, például antiproteáz, antibakteriális, vagy gyulladáscsökkentő tulajdonsággal bírnak [110]. A tüdőben nagy mennyiségben expresszálódnak, így a tüdő homeosztázisának fenntartásában és a proteolitikus hatások elleni védelemben játszhatnak szerepet [111]. Jelenleg 18 altípusuk ismert, melyek közül az SLPI-t vagy másik néven WFDC4-et az epitheliális sejtek és az aktivált makrofágok termelik, és

gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a monocytákra, továbbá semlegesíti a NE-t és az IL-8-at, valamint fékezi a neutrophilek beáramlását [112]. Az Elafin (WFDC14) szintén a légúti epithelsejtekben és az aktivált makrophagokban expresszálódik, és képes a *P. aeruginosa*-t opszonizálni [112].

A HE4 (másnéven WFDC2) fehérje expresszióját számos egészséges és malignus szövetben kimutatták [113]. A klinikumban elsőként ovárium [114], majd endometrium carcinomában [115] és tüdőtumorbán [116] vizsgálták új tumormarkerként. A CF betegség és az abnormális HE4 expresszió potenciális kapcsolatára egy olyan korábbi tanulmány hívta fel a figyelmünket, melyben többek között immunhisztokémiai festéssel emelkedett epitheliális HE4 expressziót mutattak ki CF-es betegek tüdőbiopsziás mintáiban (5. ábra) [111]. Azt viszont a Szerzők nem vizsgálták, hogy vajon a fokozottan termelődő intrapulmonális HE4 a keringésben is emelkedett szintet eredményez-e CF-ben. Továbbá az sem volt ismert, hogy a HE4 fehérje fokozott termelődésének mi a celluláris mechanizmusa ebben a betegségben.



5. ábra: A HE4 (WFDC2) fehérje abnormális expressziója CF-es tüdőbiopsziás mintákban. Normál (A, B) és CF-es tüdő (C–I) szövettani metszetek immunhisztokémiai módszerrel történt megfestése WFDC2-re (A, C, D, G), SLPI-re (B, E, H) és mucin 5AC-ra (F, I). Az eredeti felvételek nagyítása 100x (A, B) és 200x (C, D, E, F, G, H, I) volt [111].

3. Célkitűzések

Kísérletes munkánk célja az volt, hogy részletesen megvizsgáljuk a HE4 fehérjét mint új biomarkert különböző CF-es betegcsoportokból összegyűjtött vérmintákban annak érdekében, hogy megismerhessük labordiagnosztikai alkalmazhatóságát a CF-es tüdőbetegség súlyosságának megállapításában, valamint a gyógyszeres terápia hatékonyságának követésében. Továbbá meg kívántuk ismerni a HE4 expresszió szabályozásában részt vevő bronchoepitheliális celluláris folyamatokat ebben a kórképben.

3.1. A szérum HE4 vizsgálata potenciális diagnosztikai és prognosztikai biomarkerként CF-ben

Célunk volt, hogy értékeljük, vajon a szérum HE4 szintnek van-e diagnosztikai és/vagy prognosztikai szerepe a CF-es tüdőbetegség vizsgálatakor. Ennek érdekében:

- Két egymástól független CF-es betegpopuláció szérummintáiban megmértük a HE4 koncentrációkat, és az eredményeket összevetettük nem CF-es tüdőbetegségben szenvedők és egészséges kontrollok szérum HE4 eredményeivel.
- Kíváncsiak voltunk arra, hogy a CF-es betegekben a szérum HE4 szintek korrelálnak-e a szérum CRP szintekkel, a verejtékklorid koncentrációval, illetve mutat-e bármi összefüggést a betegek nemével és életkorával.
- Elemeztük, hogy a HE4 koncentráció eltérések összefüggésben vannak-e a tüdőbetegség súlyosságával, és a későbbi akut exacerbáció előrejelzésében.

3.2. A plazma HE4 szintek hatékonyságának analízise a CF kezelésének nyomon követésében

Célunk volt továbbá annak a feltételezésnek a vizsgálata, hogy a HE4 a CF-es betegek nyomon követésére alkalmas új biomarker a CFTR-specifikus *ivacaftor*, illetve *lumacaftor/ivacaftor* kezelés során. Ennek érdekében:

- Három egymástól független, a III. osztályú CFTR mutációk közé tartozó p.Gly551Asp (G551D) mutációt legalább egy allélon hordozó, *ivacaftor* (Kalydeco®) kezelésben részesült CF-es betegcsoportban megmértük a kezelés előtti és alatti plazma HE4 szintek alakulását.

- Megvizsgáltuk a fenti betegcsoportokban, hogy a plazma HE4 szintek változása jól korrelál-e a javuló egyéb klinikai paraméterekkel.
- Értékeltek, hogy a plazma HE4 koncentrációnak és annak változásának (delta érték) van-e prediktív szerepe a tüdő állapotának javulása szempontjából.
- Vizsgáltuk külön a plazma HE4 szintek alakulását a p.Phe508del-CFTR mutációra homozigóta, Orkambi®-t (*lumacaftor/ivacaftor*) szedő CF-es betegek kezelés előtti és utáni plazma mintáiban.

3.3. A fokozott HE4 expresszió patomechanizmusának és az intraepitheliális gyulladással való kapcsolatának vizsgálata bronchoepitheliális sejtkultúrákban

A kísérletes munkánk további célja volt, hogy ismereteket szerezzünk a fokozott HE4 expresszió patomechanizmusáról és az intraepitheliális gyulladással való kapcsolatáról.

Ennek érdekében választ szeretnénk volna kapni arra, hogy a CF-es bronchoepitheliális (CFBE) sejtekben a fokozott HE4 expresszió befolyásolható-e a CFTR funkció változtatásával, illetve összefüggésbe hozható-e a CF-re jellemző fokozott pro-inflammatórikus állapottal.

- Megvizsgáltuk, hogy a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek valóban fokozott HE4 expressziót mutatnak-e a wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekhez képest.
- Megfigyeltük, hogy a CFTR funkció hogyan befolyásolja a HE4 expressziót vad típusú és F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtkultúrákban.
- Analizáltuk továbbá, hogy a HE4 expresszió fokozható-e az NF-κB jelátviteli útvonal aktivációjával a CFBE sejtekben gyulladással stimulus (TNF-α) hatására.
- Megvizsgáltuk végül, hogy a CFTR-csatorna az NF-κB jelátviteli útvonalon keresztül vagy attól függetlenül szabályozza-e a HE4 expressziót a CFBE sejtekben.

4. Anyagok és módszerek

A PhD értekezés alapjául szolgáló 3 eredeti tudományos közleményben számos metodikát alkalmaztunk az *ex vivo* klinikai mintamérések és az *in vitro* sejtes kísérletek elvégzése érdekében. A kísérletek és laboratóriumi mérések során felhasznált módszereket - mivel vannak átfedések - nem közleményenként elkülönítve, hanem egységesítve mutatom be ebben a fejezetben.

4.1 Betegek és kontrollok

Első vizsgálatunkban CF-es és nem CF-es betegcsoportok szérum HE4 szintjének összehasonlítása céljából hat magyarországi CF centrumból (Debreceni Egyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Debrecen; Kenézy Gyula Megyei Kórház, Debrecen; Szent-Györgyi Albert Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Szeged; Heim Pál Gyermekkórház, Budapest; Petz Aladár Megyei Kórház, Győr; Markusovszky Lajos Megyei Kórház, Szombathely) összesen 77 gyermekkorú (18 év alatti) magyar CF-es beteget, valamint független kohorszként egy prágai központból (Department of Pulmonology, Charles University, Prága, Csehország) összesen 57 felnőtt CF-es cseh beteget válogattunk be (2. táblázat). A CF diagnózisának felállítása az aktuális CF konszenzusos diagnosztikai kritériumok alapján történt [2]. Valamennyi résztvevő a betegség klasszikus formáját mutatta. A betegek klinikai státuszának kategorizálása részletes klinikai és laboratóriumi vizsgálatok figyelembevételével a Shwachman-Kulczycki pontrendszer, illetve egyes intézetekben ennek alkalmazásának hiányában a klinikus véleménye szerint történt. A Shwachman-Kulczycki skála pontjai alapján a betegek három alcsoportba kerültek beosztásra: 71-100 pont között enyhének, 41-70 pont között közép súlyosnak és ≤ 40 pont esetén súlyosnak definiálták a betegséget. A vérminták egy időpontban a járóbeteg kontrollvizsgálatok alkalmával kerültek összegyűjtésre, amikor általában enyhe vagy közép súlyos állapotban voltak a betegek, vagy kórházi felvételkor, amikor súlyos állapotban, esetenként akut pulmonális exacerbáció miatt voltak tünetei (pl. fokozott köhögés növekvő köpet mennyiséggel, nehézlégzés, gyengeség vagy a légzésfunkciós eredmények súlyos rosszabbodása) [119]. A CRP szintek a súlyos CF-es gyermekek ($n=29$) és valamennyi cseh felnőtt beteg esetén álltak rendelkezésre (2. táblázat).

Annak érdekében, hogy a nem CF-es légúti gyulladás esetleges nem specifikus hatását is megvizsgáljuk a HE4 szérum koncentrációkra vonatkozóan, 64 olyan beteget is beválogattunk a fenti intézetekből, akik szintén súlyos, de nem CF-es tüdőbetegségben

szenvedtek (pl. krónikus bronchitis, asztma vagy pneumónia). További 12, egyéb kórállapotban szenvedő kontroll beteget is bevontunk, akiknél a diagnózis az alábbiak szerint alakult: nem CF-es bronchiectasia (n=2); congenitalis betegségek (Werdnig-Hoffman szindróma, Williams-Campbell szindróma, microcephalia, n=7); és terápiaerezisztens epilepszia (n=3). Ezek a gyermekek a bronchiectasia jeleit mutatták gyakori aspiráció és bronchiális váladékretenció miatt kialakuló rekurrens légúti infekciók következtében. A felnőtt CF-es betegek egyik kontrollcsoportjaként beválogatásra került 18 nem CF-es bronchiectasiában és krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) szenvedő felnőtt beteg. Ezen klinikai kontrollként szolgáló csoportban a diagnózis felállítása a standard radiológiai és laboratóriumi vizsgálatok alapján történt. Kizárási kritériumként határoztuk meg a dohányzást, a malignitásokat, az immundeficienciát, valamint a krónikus vese- és májbetegséget. A fiatal és a felnőtt betegeket külön csoportokba osztva a CF-es és kontroll csoportok között nem volt szignifikáns különbség a betegek életkorában, ugyanakkor a nem CF-es személyek fiatalabbak voltak a CF-es betegeknél (2. táblázat). Végül 12 magát egészségesnek mondó, tünetmentes CF-es magyar személyt (átlag életkoruk 31 [25-37] év) is megvizsgáltunk szérums HE4-re, akik csak hordozói voltak a p.Phe508del CFTR mutációnak az egyik allélon.

Betegcsoportok	Életkor (évek)	Nem (férfi/nő)	Szérums HE4 (pmol/L)	Szérums CRP (mg/L)
CF-es gyermek (n=77)	11 (7-17)	37/40	99,5 (73,1-128,9)	5,3 (2,0-9,3)
CF-es felnőtt (n=57)	25 (21-29)	26/31	115,7 (77,8-148,7)	14,3 (12,9-27,0)
Nem CF-es tüdőbeteg gyermek (n=76)	6 (3-14)	32/44	63,9 (54,3-83,4)	7,5 (1,1-18,2)
Nem CF-es tüdőbeteg felnőtt (n=18)	26 (23-38)	7/11	59,2 (41,0-88,6)	8,9 (3,1-15,7)
Gyermek kontroll (n=77)	13 (10-15)	33/44	36,3 (31,1-43,4)	NM
Felnőtt kontroll (n=40)	25 (23-28)	17/23	33,8 (29,8-38,6)	NM

2. táblázat: Első vizsgálatunkban a szérums HE4 mérésekhez használt vizsgálati populációk legfontosabb demográfiai és laboratóriumi paraméterei. Összesen 77 CF-es magyar gyermeket vontunk be párhuzamosan 57 CF-es cseh felnőtt beteggel, valamint 94 nem CF-es tüdőbeteg és 117 kontroll személy mintáját dolgoztuk fel. A CRP a CF-es gyermekek körében csak a súlyos állapotban lévők esetén került le mérésre (n=29). Az adatok medián (interkvartilis tartomány) formában vannak kifejezve. Rövidítés: NM: nem mért paraméter.

Miután megvizsgáltuk a szérum HE4 mérés használhatóságát a CF-es betegek vizsgálatára és a tüdőfolyamat súlyosságának értékelésében, retrospektív módon a plazma HE4 koncentrációkat K₃-EDTA-val antikoagulált plazma mintákban analizáltuk három független CF-es betegcsoportban, akik min. 6 évesek vagy annál idősebbek voltak, legalább az egyik allélon G551D-CFTR mutáció volt jelen, és a CFTR specifikus *ivacaftor* (Kalydeco[®], Vertex Pharmaceuticals, Boston, MA, USA) kezelésben részesültek. Ezek a betegek egy része korábban olyan nagy klinikai vizsgálatokban szerepeltek, mint az amerikai GOAL- és az ír CORK-tanulmány [27, 120], illetve bevontunk helyben kezelt klinikai eseteket is (Adult CF Centre at The Prince Charles Hospital, Brisbane, Ausztrália) [121] (3. táblázat). A 29 GOAL-study keretén belül (1. csoport) kezelt beteg mintáját a Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics (CFFT) Biorepository (Bethesda, MD, USA) biobankból kaptuk. A HE4 szinteket kezelés előtt (kiindulási érték) és az *ivacaftor* kezelés megkezdése után 1, 3 és 6 hónappal levett plazma mintákból határoztuk meg. A 2. csoportban szereplő 12 betegnek kezelés előtti és 1, illetve 2 hónap utáni mintája volt. Végül 19 CF-es beteg mintáját a CORK-tanulmányból kaptuk, akiknek terápia előtti és 3. hónapon levett mintája volt (3. táblázat). Mivel a vizsgálatunk ideje alatt hazánkban még az *ivacaftor* gyógyszer klinikai tanulmány keretén belül sem volt elérhető, ezért kénytelenek voltunk külföldi kollaboráció keretén belül mintát igényelni a HE4 további tesztelése érdekében.

	1. csoport (n=29)	2. csoport (n=12)	3. csoport (n=19)
Életkor (év), medián (IQR)	15,6 (9,0-22,6)	27,0 (23,2-32,0)	19,5 (9,2-28,0)
Nemek aránya (nő/férfi)	17/12	4/8	5/14
Nem-G551D-CFTR allél előfordulása			
I. osztály, n (%)	0	0	1 (5)
II. osztály, n (%)	22 (76)	9 (75)	18 (95)
III. osztály, n (%)	0	0	0
IV. osztály, n (%)	3 (10)	1 (8)	0
V. osztály, n (%)	2 (7)	0	0
Ismeretlen, n (%)	2 (7)	2 (16)	0
Vérvételi időpontok (hónap)	0., 1., 3., 6.	0., 1., 2.	0., 3.
Kreatinin (μmol/L), medián (IQR)	59 (29-68)	78 (59-103)	54 (36-69)
Hasnyálmirigy elégtelenség, n (%)	20 (69)	9 (75)	19 (100)
CF-hez társuló diabetes mellitus, n (%)	0 (0)	1 (8)	4 (21)

3. táblázat: Az ivacaftor kezelés hatékonyságának plazma HE4 méréssel történt követése során bevont három különböző CF-es beteg kohorsz legfontosabb demográfiai és klinikai paraméterei. Az 1. csoportban szereplő betegek korábban az amerikai GOAL klinikai tanulmányban vettek részt [27], a 2. csoportban lévő mintákat egy ausztrál klinikai munkacsoporttól kaptuk [121], míg a 3. csoportba sorolt betegek az ír CORK tanulmányban szerepeltek [120]. Az adatok medián (interkvartilis tartomány) formában vannak kifejezve. Rövidítések: IQR: interkvartilis tartomány.

Végül a HE4 expresszió mechanizmusának bronchoepitheliális sejtekben történt *in vitro* vizsgálatával párhuzamosan értékeltük a *lumacaftor/ivacaftor* CFTR-specifikus kezelés hatását a keringő HE4 szintre 10 stabil klinikai állapotban lévő CF-es betegben, akik homozigóták voltak a p.Phe508del-CFTR mutációra (5 nő és 5 férfi, átlagéletkor $16,1 \pm 4,8$ év). A kezelés előtti plazma HE4 értékeket összehasonlítottuk az Orkambi[®] kezelés (Vertex Pharmaceuticals, Boston, MA, USA) megkezdése után már 1 hónappal levett mintáéval. Ezeket a plazmamintákat szintén fagyasztva a CFFT Biorepository biobankból kaptuk, és korábban a betegek a PROSPECT tanulmányban vettek részt [30]. Mivel ezen vizsgálatunk ideje alatt sem voltak még elérhetők *lumacaftor/ivacaftor* kezelt betegek mintái, ezért a mérésekhez újra külföldi mintaforrást vettünk igénybe (4. táblázat).

Betegsorszám	Életkor (év)	Nem	Kiindulási FEV ₁ (%)	Kiindulási verejtékklorid (mmol/L)	Verejtékklorid változás (1 hónap múlva)	Kiindulási BMI (kg/m ²)
1	24,5	nő	49,5	105	-14,5	20,5
2	25,5	nő	63,2	88	-44,5	25,3
3	14,8	nő	49,8	102	-23,5	21,0
4	12,9	nő	73,8	103	-19	16,6
5	14,5	férfi	93,9	106,5	-13	25,1
6	12,1	férfi	94,6	93	-19	18,2
7	12,8	férfi	91,1	108	-7,5	17,7
8	14,3	férfi	79,4	85,5	-15,5	18,5
9	14,1	férfi	71,3	108	-30	14,1
10	15,2	nő	80,1	112,5	-9,5	21,3

4. táblázat: Lumacaftor/ivacaftor kezelésben részesült CF-es betegek legfontosabb klinikai adatai, akiknek mintáiban plazma HE4 mérést végeztünk. A 10 CF-es beteg jelentős verejtékklorid csökkenést mutatott, mivel a kezelés előtt az átlagos verejtékklorid koncentráció $101,2 \pm 9,2$ mmol/L volt, míg a kezelés alatt átlagosan 19,6 mmol/L-rel csökkent. Emellett javuló légzésfunkciós eredményeket (növekvő FEV₁ %) mutattak már 1 hónap után az Orkambi® kezelést követően. Rövidítés: BMI: body mass index.

Az egyes CF-es betegcsoportokban a verejtékklorid koncentráció Sweat-Chek Conductivity Analyzer (Wescor, Logan, UT, USA) segítségével került meghatározásra az egyes centrumokban. A magyar betegek CFTR mutációinak detektálása érdekében a vérminták fehérvérsejtjeiből a genomi DNS-t QIAGEN Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) izolálták. A Magyarországon előforduló 30 leggyakoribb CFTR mutáció azonosítása a Elucigene CF29v2Kit (Tepnel-Diagnostics, Manchester, Egyesült Királyság) alkalmazásával történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Molekuláris Patológiai Részlegén, kiegészítve a CFTRdele2,3 (21kb) „szláv” mutáció vizsgálatával Sanger-szekvenálással [20]. A beválogatott cseh felnőtt CF-es betegek genotípusának meghatározására Elucigene EU v3 assay-t (Tepnel-Diagnostics) és MLPA kitet (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) használtak (Department of Biology and Medical Genetics, Charles University, Prága, Csehország). A szérumvizsgálatokkal párhuzamosan még két másik típusú mintavételre is sor került: három magyar CF-es betegtől (2 fiú és 1 leány; 3, 4 és 9 éves) és három nem CF-es pulmonológiai eltéréstől, recidív bronchitises epizódoktól szenvedő betegtől

(2 fiú és 1 leány; 2, 4 és 10 éves) hörgőnyálkahártya biopsziás mintát vettünk diagnosztikus bronchosopia során (Debreceni Egyetem, Gyermekgyógyászati Intézet). A kontroll csoportban a bronchoscopiára a ziháló epizódok hátterének tisztázása és a centrális légúti szűkület kizárása céljából került sor.

4.2. Reagensek a sejtes kísérletekhez

A CFTR korrektorként alkalmazott *lumacaftor* (VX-809, LUM) (S1565) és *tezacaftor* (VX-661, TEZ) (S7059), a CFTR potenciátor hatású *ivacaftor* (VS-770, IVA) (S1144), a CFTR gátlására használt feszültség-independens CFTR inhibitor CFTR_{inh172}-t (S7139), a CFTR aktivátor *forskolint* (FSK, S2449), valamint az NF- κ B útvonalat specifikusan gátló BAY 11-7082-t a Selleck Chemicals cégtől (Houston, TX, USA) rendeltük. A cAMP foszfodiészteráz gátló IBMX-t (3-isobutyl-1-methylxanthine, I5879) a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A rekombináns TNF- α (Gibco, Carlsbad, CA, USA) kivételével a reagentia mindegyikének a dimethyl-sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) volt az oldószere.

4.3. Sejtkultúrák és kezelési körülményeik

A CF-es sejtes körülményeket biztosító F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek, illetve a vad típusú CFTR-t (wt-CFTR) mutató sejtek Dr. J. P. Clancy laboratóriumából származnak (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA). A sejtek tenyésztéséhez Earle'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 μ g/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) hozzáadásával. A sejteket 37°C fokon, 5% CO₂ koncentráció mellett inkubáltuk. A CFBE sejteket 6-well plate-ekbe passzáltuk (250 000 sejt/well), majd 37°C fokon 24 óráig kezeltük TNF- α -val vagy kontrollként foszfát puffer oldattal (PBS), valamint a CFTR modulátorok kombinációjával: *lumacaftor* (3 μ M) és *ivacaftor* (10 μ M) (LUM/IVA) vagy *tezacaftor* (5 μ M) és *ivacaftor* (10 μ M) (TEZ/IVA) együttes adásával. Utóbbi esetekben a negatív kontroll mintákban DMSO-t alkalmaztunk.

A CFTR-csatorna aktivitást FSK (10 μ M) és IBMX (100 μ M) 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 μ M) adtunk a wt-CFTR-t expresszáló

CFBE sejtekhez. A kontroll mintákhoz ez esetben is DMSO-t adtunk. A CFTR modulátorok általunk alkalmazott kísérleti körülményei összhangban vannak a korábbi *in vitro* tanulmányokban alkalmazott módszerekkel [16, 122-124].

Az NF- κ B útvonal HE4 expresszióban betöltött szerepének *in vitro* vizsgálata céljából a pro-inflammatorikus jelátvitelt specifikusan gátlószerekkel, a BAY 11-7082-vel (5 μ M) vagy DMSO-val (kontroll) kezeltük a 24 órán keresztül TNF- α -val aktivált, vagy nem kezelt kontroll CFBE sejtekben, illetve a LUM/IVA vagy TEZ/IVA kezelés jelenlétében vagy hiányában egyaránt.

4.4. Laboratóriumi mérések

A perifériás vérminták vénás vérvétel során kerültek levételre, majd centrifugálást követően -70°C-on voltak hosszú távon tárolva. A külföldi klinikai tanulmányokban résztvevő, és saját további analízisre megkért plazma mintákat nemzetközi futárszolgálat szárazjégen szállította a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetébe.

A betegek és kontrolljaik szérum, illetve plazma 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 magyar gyermek és felnőtt CF-es betegek szérum CRP szintjét, valamint a CFBE sejtenyészetek felülszójában mért IL-6 koncentrációt elektrokemilumineszcens immunoassay módszerrel határoztuk meg Cobas® e411 automatán (Roche Diagnostics). Az operátor függő mérési torzítások elkerülése érdekében a mintákat vak analízis során dolgoztuk fel.

Miután feltételeztük, hogy a CF-es betegek köpetmintájában még magasabb HE4 koncentráció mérhető a fehérje pulmonális eredete miatt, mint a vérmintákban, ezért 6 CF-es betegtől spontán módon ürített köpetmintát vettünk és kontrollként egyrészt nem CF-es (bronchitis) tüdőbetegtől (n=8), másrészt normál kontrolloktól (n=5) gyűjtöttünk mintákat. A ragadós, viszkózus minta homogenizálása érdekében ditio-threitol-t (DTT) adtunk a mintákhoz 15 percig szobahőn, majd a feltisztult mintákat 180 g-n 5 percig 25 °C-on centrifugáltuk, és a felülszóban mértük le a HE4 szintet.

4.5. Elektrofiziológia a CFTR-csatornán keresztül folyó kloridáram vizsgálatára

A CFBE 410^- sejtekben a kloridáramot ún. „egész sejt” patch-clamp technikával analizáltuk, hasonlóan korábban publikált vizsgálatokhoz [125, 126]. Az alkalmazott extracelluláris oldat tartalma 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 összetétele az alábbi volt: 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 jégén 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 μ m 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 Tibor és Prof. Panyi György (Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) nyújtottak segítséget.

4.6. Össz RNS izolálás

Az CFBE sejtenyészetekből, valamint három CF-es és három nem CF-es gyermektől bronchosopia révén nyert hörgőnyálkahártya biopsziás szövetmintákból kinyerhető össz RNS-t TRI reagenssel (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) izoláltuk a gyártó ajánlása szerint. A biopsziás mintákat az eltávolítás után izotóniás sóoldatban 4°C-on steril műanyag csőben tartottuk, amíg a laboratóriumba érkezett, majd 4°C-on 1500 g-n 5 percig centrifugáltuk, és a sejtpelletet -70°C-on tároltuk az analízisig. Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ellenőriztük. Az RNS-mintákat -80°C-on tároltuk további analízis előtt.

4.7. Valós idejű kvantitatív PCR analízisek

Az izolált RNS mintákból a komplementer DNS szintézist High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia) segítségével végeztük. Az RNS kezdeti mennyisége 200 ng (biopsziás minta), illetve 1000 ng (CFBE sejtkultúra) volt. A valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) elvégzése céljából egy LightCycler 480 qPCR készüléket (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtunk. A HE4 expresszió kvantálása során a biopsziás minták esetén SYBR Green PCR Master Mix-et (Thermo Scientific), a CFBE sejteknél LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics) reagenst, valamint *WFDC2*-specifikus oligonukleotid primert (10 µM, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) használtunk. A reakció a következő körülmények között zajlott: 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 használtuk. A HE4 expressziós szintet az alábbi formulával határoztuk meg: $\Delta Cq = Cq_{36B4} - Cq_{HE4}$, míg a célgénben bekövetkezett változás mértéke a referenciagénhez viszonyítva a következőképpen lett konvertálva: $F = 2^{\Delta Cq}$. A HE4 expressziót az mRNS koncentráció meghatározásával monitoroztuk a CFBE sejtekben 1 órától 1 hétig terjedő időintervallumban történő TNF- α stimulációt követően és a kiindulási állapothoz (PBS hozzáadás mellett) hasonlítottuk. A fentiekhez hasonló metodikai körülmények között történt több gyulladás asszociált génexpresszió (IL6, IL8 és IL1B) analízise is az mRNS szintek mérésén keresztül (5. táblázat).

mRNS	Forward primer	Reverz primer
HE4	5' - ATAGCACCATGCCTGCTTGT - 3'	5' - TGCTCCTGTGCCTGAGACTA - 3'
IL6	5' - GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA - 3'	5' - CTGCAGCCACTGGTTCTGT - 3'
IL8	5' - AGACAGCAGAGCACACAAGC - 3'	5' - ATGGTTCCTTCCGGTGGT - 3'
IL1B	5' - AGCCAGGACAGTCAGCTCTC - 3'	5' - AGAGGCCTGGCTCAACAA - 3'
RPLP0 (36B4)	5' - ATGCAGCAGATCCGCATGT - 3'	5' - TCATGGTGTTCTTGCCCATCA - 3'

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

4.8. Immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

A normál, valamint a csökkent CFTR funkciót mutató CFBE 41o⁺ sejtekben az NF-κB útvonal aktiválódását a p65 alegység nukleáris transzlokációjának fluoreszcens festéssel történő vizualizációjával detektáltuk. Ennek érdekében a F508del-CFTR-t és a wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejteket 12-well plate-ekben tenyésztettük 5x10⁴ sejt/well sejtsűrűség mellett 2 napon keresztül. Ezt követően a sejteket TNF-α-val (100 ng/mL) vagy PBS-sel (kontroll) 4 órán keresztül kezeltük. Annak érdekében, hogy a CFTR modulátoroknak az NF-κB útvonalra gyakorolt hatását megvizsgáljuk, a CFBE sejteket előzetesen *lumacaftor* (3 μM) + *ivacaftor* (10 μM) vagy *tezacaftor* (5 μM) + *ivacaftor* (10 μM) kombinációjával vagy DMSO-val (kontroll) kezeltük 24 órán keresztül, majd ezt követően adtuk hozzá a TNF-α-t (100 ng/mL) vagy a PBS-t 4 óráig. A fenti kezeléseket követően a sejteket jéghideg metanol-aceton oldatban (50 v/v%) fixáltuk 10 percig. FBS-t alkalmaztunk 15 percen keresztül a nonspecifikus antitest kötőhelyek blokkolása érdekében. Az NF-κB p65 alegységet elsődlegesen poliklonális nyúl eredetű anti-humán p65 antitesttel (100 μg/mL, Sigma-Aldrich) jelöltük 1 óráig, majd a másodlagos festés céljából Alexa Fluor 488-konjugált kecske eredetű nyúl-IgG ellenes antitestet (5 μg/mL, Sigma-Aldrich) alkalmaztunk 1 órán keresztül. A sejtmagokat 4',6-diaminido-2-phenylindole-lal (DAPI, Invitrogen, USA) jelöltük. A mintákat Zeiss Axio Scope A1 fluoreszcens mikroszkóppal (HBO 100 lamp) (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Németország) vizsgáltuk. A következő hullámhosszúságokon történtek az analízisek: DAPI: excitációs hullámhossza 365 nm, emissziós filter 445/50 nm; fluoreszcein: excitáció 470/40 nm, emissziós filter 525/50 nm.

A képeket ZEN 2012 v.1.1.0.0. szoftver (Carl Zeiss Microimaging GmbH) segítségével analizáltuk. A kiértékelés során kiszámoltuk a nukleáris és a perinukleáris (citoplazma) fluoreszcens intenzitás arányát az NF- κ B p65 festésre vonatkozóan. Ellenőrzésképpen az immunfestés specificitását a háttér festődésének elhanyagolható mértéke igazolta a szekunder antitestek egyedüli alkalmazása mellett. A vizsgálatok kivitelezésében Dr. Fenyvesi Ferenc és Dr. Váradi Judit (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék) nyújtottak segítséget.

4.9. Etikai engedélyek

Az összes résztvevő gyermek szülei vagy törvényes képviselője, valamint a felnőtt résztvevők írásos beleegyező nyilatkozattal hagyták jóvá a vizsgálatokban való részvételt a tanulmány elkezdése előtt. A kutatást a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (engedély számok: 3777-2012; 4813-2017), valamint a Motol University Hospital, Charles University (Prága) helyi etikai bizottsága a cseh betegek részvételét hagyta jóvá. A nagy klinikai vizsgálatokat a helyi intézményi etikai bizottságok fogadták be.

4.10. Statisztikai számítások

Az adatok normalitásának vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet használtuk. A demográfiai és laboratóriumi paramétereket, valamint a mért HE4 és interleukin eredményeket normál eloszlás esetén átlag $\pm$ SD (standard deviation) vagy SEM (standard error of mean), míg nem normál eloszlás esetén medián érték (interkvartilis tartomány, IQR) vagy (min-max) formában fejeztük ki. Amikor a kezelés előtti és kezelés utáni mintákat hasonlítottuk össze, párosított t-tesztet vagy Wilcoxon párosított tesztet alkalmaztunk. Kettőnél több adatcsoport összehasonlításakor ANOVA vagy Friedman tesztet használtunk Bonferroni vagy Dunn-féle *post-hoc* analízissel. A demográfiai változók összehasonlítására χ^2 tesztet, míg a korrelációs analízisekhez – mivel az adatok nem parametrikus változók voltak - Spearman rho tesztet alkalmaztunk. A szérum HE4 és a CRP CF-ben nyújtott diagnosztikai képességét, valamint a kezelés előtti plazma HE4 szintnek a terápia kiváltotta FEV₁ % átlag 7%-os változását jelző diszkriminatív erejét ROC görbe (receiver operating characteristic) analízissel értékeltük az AUC (area under the curve) érték meghatározásával. A cut-off vagy küszöb értéket a Youden-index maximuma alapján határoztuk meg (szenzitivitás, specificitás, PPV, NPV). Többszörös

regressziós analízist végeztünk a plazma HE4 szint és a FEV₁ % érték, a CRP szint és egyéb függő változók összefüggéseinek vizsgálatára *ivacaftor* kezelés előtt és alatt. A HE4 részletes diagnosztikai analízise során a delta értékeket is kiszámoltuk, amit a kezelés előtti és az egyes betegeknél azonos vizsgálati időpontban mért HE4 értékek különbségeként kalkuláltunk ki. A $P < 0,05$ valószínűségi szintet tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az elemzéseket és az ábrákat a GraphPad Prism 6.01 szoftver (GraphPad Software, USA), illetve az SPSS v.22.0 (IBM SPSS Statistics, IBM Corporation) segítségével készítettük.

5. Eredmények

5.1. A szérumban HE4 koncentráció összehasonlítása CF-es gyermek és felnőtt betegekben, valamint nem CF-es tüdőbetegekben és kontroll csoportokban

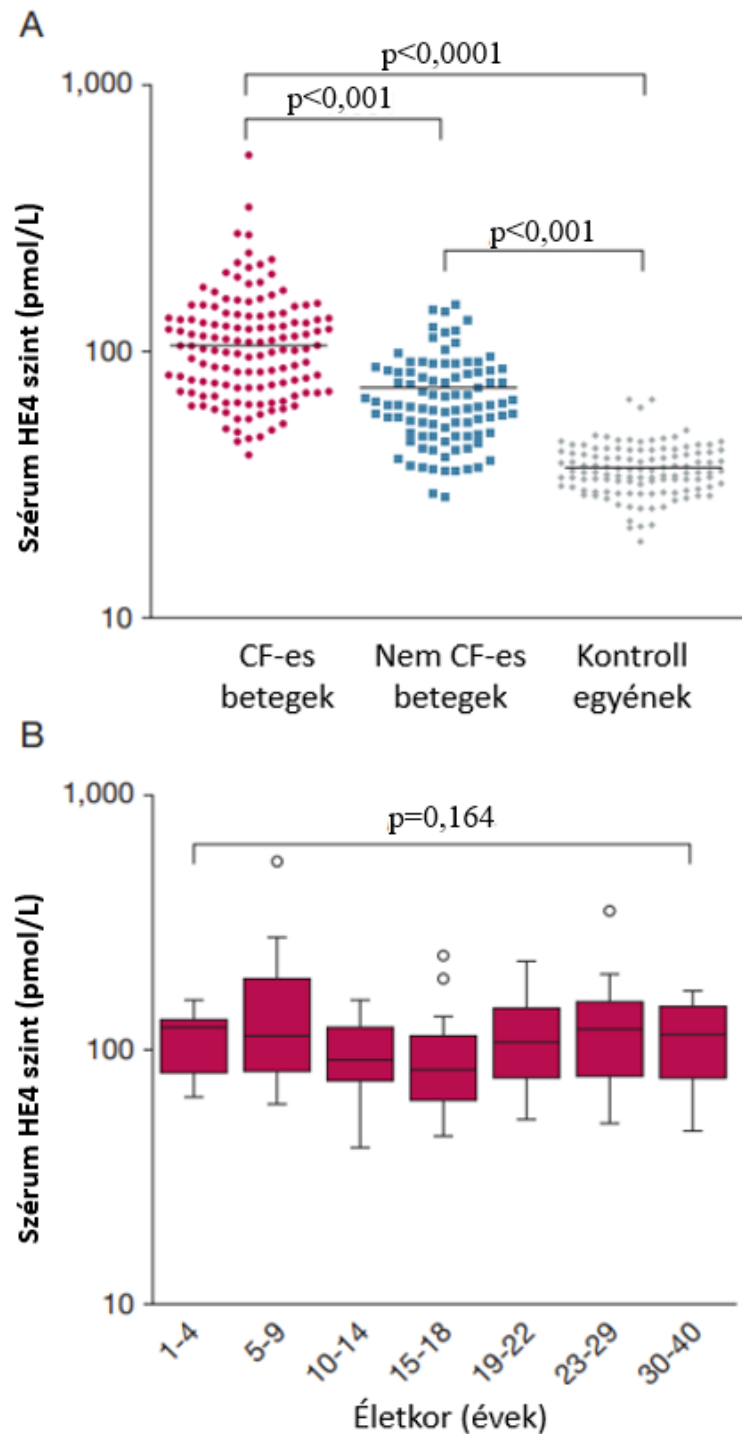
Az irodalmi adatok alapján elsőként kezdtük el konzekvensen mérni a HE4 fehérje szérumban koncentrációját a CF-es betegek laboratóriumi vizsgálata érdekében nem tumormarkerként, mint ahogyan korábban alkalmazták malignus kórképekben [114, 112], hanem mint egy új típusú gyulladásos paraméter. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a korábban immunhisztokémiával tapasztalt fokozott pulmonális HE4 expresszió [111] megmutatkozik-e a CF-es vérmintákban is.

5.1.1. Az első vizsgálatba bevont betegpopulációk főbb laboratóriumi jellemzői

A CF-es betegcsoportban a verejtékklorid szint emelkedett volt (> 60 mmol/L) (medián: 107 mmol/L; 90-120 mmol/L) nyolc beteg kivételével, akiknek határértéket mértek (30-60 mmol/L). A verejtékvizsgálat nem volt elvégezve a nem CF-es betegcsoportban és a klinikai kontroll egyénénél, mivel a CF betegséget egyéb vizsgálatokkal nagy biztonsággal ki lehetett zárni. Ugyanakkor minden bevont CF-es betegben mindkét allélon detektálható volt CFTR variáns. A fő mutáció típusok aránya a következőképpen alakult: a gyermek populációban 43 beteg (55,8%) mutatott p.Phe508del/p.Phe508del variánst, 26 főnél (33,8%) p.Phe508del/egyéb mutációt írtak el és 8 beteg (10,4%) egyik allélon sem mutatott p.Phe508del variánst (pl. p.Gly542X/p.Arg347Pro). A felnőtt betegek között 24 beteg (42,1%) mutatott p.Phe508del/p.Phe508del variánst, 26 fő (45,6%) p.Phe508del/egyéb mutáció pozitív volt és 7 beteg (12,3%) egyik allélján sem volt p.Phe508del (pl. p.Arg553X/p.Gly551Asp). A szérumban CRP szintek emelkedettek voltak (referencia tartomány: $< 4,6$ mg/L) a súlyos klinikai státuszban lévő fiatal CF-es betegekben ($n=29$), az összes felnőtt CF-es betegben ($n=57$) és a két nem CF-es kontroll csoportban ($n=76+18$) (2. táblázat). Krónikus bakteriális kolonizációt a CF-es gyermekcsoportban 54 esetben (70,1%) mutattak ki, míg a felnőtt CF-es betegek mindegyikét (100%) érintette. Hasnyálmirigy elégtelenség (CF-es gyermekcsoport: 70 fő (90,9%), felnőtt CF-es kohorsz: 46 fő (80,7%) és CF-hez társuló diabetes mellitus (CF-es gyermekcsoport: 8 fő, 10,4%, felnőtt CF-es kohorsz: 20 fő, 35,1%) eltérő arányban volt diagnosztizálva a két CF-es populációban.

5.1.2. CF-ben jelentősen emelkedett szérumszintek HE4 szintek mérhetők a CFTR gén variánsától függetlenül

A szérumszintek HE4 szintek szignifikánsan emelkedettek voltak ($p < 0,0001$) mind a CF-es gyermekekben (99,5 [73,1-128,9] pmol/L), mind a felnőtt betegekben (115,7 [77,8-148,7] pmol/L) a saját egészséges kontroll csoportjukhoz viszonyítva (6/A ábra, 2. táblázat). Kiemelendő, hogy a 29 súlyos állapotú CF-es gyermek mintáiban még ennél is magasabb HE4 koncentrációk voltak mérhetők (134,9 [124,5-275,0] pmol/L). A felnőtt CF-es csoportban 13 beteget minősítettek súlyos állapotúnak, akikben a HE4 érték a többi beteghez képest szintén jóval magasabb volt: 170,8 [146,8-182,9] pmol/L. A betegek neme (fiúk: 95,4 [75,0-128,5] vs. lányok: 101,5 [72,6-129,6] pmol/L, $P = 0,881$), illetve a CFTR genotípus szintén nem befolyásolta a mért HE4 szinteket: p.Phe508del/p.Phe508del pozitív betegek: 99,5 [73,0-127,5] pmol/L vs p.Phe508del/egyéb mutációt mutató betegek: 94,6 [66,4-127,8] pmol/L). A klinikai kontrollok mellett olyan betegpopulációban is megvizsgáltuk a HE4 szérumszinteket, akik súlyos, nem CF-es tüdőbetegségben szenvedtek, úgy, mint akut bronchitis, asztma, pneumonia vagy nem CF eredetű bronchiectasia. Ezekben az esetekben is a kontroll csoporthoz képest magasabb HE4 szinteket találtunk ($p < 0,001$), amik jóval elmaradnak a CF-ben tapasztaltaktól ($p < 0,001$) (6/A ábra). Amikor a nem CF-es tüdőbetegek gyermekeit a betegségük szerint tovább bontottuk, a súlyos bronchitis vagy asztma (63,7 [54,1-79,5] pmol/L; $n=42$), illetve a pneumónia (57,8 [51,2-74,2] pmol/L; $n=22$) jelenlétében hasonló HE4 szinteket mértünk. Hasonlóan a 18 nem CF-es felnőtt tüdőbeteg (bronchiectasia, COPD) mintáiban mérsékelten emelkedett HE4 szintek voltak jellemzőek (59,2 [41,1-88,6] pmol/L), míg a CFTR mutációt csak hordozók teljesen normál HE4 szintekkel bírtak (33,9 [30,1-43,9] pmol/L; $n=12$). Külön megvizsgáltuk az életkor hatását a szérumszintek HE4-re, ami nem befolyásolta azt érdemben ($p = 0,164$) (6/B ábra).



6. ábra: Szérum HE4 szintek CF-es és nem CF-es tüdőbetegekben, valamint kontroll személyekben. (A) Szignifikánsan magasabb HE4 koncentrációkat mértünk a CF-es betegekben mindkét kontroll csoporthoz képest. Az egyes alcsoportok közötti összehasonlítást Mann-Whitney U teszttel végeztük. (B) Az életkor önmagában nem befolyásolta a HE4 koncentrációkat CF-ben. Az adatokat medián érték (interkvartilis tartomány) formában ábrázoltuk. A statisztikai analízishez Friedman tesztet használtunk Dunn-féle *post-hoc* analízissel. Rövidítések: CF: cisztás fibrózis, HE4: human epididymis protein 4.

A szérum eredményekhez hasonlóan a CF-es betegektől származó köpetben is jóval magasabb HE4 koncentrációkat mértünk a nem CF-es tüdőbetegek mintáihoz, és különösen a kontroll mintákhoz képest, annak ellenére, hogy a mintavétel időpontjában a szérum CRP alapján nem volt jelentős szisztémás gyulladás a betegeknél (6. táblázat). Amikor a szérum és a köpet HE4 koncentrációk között vizsgáltuk a korrelációt Spearman teszttel, szignifikáns pozitív összefüggést találtunk ($r = 0,9429$; $P = 0,0167$; $n = 6$). Ezek az eredmények is alátámasztják, hogy a fokozott HE4 termelés és/vagy felszabadulás a tüdőből származhat CF-ben és mindez emelkedett szérumkoncentrációhoz vezet.

	CF-es beteg (n=6)	Nem CF-es tüdőbeteg (n=8)	Kontroll (n=5)
Életkor (év)	11 (7-12)	14 (6-17)	12 (11-15)
Köpet HE4 (pmol/L)	60059 (25427-105250)	13219 (9160-31709)	7330 (4963-7946)
Szérum CRP (mg/L)	6,3 (1,0-8,3)	12,9 (0,9-29,6)	NM

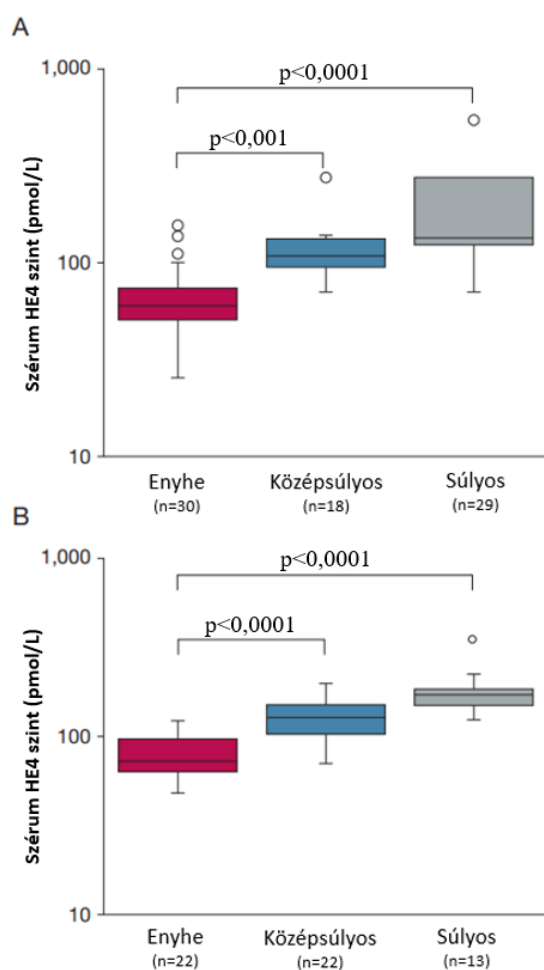
6. táblázat: HE4 koncentráció meghatározás CF-es köpetminták felülúszójában szemben nem CF-es tüdőbetegségben szenvedő és kontroll személyek mintáival. A gyulladásos klinikai állapot felmérése érdekében a mintavétel időpontjában levett szérummintából CRP meghatározás is történt, kivétel a normál kontrollokat. Az eredményeket medián érték (interkvartilis tartomány) formában fejeztük ki. NM: nem mért adat.

5.1.3. A magas szérum HE4 szoros összefüggést mutat a CF-es tüdőbetegség súlyosságával, a kóros légzésfunkcióval és az emelkedett CRP szinttel

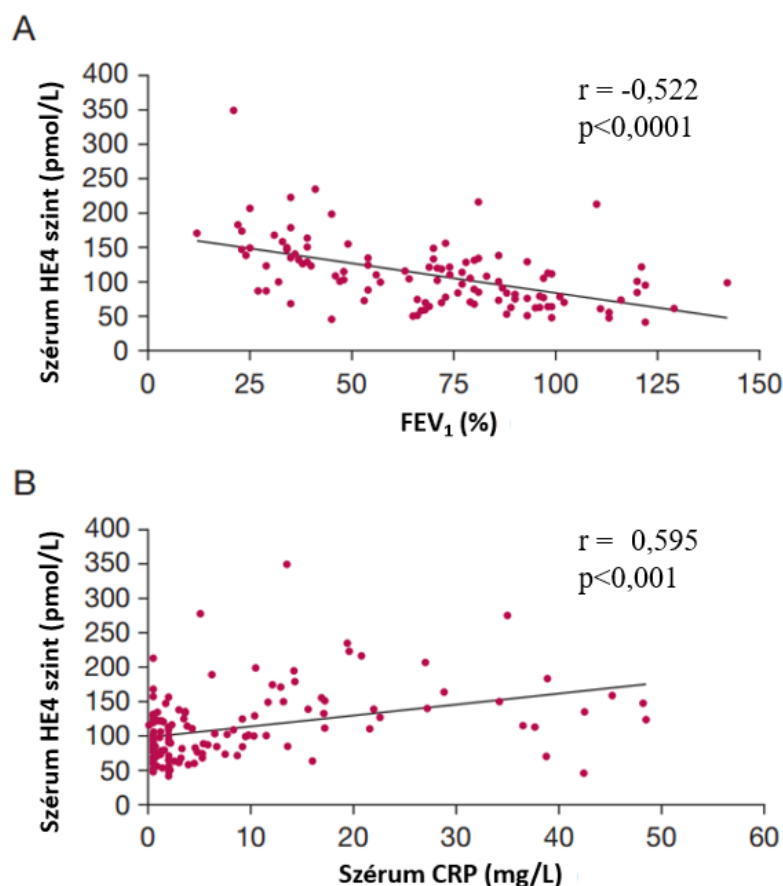
A HE4 biomarker diagnosztikai értékének további vizsgálata céljából megnéztük, hogy van-e összefüggés a HE4 szintek és a CF-es tüdőfolyamatok súlyossága között. A HE4 szint a betegség súlyosságával erős, pozitív összefüggést mutatott mindkét CF-es betegcsoportban. Szignifikánsan magasabb HE4 szinteket mértünk már a mérsékelt súlyos CF-es gyermekekben is (108,0 [95,8-133] pmol/L) az enyhe tüneteket mutató betegekhez képest (60,8 [50,7-73,8] pmol/L). Ugyanakkor még magasabb HE4 szinteket mutattak a súlyos állapotú betegek (134,9 [124,5-275,0] pmol/L; $p < 0,0001$ összehasonlítva az enyhe esetekkel) (7/A ábra). A CF-es felnőtt betegek esetén szintén szorosan összefüggött a HE4 szint a betegség súlyosságával: enyhe esetekben alacsonyabb (72,5 [64,1-94,8] pmol/L), a közepes súlyos betegekben már jóval magasabb (126,5 [104,3-148,3] pmol/L), míg a súlyos csoportban pedig nagyon magas (170,8 [146,8-182,9] pmol/L; $p < 0,0001$ összehasonlítva az enyhe esetekkel).

HE4 értékeket találtunk (7/B ábra). Ugyanakkor a közepsúlyos és a súlyos CF-es betegek között is volt szignifikáns különbség ($P < 0,05$) a szérumban HE4-ben mindkét életkorcsoportban.

Ennek folytatásaként statisztikailag értékeltük Spearman tesztel, hogy HE4 koncentráció és a tüdőbetegség súlyosságát érzékenyen jelző légzésfunkciós paraméter a FEV₁ % értékei között van-e kimutatható összefüggés. Szignifikáns, fordított korrelációt találtunk a HE4 eredmények és a FEV₁ % értékek között (Spearman rho: -0,522; $P < 0,0001$) (8/A ábra). Ezek az eredmények is azt sugallják, hogy minél rosszabb pulmonális állapotban van egy CF-es beteg, annál több HE4 termelődhet, mely idővel bejutva a keringésbe, mérhetővé válik a perifériás vérmintában.



7. ábra: A szérumban HE4 és a betegek klinikai állapotának összefüggése gyermek (A) és felnőtt (B) CF-es betegcsoportban. Mindkét kohorsz betegeit 3-3 (enyhe, közepsúlyos és súlyos) kategóriába soroltuk. A szérumban HE4 koncentrációk mindkét vizsgált populációban fokozatosan emelkedtek a klinikai állapot súlyosbodásával párhuzamosan. Az adatokat medián érték (interkvartilis tartomány) formában ábrázoltuk. Az egyes alcsoportok közötti összehasonlítást Mann-Whitney U teszttel végeztük.



8. ábra: A szérums HE4 koncentrációk összefüggésének vizsgálata a FEV₁ %-os értékekkel (A) és szérums CRP szintekkel (B) CF-ben. Statisztikailag szignifikáns, fordított korrelációt találtunk ($P < 0,0001$) a szérums HE4 és a FEV₁ % értékek között, ami arra utal, hogy a HE4 erősen összefügg a légzésfunkció romlásával (A). Ezen túlmenően a HE4 erősen korrelált a CRP értékekkel is, mely az aktív gyulladás és a HE4 expresszió fokozódásának kapcsolatára utalhat. Mindkét korreláció Spearman teszttel történt. CRP: C-reaktív protein.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a HE4 változásai és az emelkedett CRP szintek között van-e bármi kapcsolat azokban a CF-es betegekben, akiknél elérhető volt az utóbbi adat is. Szignifikáns, pozitív összefüggés volt a szérums HE4 és a CRP értékek között a súlyos állapotú CF-es gyermekekben, valamint az összes felnőtt CF-es betegben (Spearman rho: 0,595; $P < 0,001$) (8/B ábra). Ezzel szemben a nem CF-es tüdőbetegekben nem találtunk összefüggést a két paraméter között. Eredményeink alapján a szérums HE4 tehát egy új érzékeny légúti gyulladásos paraméterként viselkedhet a CRP mellett. Ezt az is bizonyítja, hogy a HE4 és a CRP laboratóriumi karakterisztikájának ROC görbe analízissel történt összehasonlítása során a

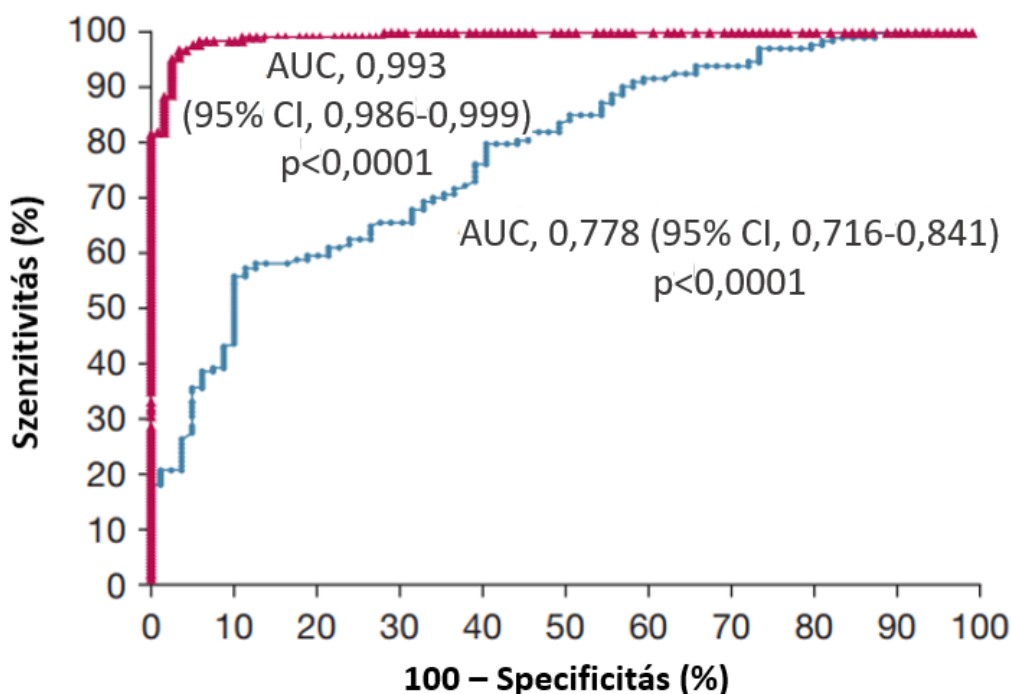
HE4 jelentős AUC értéke (0,724) (95% CI, 0,617-0,830; $P < 0,0001$) sokkal magasabb volt, mint a CRP esetén (AUC: 0,453, 95% CI, 0,347-0,559; $P = 0,435$).

5.1.4. A szérum HE4 kapcsolatának vizsgálata a krónikus bakteriális kolonizációval és a CF-hez társuló egyéb komorbiditásokkal

A pozitív mikrobiológiai eredményeket mutató CF-es gyermekek esetén szignifikánsan magasabb HE4 szinteket mértünk a bakteriális kolonizáció nélküli esetekhez képest (106,5 [75,8-133,3] pmol/L vs. 78,3 [61,4-96,9] pmol/L; $P = 0,001$). Ugyanakkor az összes beválogatott CF-es felnőtt betegben kolonizációt kimutattak, ezért az ő esetükben nem tudtuk vizsgálni a HE4 és a krónikus bakteriális kolonizáció közötti kapcsolatot. A CF asszociált diabetes mellitus jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta a HE4 szintet (DM: 102,6 [97,8-121,5] pmol/L szemben a nem diabeteses betegekkel: 91,1 [64,7-128,9] pmol/L; $P = 0,645$). Ezzel szemben a hasnyálmirigy elégtelenség a felnőtt CF-es betegekben jóval magasabb HE4 koncentrációkkal társult az egészséges pancreas funkcióval bíró betegekhez képest (122,2 [84,1-149,6] pmol/L vs. 96,8 [73,8-108,8] pmol/L; $P = 0,037$).

5.1.5. A szérum HE4 labordiagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálata CF-ben

Megvizsgáltuk a HE4 potenciális diagnosztikai szerepét a teljes CF-es betegpopulációban lemert eredmények felhasználásával ROC-görbe analízissel. Ezek alapján a HE4-re vonatkozó AUC érték 0,993 volt (95% CI, 0,986-0,999; $P < 0,0001$) 49,3 pmol/L-es küszöb érték mellett, így ez a biomarker a CF-es betegek és az egészséges kontroll személyek hatékony elkülönítésére alkalmas (9. ábra). A HE4 szenzitivitása, specificitása, pozitív prediktív értéke (PPV) és negatív prediktív értéke (NPV) a következő értékeket mutatta: 97,0%, 96,6%, 66,5% és 96,6%. Amennyiben a CF-es és nem CF-es tüdőbetegségek elkülönítése céljából határoztuk meg az AUC értéket a HE4-re vonatkozóan, az értéke valamennyivel alacsonyabbnak bizonyult (AUC: 0,778, 95% CI, 0,716-0,841; $P < 0,0001$), 56,0%-os szenzitivitással, viszont magas, 90,0%-os specificitással 98,4 pmol/L-es küszöb érték mellett (PPV: 64,6%, NPV: 90,4%) (9. ábra).



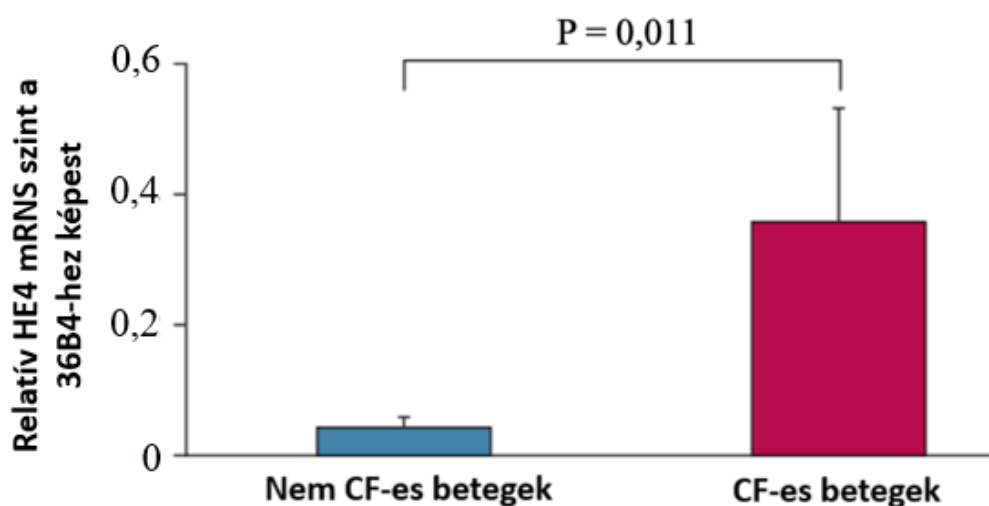
9. ábra: A szérums HE4 biomarker ROC-görbe analízise a CF-es és az egészséges személyek (háromszög), valamint a CF-es és a nem CF-es tüdőbetegségek (kör) elkülönítése céljából. Az AUC görbék alapján a 49,3 pmol/L cut-off érték mellett a HE4 alkalmas a CF-es betegeket az egészséges egyénektől, míg 98,4 pmol/L cut-off értéknél a CF-et az egyéb tüdőbetegségektől elkülöníteni. Rövidítés: AUC: area under the curve.

Megvizsgáltuk ebben a vizsgálat-sorozatban végül azt is, hogy a verejtékklorid eredmények mutattak-e bármilyen összefüggést a HE4 értékekkel. Pozitív, de mérsékelt összefüggést találtunk a szérums HE4 szintek és a verejtékklorid értékek között (Spearman rho: 0,345; $P = 0,005$). Külön értékeltük a HE4 szinteket azokban a betegekben ($n=8$), akiknek határérték tartományba esett a verejtékklorid mérés eredménye (30-60 mmol/L). A CF-es betegek ezen alcsoportjában hasonlóan magas HE4 eredményeket kaptunk (100,9 [88,2-115,0] pmol/L), mint az egész CF-es kohorszban. Az alacsony esetszám miatt azonban további vizsgálatok szükségesek a „borderline” verejtékklorid értékekkel bíró CF-es betegek körében.

5.1.6. Emelkedett HE4 mRNS szint mutatható ki CF-es hörgőnyálkahártya biopsziás mintákban

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a CF-es betegek szérumában mért magas HE4 szintek hátterében milyen celluláris folyamat állhat. Feltételeztük, hogy a masszív gyulladás hatására a

HE4 fehérje a károsodott légúti epithelsejtekből nagy mennyiségben szabadul fel, vagy a hörgőnyálkahártya nagy mennyiségben termeli a légutakban. Ennek igazolására három CF-es betegtől hörgőnyálkahártya biopsziás mintát vettünk bronchosopia során, míg három másik nem CF-es bronchitises beteg kontrollként szolgált. A CF-es betegekből származó mintákban szignifikánsan emelkedett HE4 mRNS szintet találtunk a nem CF-es kontroll betegekhez képest (átlag $\pm$ SEM, HE4/36B4 hányados: $0,354 \pm 0,178$ vs. $0,041 \pm 0,017$; $P = 0,011$) ($n = 3$ csoportonként). Eredményeink alapján az emelkedett szérum HE4 koncentráció potenciális forrása a légúti epithélium lehet CF-ben (10. ábra).



10. ábra: A HE4 mRNS szint meghatározása három CF-es és három nem CF-es betegtől származó, bronchosopia során nyert hörgőnyálkahártya biopsziás mintákban. Az össz RNS izolálását követően RT-qPCR-t használtunk a HE4 mRNS kvantálására. A CF-es mintákban szignifikánsan magasabb HE4 mRNS expresszió volt kimutatható a nem CF-es kontroll mintákhoz képest, melyet a referenciagénként használt 36B4 expressziójához viszonyítottunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában fejeztük ki. Rövidítés: mRNS: messenger RNS

5.2. A HE4 plazmakoncentrációjának követése *ivacaftor* kezelés alatt álló CF-es betegcsoportokban

A második klinikai vizsgálatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon képes-e a HE4 a klinikai/pulmonális állapot hatékony nyomon követésére olyan CF-es betegekben, akik nem hagyományos kóroki kezelésben, hanem már CFTR-specifikus terápiában részesültek. Mivel

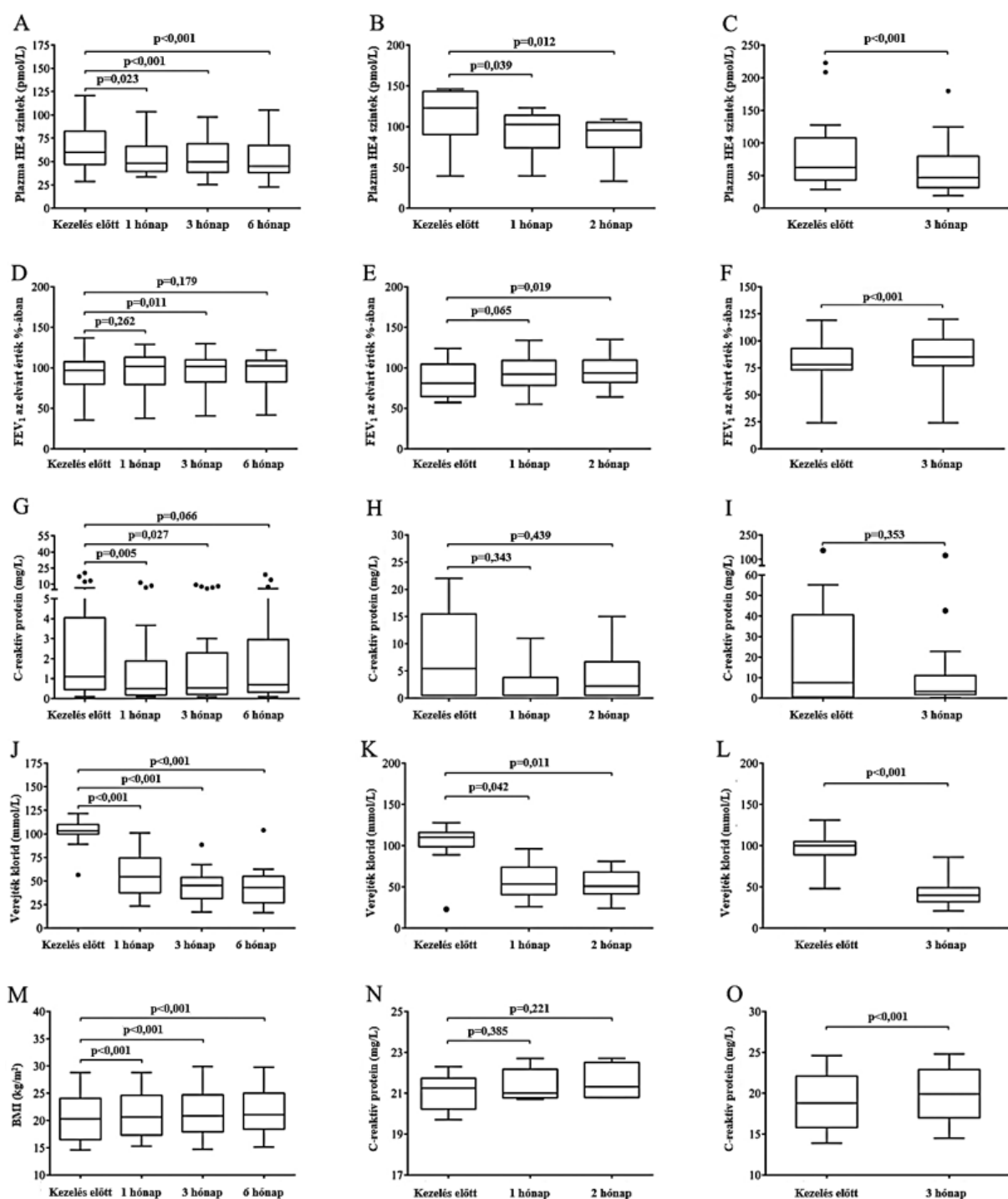
jelenleg is nagyon költséges gyógyszermolekulákról van szó, ezért van olyan nagy klinikai jelentősége annak, hogy olyan relatíve olcsó biomarkert használjunk, mely könnyen lemérhető, reprodukálható és érzékenyen követi a légzésfunkció, valamint a klinikai státusz változását.

5.2.1. A három független, *ivacaftor* kezelt CF-es kohorsz legfontosabb demográfiai és klinikai jellemzői

A fenti célok elérése érdekében a vizsgálati mintákat három, egymástól független centrumból igényeltük meg kollaborációs együttműködés keretén belül. A minták eredete szerint három alcsoportba soroltuk a mintákat (1. csoport: amerikai GOAL-vizsgálat, n=29; 2. csoport: ausztrál-vizsgálat, n=12; és 3. csoport: ír CORK-vizsgálat, n=19), melyekből elsőként határoztunk meg a plazma HE4 koncentrációt (11/A-C ábra). Az *ivacaftor* kezelésben részesült betegek min. egy, a III. osztályba tartozó p.Gly551Asp CFTR variánst mutattak (3. táblázat). A csoportok eltérő súlyosságú tüdőbetegségben szenvedtek a mintavétel időpontjában (11/D-F ábra). Négy kivétellel az összes többi CF-es beteg verejtékklorid szintje > 60 mmol/L volt (11/J-L ábra). A 2. csoportba tartozó ausztrál betegek idősebbek voltak ($P < 0,010$) a másik két csoportban lévő betegekhez képest. Kiemelendő, hogy egyik beteg sem szenvedett beszűkült vesefunkció miatt a szérum kreatinin eredményei alapján (3. táblázat), ami befolyásolhatná a HE4 értékeket [132].

5.2.2. A kiindulási plazma HE4 szintek szignifikánsan csökkentek *ivacaftor* kezelés alatt álló CF-es betegekben

A CF-es betegek mindegyike magasabb HE4 koncentrációt mutatott az előzőekben bemutatott normál HE4 értékekhez képest az *ivacaftor* kezelés megkezdése előtt. Az 1. csoportban a plazma HE4 szintek elkezdtek szignifikánsan csökkenni az *ivacaftor* kezelés kezdése után már 1 hónappal (60,1 [48,2-77,4] vs. 48,2 [40,8-66,2] pmol/L, $P = 0,023$), és a követés végéig jóval a kiindulási érték alatt maradtak (45,1 [38,4-64,2] pmol/L; $P < 0,001$ a kiindulási szinthez viszonyítva) (11/A ábra), párhuzamosan a légzésfunkció (11/D ábra) és a BMI (11/M ábra) finom javulásával és a verejtékklorid koncentráció drasztikus csökkenésével (11/J ábra).



11. ábra: A plazma HE4 szintek követése három független CF-es betegcsoportban *ivacaftor* kezelés előtt és alatt. Az egyes csoportok között a vérvételi időpontokban voltak különbségek attól függően, hogy milyen minták álltak rendelkezésünkre a HE4 analízisre. A HE4 szignifikánsan csökkent mindhárom kohorszban a CFTR-specifikus kezelés hatására (A-C). A HE4 eredményeket a javuló légzésfunkciós paraméter (FEV₁ %) (D-F), a csak kis mértékű változást mutató CRP (G-I), a csökkenő verejtékklorid (J-L) és a kissé emelkedő BMI (M-O) értékek alapján értékeltük. Az adatokat medián érték (interkvartilis tartomány) formában fejeztük ki. Az egyes alcsoportok közötti összehasonlításhoz párosított t-tesztet vagy Wilcoxon párosított tesztet alkalmaztunk.

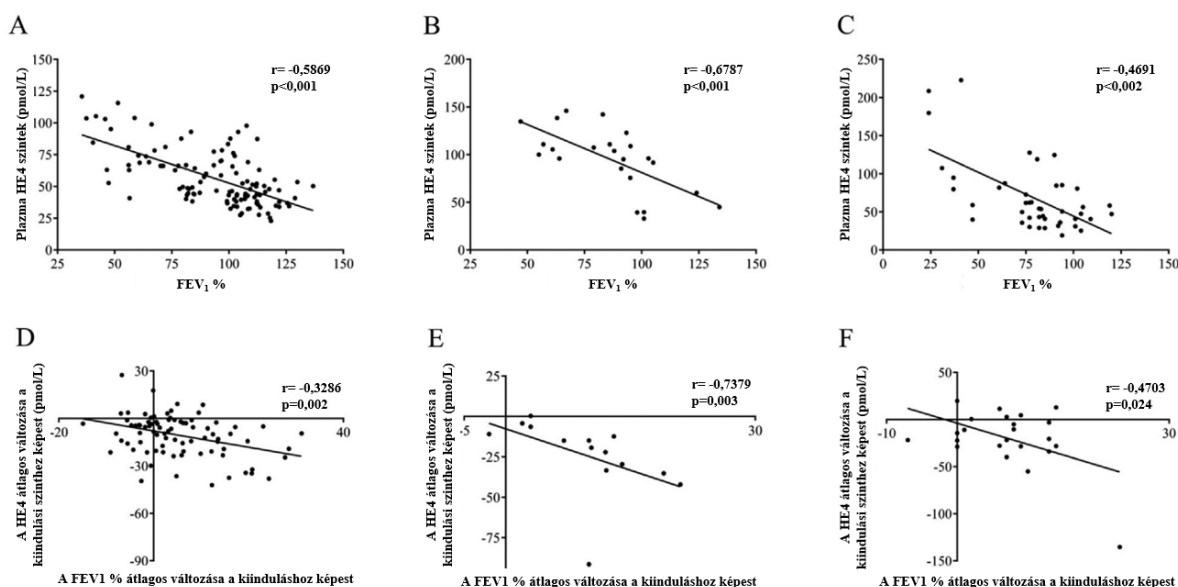
Az átlagosan alacsonyabb FEV₁ %-os értékekkel (medián [min-max] 81,0 [36-137] %), ezáltal rosszabb légzésfunkcióval jellemezhető 2. vizsgálati csoportban a kezelés előtti HE4 szintek - a vártak megfelelően - magasabbak voltak (11/B ábra). Az *ivacaftor* kezelés eredményeképpen szignifikáns HE4 csökkenést láttuk ebben a csoportban is 1 hónap múlva (120,6 [90,9-143,2] pmol/L vs. 99,1 [85,1-113,9] pmol/L; P = 0,039), amit további csökkenés kísért 2 hónap után (95,6 [90,1-101,9] pmol/L; P = 0,012 a kiindulási szinthez képest) (11/B ábra). Ezzel szemben a 3. vizsgálati csoportban a betegek FEV₁ %-os értékei szélesebb tartományban mozogtak (medián [min-max] 78 [24-119] %) (11/F ábra) a másik két csoporthoz képest, és a kiindulási HE4 koncentrációk az 1. csoport értékeihez képest magasabbak voltak (62,7 [45,4-101,2] pmol/L) (11/C ábra). Ebben a csoportban néhány beteg HE4 koncentrációja kiugróan magas volt: az egyik betegnek 208,5 pmol/L HE4 szintet mértünk igen alacsony, 24%-os FEV₁ %-os érték mellett az *ivacaftor* kezelés előtt. Ugyanakkor a 3 hónapos kezelés hatására a HE4 ebben a csoportban is szignifikánsan csökkent (47,3 [35,8-71,1] pmol/L; P < 0,001) (11/C ábra).

Minden esetben meghatároztuk a CRP szintet is. Megjegyzendő, hogy az egyes csoportokban az esetek 26%-ában (1. csoport), 15%-ában (2. csoport) és 22%-ában (3. csoport) a CRP mérhetetlenül alacsony volt (< 0,5 mg/L). Ráadásul az összes CRP eredmény csak 15%-a, 25%-a, illetve 58%-a volt abnormális (5,0 mg/L feletti). Az *ivacaftor* használata alatt az átlag CRP értékek csökkentek (11/G-I ábra), bár ezek a változások nem érték el a statisztikailag szignifikáns szintjét. A kiindulási verejtékklorid szintek 4 eset kivételével a diagnosztikus határérték (60 mmol/L) felett voltak, és gyors, drasztikus csökkenésük volt látható már az első kontroll vizsgálat alkalmával, ami még tovább csökkent a vizsgálati periódus alatt (P < 0,001 és P = 0,011) (11/J-L ábra). A klinikai vizsgálatok során a betegek tápláltsági állapotát is monitorozták BMI-vel, melyet szintén a rendelkezésünkre bocsátottak és javuló értékeket regisztráltak (11/M-O ábra).

5.2.3. A plazma HE4 szintje korrelációja a FEV₁ % értékkel és a CRP koncentrációval *ivacaftor* kezelés alatt

A HE4 szintek abszolút és delta (átlagos változás értéke a kiindulási szinthez képest) értékeit a FEV₁ % abszolút és delta értékeivel korreláltattuk külön minden betegcsoportban. Szignifikáns, fordított korreláció volt megfigyelhető a HE4 és FEV₁ % abszolút értékei között (12/A-C ábra). Hasonlóan, a delta HE4 eredmények is eltérő r érték mellett, de szignifikáns

negatív korrelációt mutattak a delta FEV₁ % értékekkel az egyes betegcsoportokban (12/D-F ábra). Amikor az összes betegcsoport adatait egybevettük, továbbra is szignifikáns, reverz összefüggés volt detektálható az abszolút és delta HE4 és FEV₁ % értékek között ($r = -0,5376$; $P < 0,001$ és $r = -0,3285$; $P < 0,001$), különösen az abszolút értékek esetén.



12. ábra: Korrelációs analízisek a plazma HE4 és a FEV₁ % abszolút értékei (A-C), valamint a delta HE4 és delta FEV₁ % (D-F) eredményei között Spearman teszttel. Szignifikáns, fordított összefüggés volt kimutatható a HE4 és a FEV₁ %, valamint a delta HE4 és a delta FEV₁ % értékek között.

Többszörös regressziós analízissel megvizsgáltuk, hogy a plazma HE4 szintek független összefüggést mutatnak-e a légzésfunkciós és laboratóriumi eredményekkel. A HE4 független módon összefüggött a FEV₁ % értékekkel mind az *ivacaftor* kezelés előtt ($\beta = -0,57$; $P = 0,019$) és a kezelés alatt ($\beta = -0,47$; $P = 0,043$), ugyanakkor a HE4 és a CRP között független kapcsolat csak a gyógyszeres kezelés előtt volt igazolható ($\beta = 0,19$; $P = 0,004$). Mindezen eredmények alátámasztják az előzetes adatainkat, miszerint a vérben mérhető HE4 szintje jól követi a légzésfunkció változást és a gyulladásos körülmények alakulását CF-ben.

5.2.4. A plazma HE4 szint képes jelezni a légzésfunkció javulását *ivacaftor* kezelés során CF-es betegekben

Kíváncsiak voltunk ezt követően arra, hogy a plazma HE4 szint képes-e előre jelezni a tüdőbetegség javulását *ivacaftor* kezelés alatt. Ennek céljából az összevont betegpopulációban kiszámoltuk a kiindulási HE4 koncentráció diszkriminatív erejét 7%-os FEV₁ % javulásnál. Ez a FEV₁ % a vizsgálatba bevont CF-es betegek által mutatott átlag értékből adódott. Párhuzamos analízissel összehasonlítottuk a CRP-vel és a verejtékklorid eredményekkel. Azt tapasztaltuk, hogy a HE4 fehérje magas 0,722 AUC érték mellett képes prediktálni a kezelés hatásosságát olyan hatékonyan, mint a jelenleg használatban lévő verejtékklorid teszt (7. táblázat). Az alábbi értékekkel tudtuk tovább karakterizálni a három paramétert: HE4: 74% szenzitivitás, 79% specificitás (cut-off érték: 62,7 pmol/L); CRP: 67% szenzitivitás, 68% specificitás (cut-off érték: 7,6 mg/L); verejtékklorid: 80% szenzitivitás, 83% specificitás (cut-off érték: 99 mmol/L).

	HE4 (pmol/L)	CRP (mg/L)	Verejtékklorid (mmol/L)
1. csoport	0,733 (95% CI 0,522-0,945), P=0,031	0,656 (95% CI 0,414-0,897), P=0,207	0,644 (95% CI 0,470-0,818), P=0,075
2. csoport	0,832 (95% CI 0,541-1,000), P=0,025	0,803 (95% CI 0,626-1,000), P=0,002	0,945 (95% CI 0,790-1,000), P=0,001
3. csoport	0,629 (95% CI 0,379-0,880), P=0,310	0,614 (95% CI 0,352-0,878), P=0,393	0,703 (95% CI 0,556-0,886), P=0,033
Összes csoport	0,722 (95% CI 0,581-0,863), P=0,029	0,691 (95% CI 0,492-0,886), P=0,113	0,741 (95% CI 0,589-0,913), P=0,016

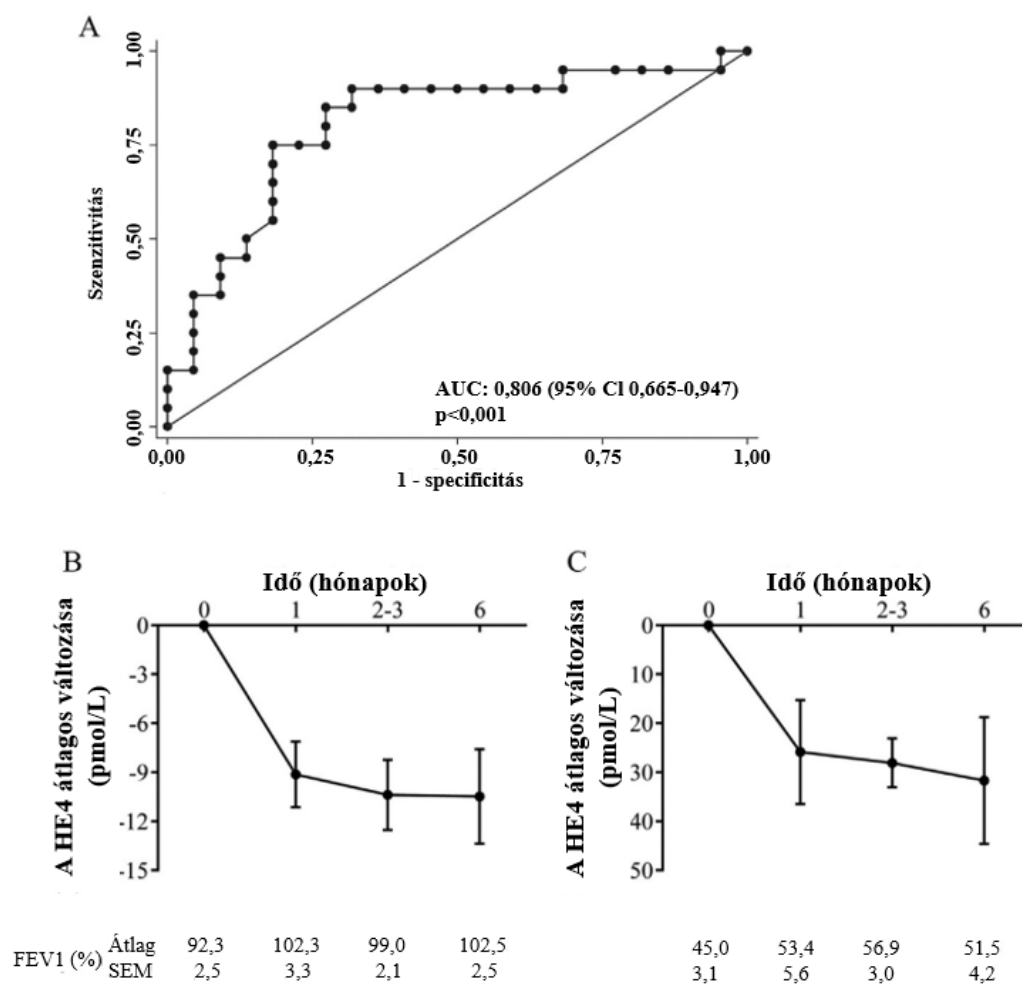
7. táblázat: ROC-görbe analízis a plazma HE4, valamint a CRP és a verejtékklorid prediktív értékének meghatározására a 7%-os FEV₁ % változás előrejelzésében. A kiértékeléseket megcsináltuk mind a három alcsoportban, illetve a kohorszok összesítése után. A könnyen meghatározható HE4 biomarker hasonlóan jól szerepelt, mint a jelenleg használt, de sok esetben nehezen kivitelezhető és reprodukálható verejték teszt a várható légzésfunkciós javulás indikálásában.

5.2.5. A plazma HE4 változás jelentősége már az *ivacaftor* kezelés korai szakaszában különböző súlyosságú légzésfunkció mellett

Az egyes betegcsoportokból származó delta HE4 értékeket először - a légzésfunkció súlyosságától függetlenül - a korai (1-2. hónap) és a késői (3-6. hónap) követési időszakból összeraktuk, hogy kiszámoljuk a HE4 prediktív hatását a FEV₁ % átlagos 7%-os javulása szempontjából. A kezelés első 2 hónapja alatti adatok alapján – az előzőekben bemutatott abszolút HE4-re kapott AUC értékhez képest – a delta HE4 még magasabb AUC értéket

mutatott (0,806 [95% CI 0,665-0,947]; $P < 0,001$) (13/A ábra) 81%-os szenzitivitással és 89%-os specificitással -15,8 pmol/L-es cut-off értéknél. Ezzel szemben a 3-6 hónapos periódusban kevésbé volt prediktív tulajdonságú, némileg kisebb AUC értéket jelezve (AUC: 0,648 [95% CI 0,523-0,773]; $P = 0,020$). Az egész vizsgálati populációban a HE4 -12,1 pmol/L-es átlagos csökkenését tapasztaltuk 2 hónapos kezelést követően (ami megfelel egy 13,9%-os csökkenési rátának), míg 3-6 hónap elteltével érdekes módon nem következett be további jelentős csökkenés (-14,4 pmol/L, -15,6%). Ez a magyarázata annak, hogy a HE4 rövid távon mutatott kellően magas AUC értéket, míg a csökkenés ütemének „plató fázisa” miatt az AUC érték gyengébb volt 3-6. hónapnál. Ez a tendencia egyébként hasonlít a verejtékklorid szintek változásának üteméhez (11/J-L ábra).

A betegeket ezt követően 2 súlyossági alcsoportba osztottuk annak érdekében, hogy vizsgáljuk a HE4 változás mértékét a tüdőbetegség előrehaladottságának függvényében: az enyhe csoportba a 70% és feletti FEV_1 %-os értéket (13/B ábra), a középsúlyos/súlyos csoportba a $< 70\%$ FEV_1 %-ot mutató betegeket soroltuk (13/C ábra). Mindkét alcsoportban csökkenő tendencia mutatkozott a HE4 szintekben az *ivacaftor* kezelésnek köszönhetően, azonban a HE4 jóval nagyobb mértékű csökkenését láttuk az alacsonyabb FEV_1 %-os értékek esetén (13/C ábra). Úgy tűnik, hogy a HE4 nagyobb mértékben jelezheti a légzésfunkció javulását középsúlyos/súlyos CF-ben az enyhe betegséghez képest. Fenti adatok alapján a plazma HE4 szintje elsősorban középsúlyos/súlyos CF-es tüdőbetegségben csökken jobban az *ivacaftor* kezelés alatt, és a változás mértéke jobban jelzi a tüdőbetegség javulását különösen a kezelés első 2 hónapjában.



13. ábra: A plazma HE4 szint változások ROC-görbe analízise a CF-es tüdőbetegség javulásának alátámasztására *ivacaftor* kezelés alatt különböző légzésfunkció mellett. ROC-görbe analízist végeztünk a delta HE4 értékekre vonatkozóan 1-2 hónappal a kezelés megkezdését követően 7%-os átlag FEV₁ % csökkenés esetén (A). A HE4 változás mértékének további vizsgálata olyan egyéneknél, akik FEV₁ % értéke $\geq 70\%$ volt (B), illetve olyan esetekben, amikor a FEV₁ % $< 70\%$ (C). Jóval nagyobb mértékű HE4 változást tapasztaltunk a légzésfunkció javulásával egyidejűleg azoknál a CF-es betegeknél, akiknek alacsonyabb volt a FEV₁ %-os értékük. Az adatokat átlag $\pm$ SEM értékben fejeztük ki.

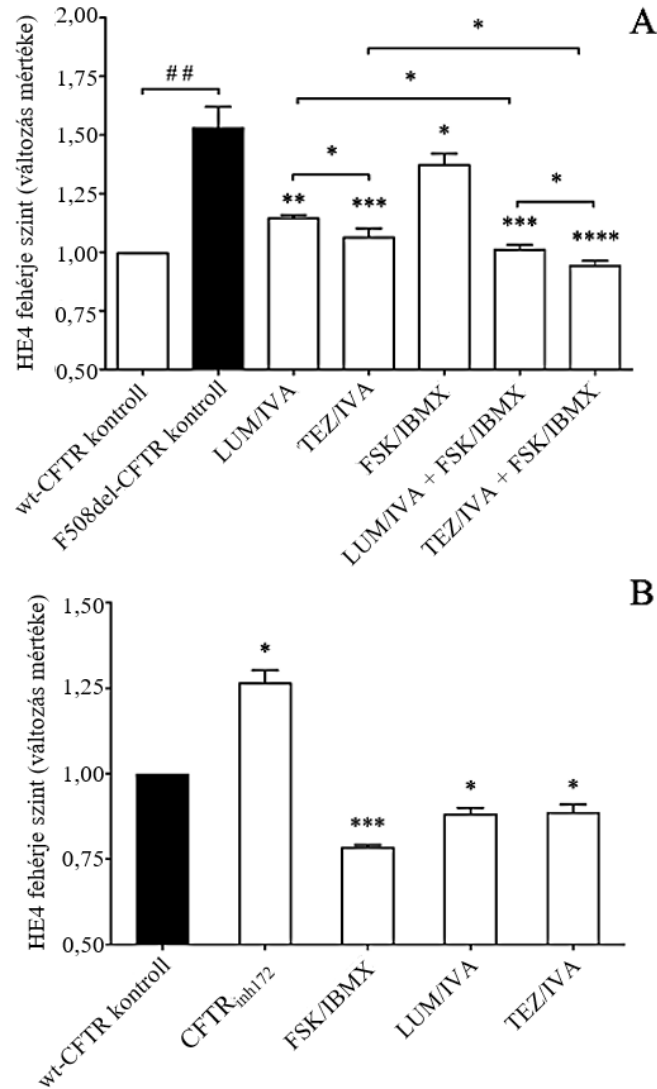
5.3. A fokozott HE4 expresszió mechanizmusának vizsgálata CFBE sejtekben *in vitro* körülmények között

A két előző klinikai vizsgálatunk során egyértelművé vált, hogy a vérben keringő HE4 fehérje koncentrációja jelentősen megemelkedik CF-ben nemcsak egészséges személyek, hanem más, nem CF-es tüdőbetegségben szenvedők mintájához képest is, és ennek egyik fő forrása a légúti nyálkahártya lehet. Az is kiderült, hogy minél rosszabb valakinek a légzésfunkciója és minél nagyobb a gyulladás mértéke, annál magasabb HE4 szintek mérhetők. Ugyanakkor korábban nem volt ismert, hogy a fehérje expressziója milyen szabályozás alatt áll a CF-es légúti epithelsejtekben. Ezért *in vitro* kísérletek során próbáltuk bizonyítani ennek celluláris folyamatát, és azt, hogy a CFTR-specifikus gyógyszeres kezelés miért járt alacsonyabb HE4 plazmaszintekkel.

5.3.1. A CFTR funkció befolyásolja a HE4 koncentrációt a CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában *in vitro*

A sejtes kísérletekhez F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejteket tenyésztettünk és kezeltünk, melyek kontrolljaként wt-CFTR-t hordozó CFBE 41o⁻ sejteket használtunk. Az bazális HE4 koncentráció szignifikánsan magasabb volt a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában, mint a vad típusú sejtekében ($P < 0,01$) (14/A ábra). Ebből kiindulva 24 órán keresztül kezeltük a F508del-CFTR pozitív CFBE sejteket kombinált CFTR-specifikus modulátorokkal (LUM/IVA vagy TEZ/IVA) annak érdekében, hogy ezután meghatározzuk a sejttenyészet felülúszójának a HE4 koncentrációját. Azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan csökkent a HE4 koncentrációja mind a LUM/IVA ($P < 0,01$), mind a TEZ/IVA ($P < 0,001$) kezelést követően a (csak DMSO-t tartalmazó) kontroll mintákhoz képest. A csökkenésnek köszönhetően a CF-es sejtekben a HE4 koncentráció megközelítette a vad típusú sejtekben mért értékeket. Érdekesképpen, a TEZ/IVA valamelyest nagyobb mértékű csökkenést okozott a HE4 koncentrációkban a LUM/IVA-hoz képest ($P < 0,05$) (14/A ábra).

Ezt követően a F508del-CFTR pozitív sejteket kezeltük CFTR-csatorna aktivátorral (FSK/IBMX) önmagában, illetve a fenti CFTR modulátor kombinációkkal együtt. A HE4 protein szintet az FSK/IBMX csökkentette ($P < 0,05$) feltehetően a reziduális CFTR funkció aktiválása révén, míg további csökkenés következett be a kombinált kezelés hatására ($P < 0,05$) a csak CFTR modulátorral kezelt sejtekhez viszonyítva (14/A ábra).



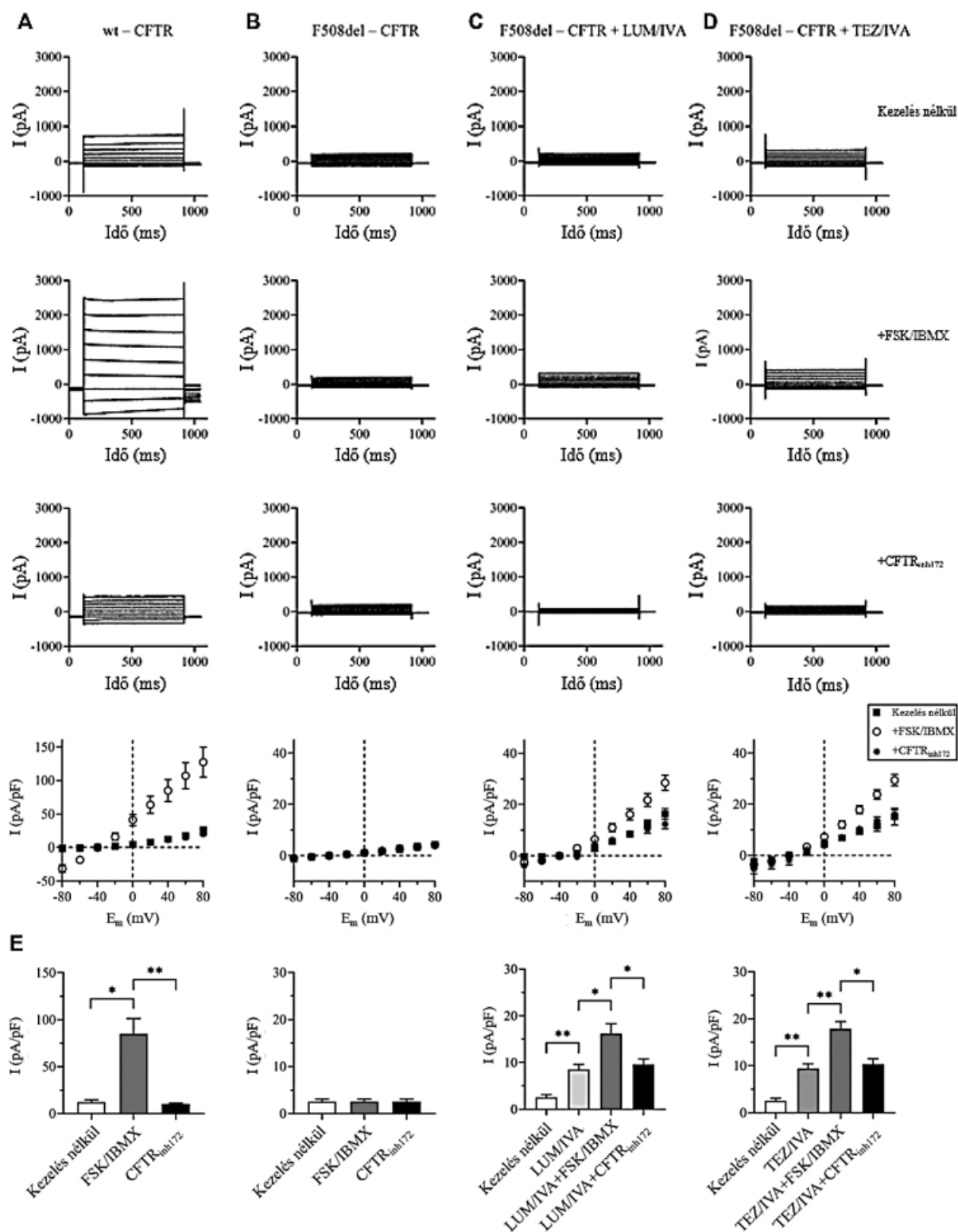
14. ábra: HE4 fehérje koncentráció mérés F508del-CFTR pozitív CFBE (A) és a wt-CFTR CFBE sejtek (B) felülúszójában különböző CFTR funkciót befolyásoló kezeléseket követően. Mind a LUM/IVA (3/10 μ M), mind a TEZ/IVA (5/10 μ M) jelentősen csökkentette a HE4 szintet 24 óra után. A normál CFTR működésű sejtekben a CFTR aktivátor (FSK/IBMX, 10/100 μ M) csökkentette, míg a CFTR inhibitor (20 μ M) növelte a HE4 mennyiségét. Az egyes mintatípusok közötti összehasonlítást Student t-tesztel vagy Mann-Whitney U tesztel végeztük. ##P < 0,01 vs. wt-CFTR cells; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, and ****P < 0,0001 vs. F508del-CFTR CFBE sejtek DMSO-val.

Az abnormalis CFTR funkció és a sejtenyészet felülúszójában mért HE4 koncentráció közötti összefüggés további bizonyítása céljából, a normál CFBE 41o⁻ sejtekben specifikus CFTR inhibitor (CFTR^{inh172}) alkalmazásával gátoltuk a CFTR-csatornák működését, melynek hatására emelkedett a HE4 koncentráció (P < 0,05). A FSK/IBMX kezelés hatására ebben a

sejttípusban is jelentősen csökkent a HE4 koncentrációja a kontroll mintákhoz képest ($P < 0,001$). Végül a LUM/IVA és a TEZ/IVA kombináció bizonyos mértékben képes volt csökkenteni a HE4 termelődését a vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben is ($P < 0,05$). Ezek az adatok alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy a CFTR funkció képes befolyásolni a HE4 expressziót a CF-es légúti epithelsejtekben, és az abnormális CFTR működés magyarázata lehet az emelkedett szérum/plazma HE4 koncentrációnak (14/B ábra).

5.3.2. A CFTR modulátorok részlegesen helyreállítják a klorid áramot a F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben

Annak igazolására, hogy a kísérleteinkben alkalmazott CFTR modulátor molekulák valóban javították a CFTR funkciót a CFBE sejtekben *in vitro*, a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek membránján „egész sejt” patch-clamp technikával megmértük a kloridáram erősségét a CFTR modulátorok kétfajta kombinációjával (LUM/IVA vagy TEZ/IVA) történő 24 órás kezelést követően (15. ábra). A vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben a kloridáram nagy mértékben növelhető volt a FSK/IBMX hatására és egyben gátolható volt a CFTR szelektív inhibitor CFTR_{inh172} alkalmazásával (15/A ábra). Ezzel szemben a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben a kezelések minimális ionáramot eredményeztek, mely nem volt érzékeny sem a FSK/IBMX aktivációra, sem a CFTR_{inh172} gátló hatására. Mindkét CFTR modulátor kombináció szignifikánsan növelte a bazális és az FSK/IBMX stimulált kloridáramot az alap kloridáramhoz képest. Emellett a F508del-CFTR CFBE sejtekben a CFTR_{inh172} képes volt csökkenteni az FSK/IBMX által stimulált ionáramot. A 40 mV-os rögzített potenciál mellett mért ionáram erősség adatok statisztikai analízise igazolta azt, hogy a CFTR modulátorok részlegesen, de jelentős mértékben korrigálták a F508del-CFTR-csatorna funkcióját (15/B-D ábra). A CFTR modulátorok kombinációjával kezelt sejtekben az FSK/IBMX jelenlétében mért ionáram erősség összevethető volt a vad típusú CFTR-t expresszáló sejtek kiindulási helyzetében mért adatokkal (~20 pA/pF), de kisebb mértékű volt az FSK/IBMX által aktivált wt-CFTR-re jellemző értékekhez (~80 pA/pF) képest. A TEZ/IVA kissé nagyobb mértékben növelte a F508del-CFTR klorid ionáramot a LUM/IVA kombinációhoz képest ($9,44 \pm 1,01$ vs. $8,48 \pm 1,14$ pA/pF; $P = 0,560$) (15/E ábra). Összegzőképpen, a LUM/IVA és TEZ/IVA alkalmazása részlegesen helyreállította a CFTR funkciót a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben, így a HE4 méréssel kapott eredmények specifikusnak mondhatók.

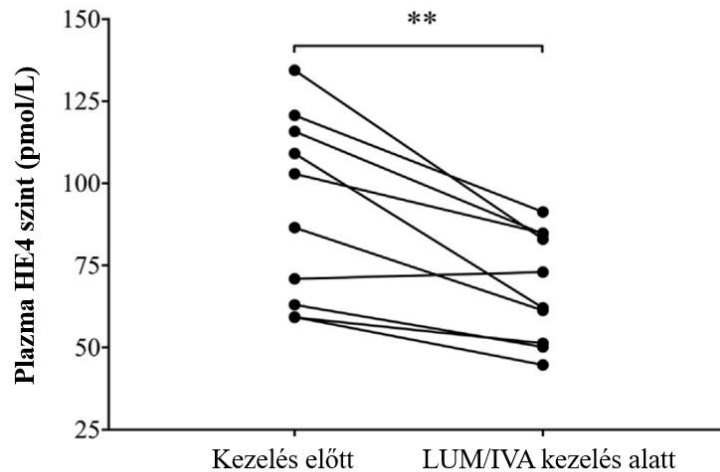


15. ábra: A kloridáram helyreállítása LUM/IVA és TEZ/IVA kezelt F508del-CFTR CFBE 410⁻ sejtekben. A mért kloridáram erősségének jellegzetes változásai vad típusú CFTR CFBE sejtekben (A), a F508del-CFTR CFBE sejtekben (B), illetve LUM/IVA (3/10 μ M) (C) és TEZ/IVA (5/10 μ M) kezelt F508del-CFTR CFBE sejtekben (D). Felső képsor: bazális áram; középső képsor: FSK/IBMX (10/100

μM) kezelés után; alsó képsor: FSK/IBMX (10/100 μM) és CFTR inhibitor CFTR_{inh172} (20 μM) együtt. Az alsóbb ábrarészen a csúcsáram-feszültség (pA/pF) mértékét követtük nem kezelt, csak FSK/IBMX és FSK/IBMX + CFTR_{inh172} jelenlétében. Az oszlopok a pA/pF értékek összesítését ábrázolják a különböző körülmények között kezelt normál és a F508del-CFTR CFBE sejtekben (E). Az egyes mintatípusok közötti összehasonlítást Student t-tesztel vagy Mann-Whitney U teszttel végeztük. *P < 0,05, **P < 0,01.

5.3.3. A LUM/IVA kezelés csökkenti a plazma HE4 szinteket a p.Phe508del-CFTR mutációra homozigóta CF-es betegekben

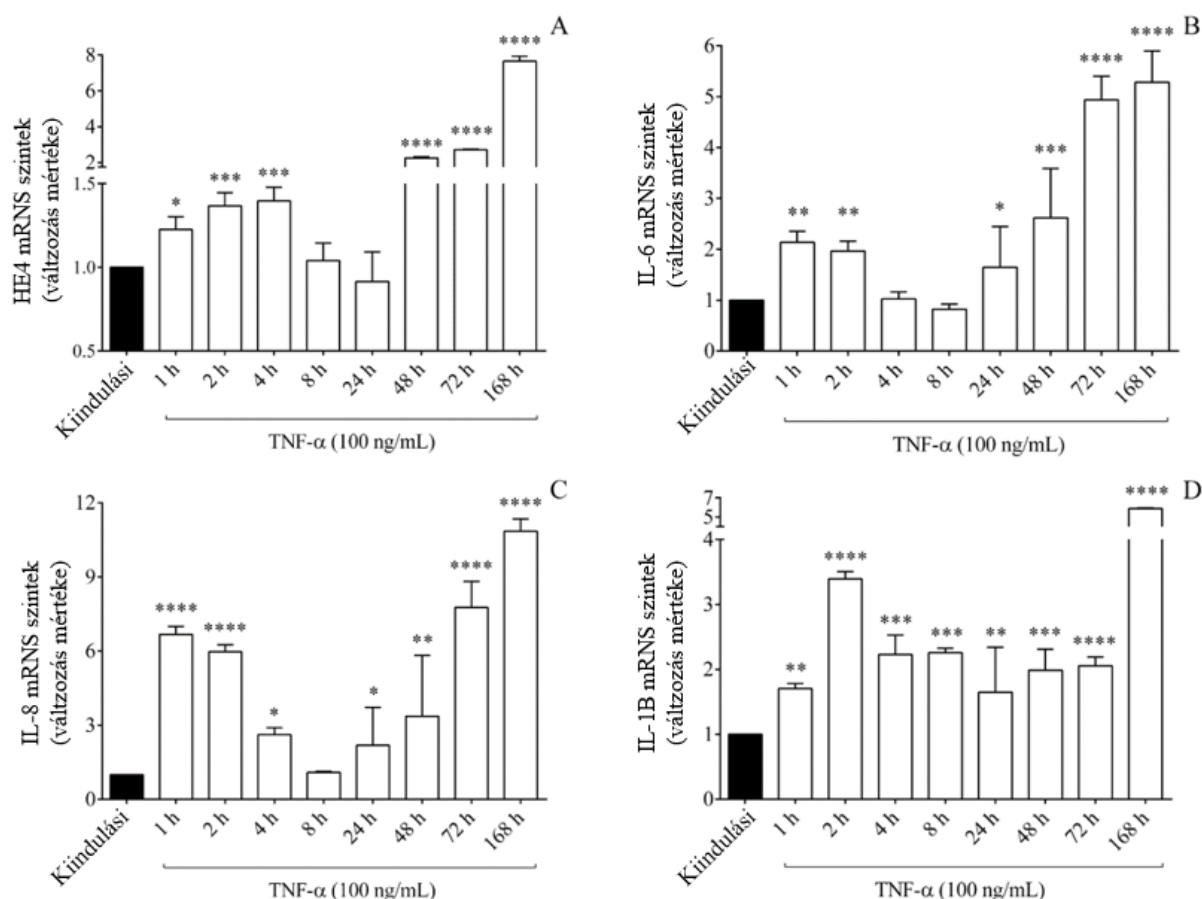
Annak igazolására, hogy az ugyanolyan CFTR mutációt mutató sejtek kísérleteiben kapott HE4 expresszió változás *in vivo* is igazolható, illetve a HE4 alkalmas biomarker lehet nemcsak az *ivacaftor*, hanem más CFTR specifikus kezelések monitorizálására is, ezért 10 Orkambi® (LUM/IVA) kezelés alatt álló, p.Phe508del-CFTR homozigóta genotípusú CF-es beteg plazmamintáinak HE4 koncentrációját határoztuk meg (16. ábra). A kezelés előtti és a terápia megkezdése után 1 hónappal levett plazma mintákat fagyasztott állapotban – hasonlóan az *ivacaftor* kezelt betegmintákhoz - a CFFT Biorepository biobankból kaptuk. A kezelés eredményeként csökkenő verejtékklorid koncentrációval párhuzamosan szignifikánsan alacsonyabb HE4 koncentrációt találtunk ezen betegek plazmamintáiban is (P < 0,01) egy hónapos kezelést követően, függetlenül a kiindulási HE4 értéktől (16. ábra). Ezek az újabb klinikai adatok aláhúzzák a CFTR modulátor kezelés befolyásoló hatását is a vérmintában mérhető HE4 koncentrációra CF-ben, illetve alátámasztják a fenti CFTR specifikus gyógyszer-molekulák hatását a HE4 expresszióra *in vitro*.



16. ábra: Orkambi® (LUM/IVA) kezelés alatt álló, p.Phe508del-CFTR homozigóta genotípusú CF-es beteg plazmamintáinak HE4 koncentráció mérése kezelés előtt és 1 hónap után. A terápia hatására jelentősen csökkent a HE4 szintje, mely bizonyítja, hogy nemcsak *ivacaftor* kezelés esetén, hanem más CFTR variáns esetén használt CFTR modulátor terápia során is alkalmas biomarker lehet a HE4 protein. A két mintacsoport közötti összehasonlítást Wilcoxon párosított teszttel végeztük. ** $P < 0,01$.

5.3.4. A TNF- α indukálja a HE4 mRNS szintet a CFBE 41o⁻ sejt kultúrákban

Megvizsgáltuk, hogy a *WFDC2/HE4* expresszió fokozható-e gyulladásos stimulus alkalmazásával *in vitro* körülmények között. Ennek érdekében a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejteket rekombináns TNF- α -val stimuláltuk egy óra hosszától egy hétig terjedő időintervallumban, majd RT-qPCR módszerrel lemértük a HE4 mRNS szintet. A gyulladásos sejtaktiváció eredményeképpen a HE4 mRNS szint már egy órás kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a nem kezelt mintákhoz képest ($P < 0,05$) és még tovább emelkedett a 4 óráig kezelt mintákban ($P < 0,001$). Meglepetésünkre, a HE4 mRNS szintek 24 órán után visszatértek a kiindulási értékre. Abban az esetben, ha a TNF- α stimulust hosszabb ideig alkalmaztuk (48 órától 1 hétig), még magasabb HE4 mRNS expressziót mértünk a nem stimulált kontroll sejtekhez képest ($P < 0,0001$) (17/A ábra).

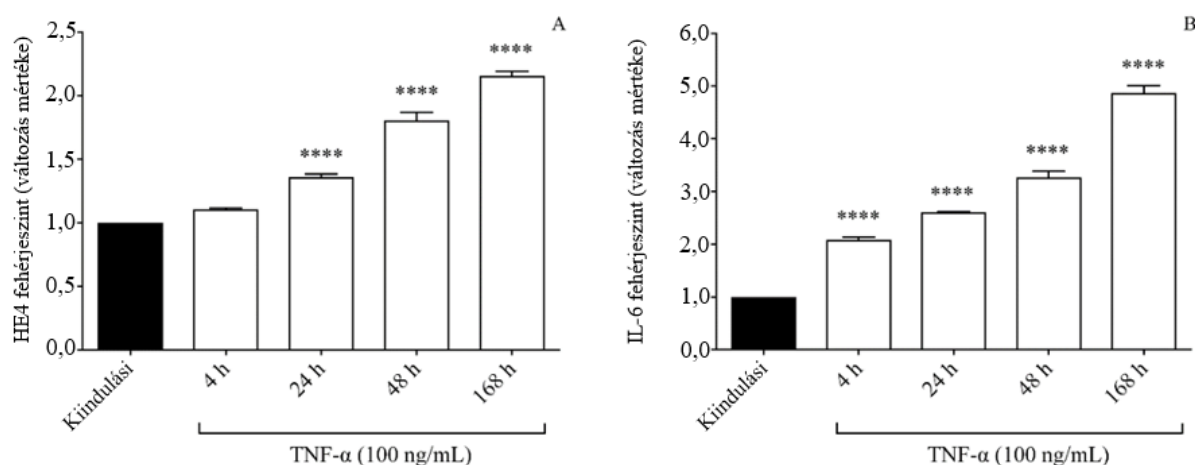


17. ábra: HE4, IL6, IL8 és IL1B mRNA szintek kvantálása F508del-CFTR CFBE 410⁻ sejtekben *in vitro* TNF- α stimuláció után (1 órától 1 hétig). A HE4 mRNA szint 1–4 óra között fokozatosan nőtt a TNF- α (100 ng/mL) hatására, majd 24 órára visszatért a bazális szintre, míg ezt követően még magasabb expressziós szintet mutatott egészen 1 hétig (A). Az IL6 mRNA szint indukálódott már 1–2 óra után, majd 24 óra után további növekedést jelzett (B). Az IL8 expresszió hasonló változást mutatott a HE4-hez és az IL6-hoz (C), míg az IL1B mRNA tartósan emelkedett maradt a teljes aktivációs periódusban (D). Az eredmények átlag $\pm$ SEM formában vannak ábrázolva, (n = 4–5 minta/kondíció). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. kiindulási állapot, a statisztikai számítások ANOVA-val és Bonferroni *post-hoc* teszttel történtek.

Ugyanezen kísérleti körülmények között a proinflammatorikus citokinek közül az IL6, IL8 és IL1B mRNA szinteket is meghatároztuk annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a TNF- α stimulus ezen gyulladásos mediátorok termelődését is ténylegesen fokozta, párhuzamosan a HE4 expresszióval (17/B-D ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy az IL6 és IL8 expresszió időbeli változásának mintázata a HE4 mRNA szintek változásához hasonlóan alakult, míg a szintén 1 órán belül megemelkedett IL1B számottevő változás nélkül emelkedett maradt a teljes

vizsgálati periódus alatt. Megmértük továbbá a HE4 és IL-6 protein szinteket is a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában néhány kiválasztott időpontban (4-168 óra között). Ennek során a HE4 szint 4 óra után jelentősen emelkedett, és 1 héten keresztül fokozatosan tovább nőtt, míg az IL-6 koncentráció az összes kiválasztott mérési időpontban szignifikánsan emelkedett volt (17/B-D ábra). Ezek az eredmények alátámasztják azt, hogy a fokozott HE4 mRNS szintézis, majd az ebből következő magasabb HE4 fehérje koncentráció a TNF- α hatására a különböző gyulladásos citokinek emelkedett szintjével együtt következik be a CFBE sejtekben.

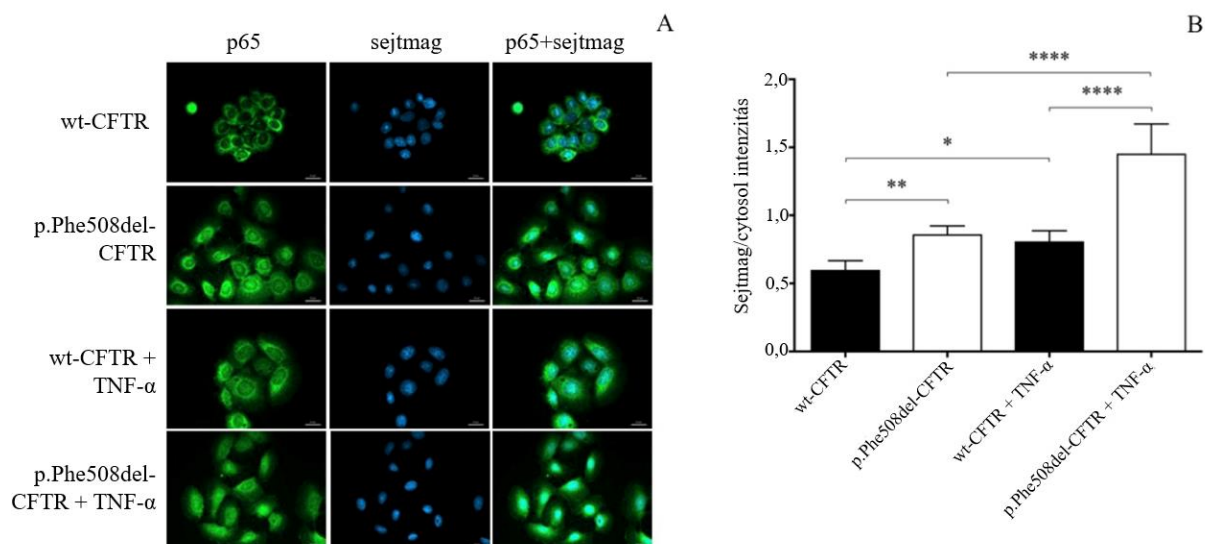
Nemcsak mRNS szinten, hanem fehérje szinten is emelkedő értékeket mutattak a HE4 és az IL-6 koncentrációk a F508del-CFTR CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában a különböző kezelési időpontokban (4-168 óra között). Míg a HE4 szint - „elcsúszva” az mRNS szintjétől - csak 24 óra után mutatott szignifikáns növekedést ($P < 0,0001$), addig az IL-6 fehérjeszint mindvégig emelkedett volt, már 4 órát követően is (18/A és B ábra).



18. ábra: A HE4 és az IL-6 protein szintek meghatározása TNF- α aktivált F508del-CFTR CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában. Az mRNS kvantálással párhuzamosan, a fehérje koncentrációkat is meghatároztuk ezen CFBE 41o⁻ sejt kultúrákban TNF- α (100 ng/mL) stimulációt követően 4-168 órát követően szemben a nem kezelt, kiindulási állapottal. A HE4 fehérje csak 24 óra után nőtt szignifikánsan, míg az IL-6 végig indukálódott. Az eredmények átlag $\pm$ SEM formában vannak ábrázolva, $n = 3-4$ minta/kondíció. Az összehasonlítások ANOVA-val, illetve Bonferroni *post-hoc* teszttel készültek. **** $P < 0,0001$ vs. kontroll minták (PBS).

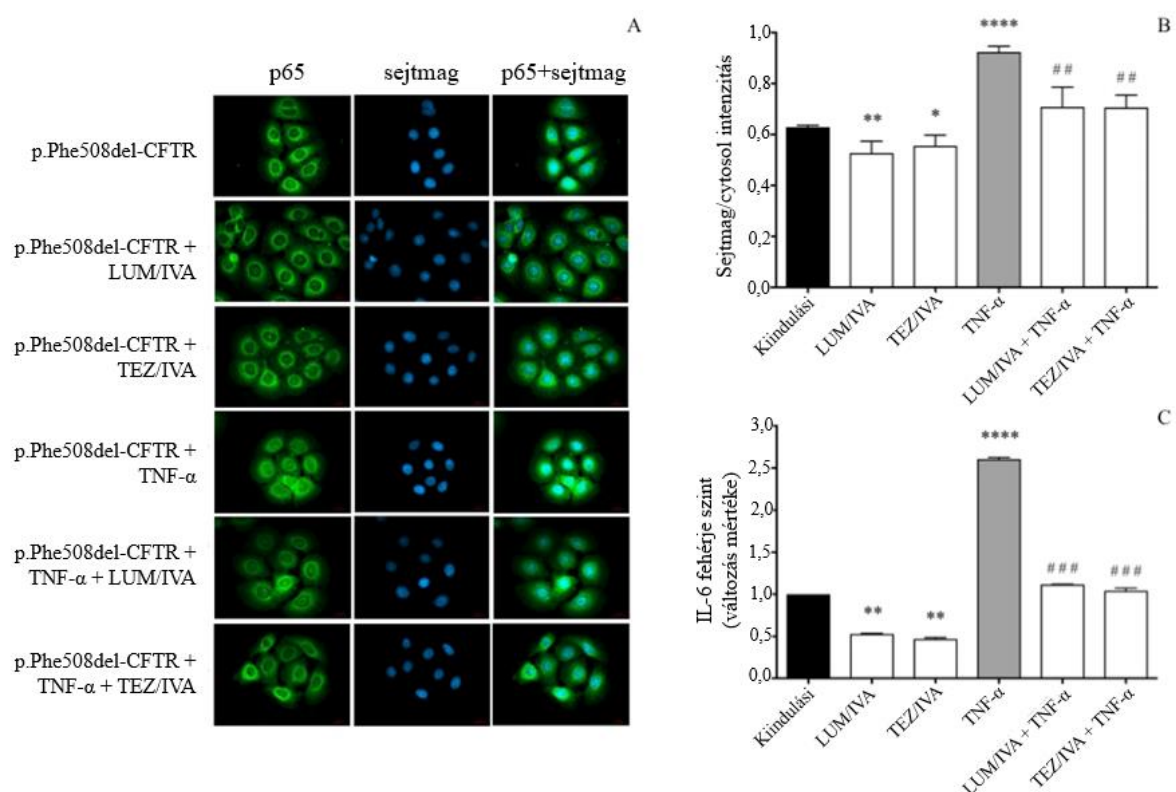
5.3.5. A CFTR modulátorok hatással vannak az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivitására a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben

Az NF- κ B jelátviteli útvonal CFTR diszfunkció kapcsolatáról korábban már jelentek meg adatok [16]. Jelen kísérleteinkben mi is vizsgáltuk, hogy az abnormális CFTR működés által kiváltott fokozott pro-inflammatorikus aktivitás és az emelkedett HE4 expresszió között van-e direkt összefüggés. Ennek érdekében két kísérleti megközelítést alkalmaztunk. Először, az NF- κ B útvonal aktivitását értékeltük a p65 alegység nukleáris transzlokációjának vizsgálatával immunfluoreszcens mikroszkóppal. Ez a protein (másik nevén RelA, MIM: 164014) az NF- κ B transzkripciós faktor család 5 tagjának az egyike, és az NF- κ B útvonal aktivációjának markereként használatos. A p65 nukleáris transzlokáció mértékét összehasonlítottuk a TNF- α -val kezelt, illetve nem kezelt F508del-CFTR-t, valamint a wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben (19/A és B ábra). A F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek magjában alaphelyzetben is szignifikánsan magasabb p65 pozitivitást találtunk a normális sejtekhez képest ($P < 0,01$). A TNF- α hatására mindkét sejttípusban magasabb nukleáris p65 pozitivitás látszott ($P < 0,05$; $P < 0,0001$), továbbá a p65 transzlokáció tekintetében a normál és CF-es sejtek közötti különbség még szembetűnőbb volt a kezelést követően ($P < 0,0001$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kóros CFTR működéssel bíró CFBE sejtekben alaphelyzetben és gyulladásos stimulus hatására is magasabb a gyulladásos aktivitás szintje az egészséges CFBE sejtekhez képest (19/A és B ábra).



19. ábra: A nukleáris/citoszol p53 pozitívítási arány vizsgálata immunfluoreszcens jelöléssel az NF- κ B útvonal aktivációjának detektálásáért nem stimulált és TNF- α kezelt F508del-CFTR-t vagy wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o– sejtekben. A bazális p53 transzlokáció a CFTR funkció vonatkozásában került megvizsgálva, amikor normál és F508del-CFTR pozitív CFBE 41o– sejteket 100 ng/ml TNF- α -val vagy PBS kezeltünk 4 óráig. Zöld szín: p53 jelölés; kék: sejtmag. Méretarány: 20 μ m (A). Az NF- κ B jelölődés analízise a mag/citoplazma fluoreszcens intenzitás alapján történt (B). Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak bemutatva (n = 6–7 sejt/kísérlet). *P < 0,05, **P < 0,01 és ****P < 0,0001.

Másodszor, *in vitro* vizsgáltuk a CFTR modulátoroknak a bazális és indukált NF- κ B útvonal aktivitásra gyakorolt hatását ugyanezen CFBE sejt kultúrákban. Ennek érdekében LUM/IVA vagy TEZ/IVA hozzáadása után vizualizáltuk a p53 nukleáris transzlokációját, valamint mértük az IL-6 koncentrációját a sejtek felülúszójában (20. ábra).



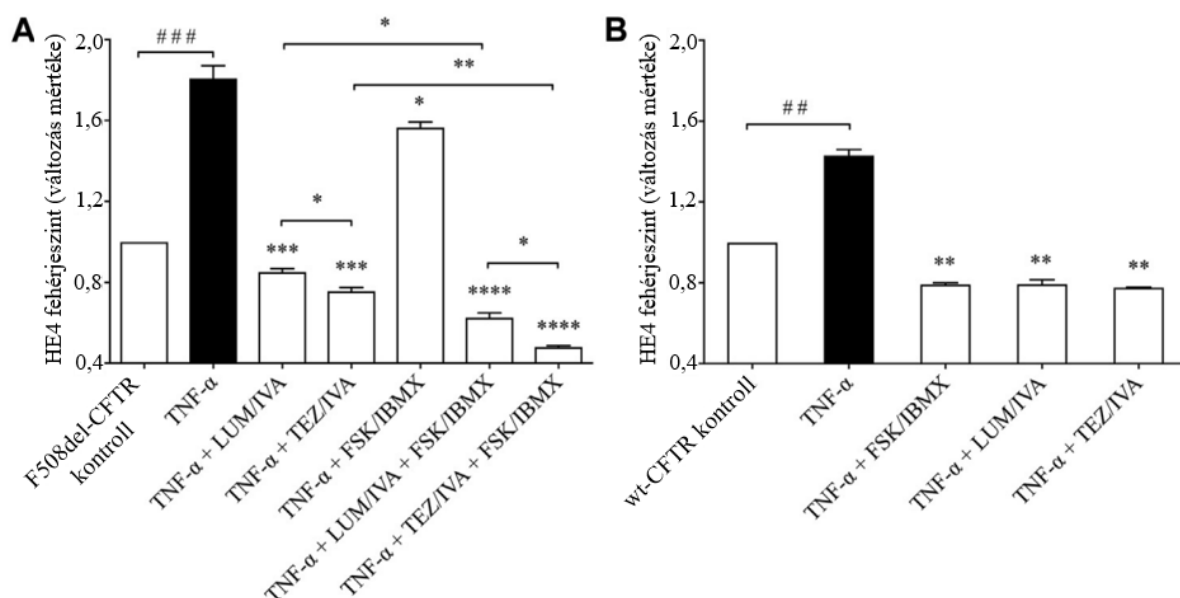
20. ábra: A p65 alegység nukleáris transzlokációjának immunfluoreszcens festése és kvantálása IL-6 protein méréssel együtt CFTR modulátorok jelenlétében nem stimulált, illetve TNF- α kezelt F508del-CFTR CFBE 410⁻ sejtekben. A sejtek LUM/IVA vagy TEZ/IVA vagy DMSO kezelést kaptak 24 óráig. A CFBE sejteket azután 100 ng/mL TNF- α -val vagy PBS-sel stimuláltuk 4 óráig. A reprezentatív mikroszkópos képeken (A) a zöld szín: p65 jelölést; a kék szín: sejtmag festést jelenti. A méretarány: 20 μ m (A). Az NF- κ B jelölődés analízise a mag/citoplazma fluoreszcens intenzitás alapján történt (B). A csökkent IL-6 fehérjeszint a nem kezelt és TNF- α stimulált CFBE 410⁻ sejtekben jelezte az NF- κ B út vonal aktiválódásának mérséklődését a CFTR modulátorok által 24 óra után (C). Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak bemutatva. $n = 4-5$ sejt/kísérlet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és **** $P < 0,0001$ vs. kontroll sejtekkel (DMSO); ## $P < 0,01$ és ### $P < 0,001$ vs. CFBE sejtek TNF- α -val and DMSO-val együtt.

A CFTR modulátorok lényegesen csökkentették a p65 pozitivitást ($P < 0,05$) nemcsak a nem stimulált F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben, de TNF- α kezelést követően is szignifikáns csökkenés következett be ($P < 0,001$) a kontroll mintákhoz képest (DMSO) (20/A és B ábra). Ezzel párhuzamosan a korrigált CFTR funkció mellett a F508del-CFTR CFBE sejttenyészetek felülúszójában mért csökkent IL-6 protein szintén igazolták az alkalmazott CFTR modulátorok gyulladáscsökkentő hatását mind a bazális, mind pedig a TNF-

α indukált IL-6 expresszió csökkentése révén (20/C ábra). Eredményeink bizonyítékot adnak arra, hogy az NF- κ B útvonal CFTR diszfunkció következtében kialakult fokozott aktivációja eredményesen csökkenthető *lumacaftor+ivacaftor* vagy *tezacaftor+ivacaftor* gyógyszeres beavatkozással a CFBE sejt kultúrákban.

5.3.6. A CFBE 41o⁻ sejt kultúrák felülűszójában mért HE4 koncentrációt nemcsak az aktiválódott NF- κ B útvonal, hanem a CFTR diszfunkció is modulálja

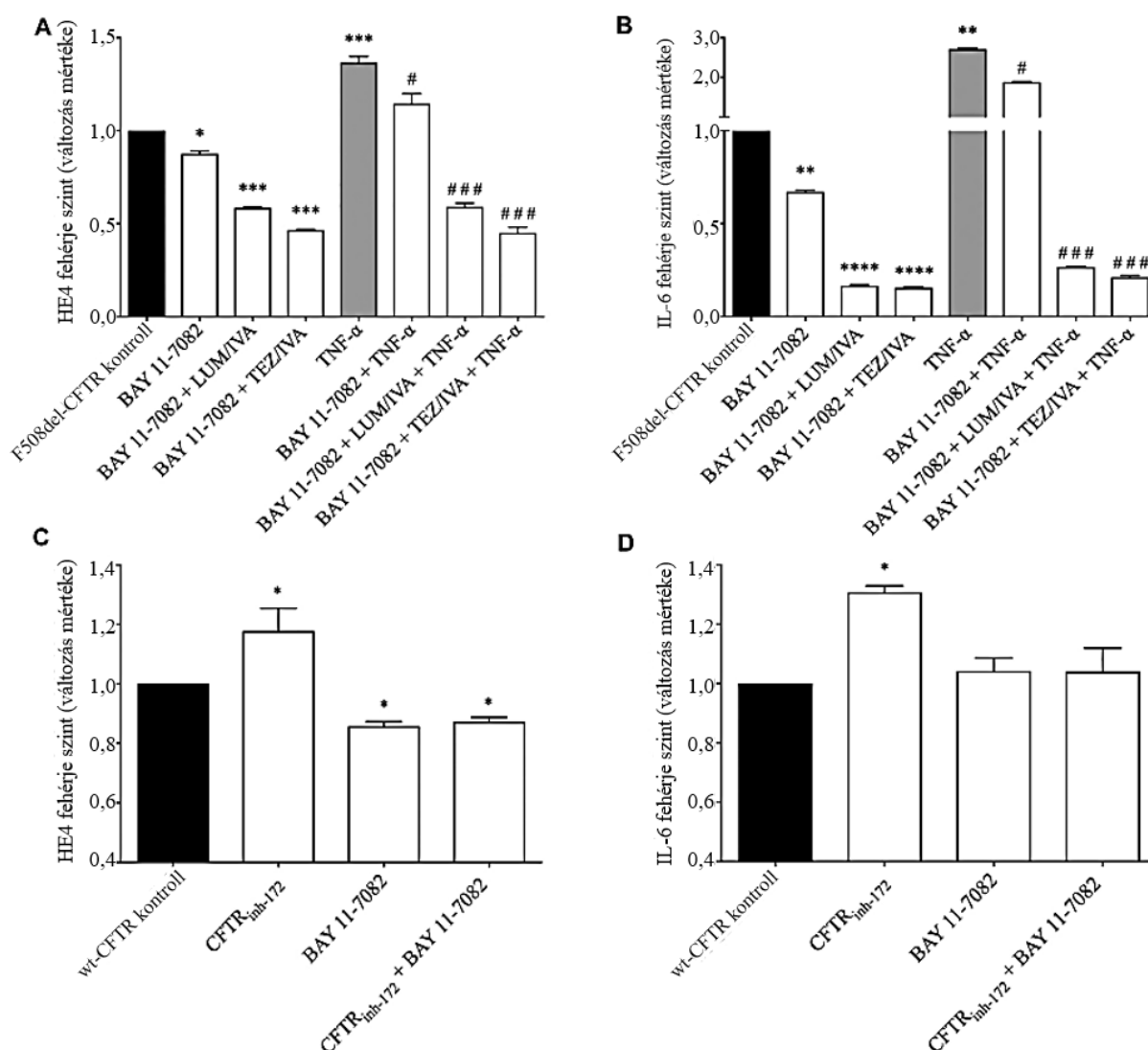
Végül azt a kérdést vizsgáltuk meg, hogy a TNF- α által indukált HE4 expresszió csökkenthető-e CFTR modulátorok alkalmazásával a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben (21. ábra). A LUM/IVA vagy TEZ/IVA hozzáadása a sejtekhez csökkent HE4 szinteket eredményezett ($P < 0,001$) a TNF- α által aktivált CFBE sejtek felülűszójában a kontrollhoz (TNF- α -t és DMSO) képest. Továbbá, a FSK/IBMX alkalmazása önmagában a HE4 szintet mérsékelte, és szignifikáns csökkenést eredményezett a TNF- α jelenlétében ($P < 0,05$), míg a LUM/IVA vagy TEZ/IVA kombinált alkalmazása a FSK/IBMX-szel együtt még nagyobb mértékben csökkentette a HE4 koncentrációt ($P < 0,01$; $P < 0,001$). A TNF- α -val nem stimulált mintákhoz hasonlóan a TEZ/IVA a HE4 szint nagyobb mértékű növekedését eredményezte a LUM/IVA kombinációhoz képest a CFTR aktivátor jelenlétében és hiányában egyaránt ($P < 0,05$) (21/A ábra). Amennyiben a TNF- α által aktivált vad típusú CFBE sejteket kezeltük a FSK/IBMX-szel vagy a CFTR modulátorokkal, hasonlóan csökkent HE4 szinteket találtunk ($P < 0,01$) a kontroll mintákhoz (TNF- α és DMSO) képest (21/B ábra). Így az eredmények bizonyítékul szolgálnak arra, hogy a korrigált CFTR funkciónak egyfajta protektív szerepe van a HE4 expresszió TNF- α indukálta fokozódásával szemben a CFBE sejtekben.



21. ábra: A HE4 szint meghatározás TNF- α aktivált F508del-CFTR-t vagy wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben CFTR moduláció mellett. A TNF- α aktivált F508del-CFTR CFBE 41o⁻ sejteket LUM/IVA, TEZ/IVA, FSK/IBMX vagy ezek kombinációjával kezeltük 24 óráig. A TNF- α nem emelte a HE4 expressziót a korrigált CFTR működés mellett (A). A CFTR működést javító CFTR modulátorok csökkentették a HE4-t a TNF- α -stimulált vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben is, de kisebb mértékben, mint az aktivált F508del-CFTR CFBE sejtekben (B). Az eredmények átlag $\pm$ SEM formában vannak kifejezve, n = 5–6 minta/kísérlet. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 és ****P < 0,0001 szemben a kontroll mintákkal (TNF- α and DMSO); ##P < 0,01 és ###P < 0,001 szemben a kontroll mintákhoz (PBS).

Tekintettel arra, hogy az abnormális CFTR funkció jelenlétében konzekvensen magasabb HE4 expressziót találtunk a F508del-CFTR CFBE sejtekben szemben a normál sejtekkel, kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CF-re jellemző fokozott HE4 expresszió a károsodott CFTR funkció által fenntartott és triggerelt NF- κ B útvonal direkt hatásának tulajdonítható-e (22. ábra). A kérdés tisztázása érdekében a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejteket specifikus NF- κ B útvonal inhibitorral (BAY 11-7082) kezeltük CFTR modulátorok és TNF- α jelenlétében vagy hiányában, majd mértük a felülúszó HE4 és IL-6 koncentrációját. Eredményeink szerint a BAY 11-7082 által kifejtett gátló hatás önmagában szignifikánsan csökkentette a kiindulási (gyulladásos stimulus nélküli) HE4 (P < 0,05) és IL-6 (P < 0,01) koncentrációkat (P < 0,05) 24 óra után, míg a BAY 11-7082 gátlószer és a LUM/IVA vagy TEZ/IVA együttes adása mindkét fehérje szintjének sokkal nagyobb mértékű

csökkenésével járt együtt ($P < 0,001$; $P < 0,0001$). Az NF- κ B útvonal specifikus gátlása a TNF- α által indukált HE4 expresszió fokozódást is nagy mértékben redukálta ($P < 0,05$). A gyulladásos induktor TNF- α alkalmazása mellett a HE4 és IL-6 szintek további csökkenését tapasztaltuk az NF- κ B útvonal gátló és a CFTR modulátorok együttes hozzáadását követően a TNF- α -t és DMSO-t tartalmazó kontroll mintákhoz képest ($P < 0,001$) (22/A és B. ábra).



22. ábra: HE4 and IL-6 koncentráció mérés nem aktivált és TNF- α stimulált F508del-CFTR CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában NF- κ B útvonal inhibitor és CFTR modulátorok jelenlétében. BAY 11-7082-t (5 μ M) használtuk az NF- κ B-mediálta gyulladásos szignálútvonal blokkolására, hogy megvizsgáljuk a kiindulási és a TNF- α indukálta HE4 expressziót F508del-CFTR pozitív CFBE 41o⁻ sejt kultúrákban 24 órás LUM/IVA vagy TEZ/IVA vagy DMSO (kontroll) kezelés után. A TNF- α -triggerelt HE4 (A) és IL-6 (B) expresszió fokozódást a BAY 11-7082 kezelés csökkentette, és még

kifejezettebb csökkenés volt detektálható a HE4 és IL-6 szintekben az NF- κ B inhibitor és a CFTR modulátorok együttes használatakor szemben a TNF- α -val és DMSO-val kezelt kontroll sejtekkel. A wt-CFTR CFBE 41o⁻ sejtekben a CFTR_{inh172} (20 μ M) inhibitor nem tudta emelni a HE4 szintet az NF- κ B inhibitor használatával együtt, ami a CFTR működéssel összefüggő NF- κ B szignálút vonal szerepét bizonyítja (C). Az IL-6 koncentrációban talált változások hasonló trendet mutattak, mely a CFTR funkció és a pro-inflammatorikus körülmények szoros kapcsolatát erősíti CF-ben (D). Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak ábrázolva, n = 5–6 minta/kondíció. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 és ****P < 0,0001 vs. kontroll minták DMSO-val; #P < 0,05 és ###P < 0,001 vs. kontroll minták TNF- α -val és DMSO-val kezelve.

Amikor a vad típusú CFBE sejtekben CFTR_{inh172} hozzáadásával gátoltuk a CFTR-t az NF- κ B-t gátló BAY 11-7082 jelenlétében vagy hiányában, azt láttuk, hogy a CFTR gátlása nem eredményezett magasabb HE4 koncentrációkat az NF- κ B gátlószer jelenlétében (P < 0,05) (22/C ábra). Az IL-6 szintek hasonló kísérleti körülmények között megfigyelt változásai a HE4 koncentrációk alakulásához hasonló mintázatot követtek, ami a CFTR diszfunkció és a CF-re jellemző általánosan fokozott pro-inflammatorikus állapot közötti szoros összefüggésre vetít fényt (22/D ábra). Összefoglalásként megállapítható, hogy a CFBE sejtkultúrák felülűszó mintáiban mért HE4 koncentrációk változása nemcsak az NF- κ B út vonal közvetítette gyulladásos jelátvitel szabályozásának a következménye, de a CFTR funkció közvetlen befolyásoló hatásának is köszönhető.

6. Megbeszélés

A CF klasszikus formája akár több szervet is érintő örökletes megbetegedés, amely jelentősen lerövidíti a betegek várható élettartamát. Az életkilátásokat leginkább a CF-es légúti manifesztációk súlyossága határozza meg, ezért a tüdőbetegség mielőbbi észlelése, valamint lefolyásának és súlyosságának hatékony követése alapvető szempont a betegek gondozásában. A CF diagnózisának alapja a családi anamnézis, az újszülöttkori szűrés pozitív eredménye vagy a klinikus által felvetett gyanú, valamint az emelkedett verejtékklorid teszteredmény és két *transz* helyzetben lévő patogén CFTR mutáció azonosítása [19]. Ugyanakkor az újszülöttkori szűrőprogram révén – amit hazánkban ez évben vezettek be - olyan esetekkel is számolni kell, amikor a CF diagnózisa nem egyértelmű, mert intermedier verejtékklorid érték, vagy heterozigóta CFTR genotípus, esetleg ritka variáns kerül detektálásra, ami még ismeretlen klinikai relevanciával jár együtt. Ezekben az esetekben a diagnózist kiegészítő CFTR funkcionális vizsgálatok (NPD, ICM) ugyan segíthetnek, de ezek a módszerek bonyolult kivitelezhetőségük miatt még nem terjedtek el széles körben a mindennapi gyakorlatban [19]. Mindezek miatt a CF-es és nem CF-es betegpopulációt megbízható módon kell megkülönböztetni egymástól, amiben a könnyen lemérhető laboratóriumi biomarkerek nagy segítséget nyújthatnak. A többnyire szűréssel diagnosztizált tünetmentes, vagy csak enyhe tüneteket mutató CF-es gyermekek esetén a tüdőbetegség monitorizálására a klinikai gyakorlatban használt standard vizsgálati lehetőségek, így a spirometria, mellkasröntgen, stb. korlátozott értékűek vagy korlátozott az elérhetőségük (pl. a tüdő funkcionális MR vizsgálata és a „multiple breath washout”) [25].

A CF-es tüdőbetegség pathomechanizmusának alapja a neutrophil granulocyták által mediált, és általában valamilyen bakteriális infekció által provokált légúti gyulladás [13], mely alapján kézenfekvőnek tűnik a gyulladásos biomarkerek meghatározása különböző testváladékokból a betegség aktivitásának követése céljából. A BAL mintából meghatározott gyulladásos biomarkerek között vannak erős prognosztikai vagy prediktív értékkel bíró mediátorok, pl. neutrophil elasztáz [69], azonban a mintavétel invazivitása miatt a klinikumban ez a lehetőség csak korlátozottan áll rendelkezésre. A köpet vizsgálatának legfőbb limitációja az, hogy kisgyermekekben együttműködés hiányában nem nyerhető alsó légúti köpetminta. Ráadásul a véralapú vizsgálatokhoz képest kevésbé reprodukálható eredmények várhatók, hiszen a köpet különböző mértékben érintett tüdőrégiókból származhat. A CF-es betegek köpetében -részben- ezért tapasztalható a citokinek szintjének nagy intra- és interindividuais variabilitása [42]. Ezzel szemben számos vérmintából meghatározott potenciális biomarker

segítheti CF-ben a betegség követését, de ezek közül csak kevés került bevezetésre a mindennapi gyakorlatba. A szérumban IL-1 β , MPO, CRP [91], a plazmában IL-8 [93] ugyan előre jelzi az akut pulmonális exacerbációt, de csak rövid távon. A leggyakrabban használt CRP ugyanakkor nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség súlyossági indexével [104].

A HE4 rutinszerű mérése elsőként epitheliális petefészekrákban került bevezetésre tumor markerként [114, 127]. Azóta számos közlemény bizonyította, hogy a CA 125-höz képest nagyobb diagnosztikus értékkel bír a tumorok ezen formájában, ráadásul egyéb tumorokban is emelkedik a szintje [128]. Emelkedett HE4 szintek viszont nemcsak malignitásokban, hanem egyéb nem daganatos betegségekben is kimutathatók, így például krónikus veseelégtelenségben [129], vagy tüdőtuberculosisban is, bár utóbbiban csak enyhe mértékben [130]. A CF és a HE4 kapcsolatára egy olyan korábbi tanulmány utalt, melyben a HE4 immunhisztokémiai festésével emelkedett HE4 expressziót találtak CF-es betegekből származó tüdőbiopsziás mintákban [111]. Azt viszont korábban nem vizsgálták, hogy a légúti epithelsejtekben fokozott HE4 expresszió vezet-e emelkedett szérumban HE4 szinthez CF-es betegeknél. Ha igen, akkor vajon az abnormális HE4 alkalmas biomarker-e a CF-es klinikai állapot felmérésében, továbbá a gyógyszeres terápia hatékonyságának monitorozásában. Ezen kívül a HE4 kóros termelődésének mechanizmusa a CF-es bronchoepitheliális sejtekben korábban nem volt ismert. Mindezek alapján célul tűztük ki, hogy részleteiben megvizsgáljuk a HE4 fehérje szerepét a fenti kérdésekben, hogy így módon akár egy potenciális szérumban biomarkert azonosítsunk ebben a kórképben. Napjainkban a CF-es tüdőbetegség laboratóriumi paraméterekkel történő rendszeres vizsgálata nem kellően megoldott, különösen a rendkívül drága CFTR-specifikus kezelés követése területén, ezért nagy népegészségügyi jelentősége van új módszerek kidolgozásának, mely segítséget jelenthet a klinikusok számára.

Vizsgálataink során azt állapítottuk meg, hogy mind a gyermek, mind a felnőtt CF-es betegek szérumban HE4 koncentrációja szignifikánsan magasabb HE4 koncentráció mérhető az egészséges személyek, illetve a nem CF-es tüdőbetegségek mintáihoz képest. Esetenként a nem CF-es tüdőbeteg kohorszban is relatíve magas HE4 értéket mértünk, különösen bronchiectasia esetén, de a HE4 medián értéke és a legtöbb individuális eredmény sokkal alacsonyabb volt a CF-es populáció értékeihez viszonyítva (6/A ábra). A nem CF-es betegek körében nem volt különbség a HE4 koncentrációban az egyes tüdőbetegség típusok között. Tekintettel arra, hogy a nem CF-es gyermekek csoportjába valamelyest fiatalabb betegek kerültek beválogatásra szemben a CF-es gyermek csoporttal, ezért külön elvégeztünk egy statisztikai analízist a CF-es gyermekek és korban illesztett nem CF-es gyermekek alcsoportjával (7,5 [5,0-14,8] év; n=49). Szignifikánsan

alacsonyabb HE4 szinteket kaptunk így is a kontroll csoportban (56,7 [46,4-71,6] pmol/L; $P < 0,0001$) a CF-es gyermekekhez képest. Továbbá, 12 CF-es gyermek egyik egészséges, CFTR genotípusra heterozigóta szülőjétől nyert szérumban a normál kontroll csoporthoz hasonló HE4 eredményeket detektáltunk. A szérumban a CF-es gyermekek betegségektől származó köpetmintákban is magasabb HE4 koncentrációkat mértünk a nem CF-es tüdőbetegek és a kontrollok mintáihoz hasonlítva (6. táblázat). Ezek az adatok szintén megerősítik, hogy a fokozott HE4 termelés CF-ben a tüdőből származhat. A felnőtt CF-es vizsgálati populációban hasonlóan magas HE4 koncentrációkat kaptunk, mint a CF-es gyermekek betegségeiben. Bár az életkornak általában hatása van a HE4 értékek alakulására [128, 131], a bevont CF-es beteg esetében az életkornak nem volt befolyásoló hatása a HE4 szintekre (6/B ábra), szemben a verejtékklorid koncentrációval, mely egy korábbi tanulmány alapján az életkorról növekvő tendenciát mutatott [132]. A szérumban HE4 prognosztikai szerepére utal CF-ben, hogy szorosan korrelál a tüdőbetegség súlyosságával, a bakteriális kolonizáció jelenlétével és a pancreas elégtelenséggel (7 és 8. ábra).

Az általunk vizsgált CF-es betegekben a CRP többnyire mérsékelten volt emelkedett a referencia tartományhoz képest, ők is döntően súlyos tüneteket mutattak. A felnőtt betegek mindegyike bakteriálisan kolonizált volt, legtöbbjük *P. aeruginosa* vagy *Burkholderia cepacia complex* pozitív, ezért náluk eleve magasabb CRP szintek voltak várhatóak még a tüdőbetegség egyensúlyi állapotában is [119]. Összehasonlítottuk a HE4 és a CRP diagnosztikai karakterisztikáját. Bár a HE4 nagyobb variabilitást mutatott, pozitív szignifikáns összefüggést találtunk a HE4 és a CRP szintek között mind a gyermek, mind a felnőtt vizsgálati csoportban egyaránt (7/B ábra). Ugyanakkor a HE4-nek nagyobb diagnosztikai hatékonysága volt CF-ben az ROC-AUC értéke alapján a CRP-vel szemben. Érdekes módon, a nem CF-es tüdőbetegek csoportjában ez a HE4/CRP összefüggés nem volt kimutatható. Következésképpen a szérumban HE4-re mint lehetséges CF biomarkerre tekinthetünk, mely hatékonyan jelzi a légúti gyulladás fokozódását és ezáltal a légzésfunkció romlását. A HE4 diagnosztikai erejét ROC-AUC analízissel tovább vizsgáltuk. A HE4-nek a CF-es és normál kontrollok megkülönböztetésére igen magas, 0,993-as AUC értéket kaptunk (95% CI, 0,986-0,999) 49,3 pmol/L-es 'cut-off' érték mellett. A szenzitivitás, specificitás, a PPV és NPV értékei is jelentősek voltak. Amikor az AUC-t a CF-es és nem CF-es tüdőbeteg csoportok elkülönítésére számoltuk ki, kissé alacsonyabb értéket kaptunk (0,778 [95% CI, 0,716-0,841]). A „gold standard” verejtékklorid teszt a HE4-hez képest a PPV-ben erősebb (77,1%), de a NPV-ben gyengébb (54,8%) volt 39 mmol/L-es 'cut-off' érték mellett [133]. A szérumban HE4 a CF-es betegekben jól korrelált a

verejtékklorid eredményekkel, ráadásul a szérumban HE4 akkor is kórosan emelkedett volt, amikor a verejték teszt intermedier tartományba eső (30-60 mmol/L) eredményt adott.

A CF-ben megnőtt szérumban HE4 koncentráció eredetét és mechanizmusát korábban nem vizsgálták. Néhány CF-es betegből bronhoskoppal nyert hörgőnyálkahártya biopsziás mintában kvantáltuk a HE4-specifikus mRNS szintet, mely szignifikánsan emelkedett volt a nem CF-es bronchitises kontroll mintákhoz képest (10. ábra). Ez az eredmény azt sugallta nekünk, hogy az emelkedett szérumban HE4 szintek a CF-es légutakban zajló fokozott termelésének köszönhető. Eredményeinket alátámasztotta Clarke és munkatársainak egyik korábbi munkája, amiben a *WFDC2* gént a fokozott expressziót mutató gének között igazolták a CF-es orrnyálkahártya mintákban [134]. Számos közlemény vizsgálta az előzőekben a gének gyulladási indukálta expresszió változását CF-ben [135-137]. A fokozott expressziót mutató gének enyhe CF-ben inkább a lipid metabolizmus, a G-proteinhez kapcsolt receptor expresszió, valamint az iontranszportok regulációjában játszottak szerepet, míg súlyos CF-ben az oxidoreduktáz folyamatokban és az ubiquitin ciklusban vettek részt [136]. Érdekes módon maga a p.Phe508del-CFTR mutáció csak minimális hatást gyakorolt a génexpressziós profilra a CF-es légúti epitheliális sejt kultúrákban a nem CF-es sejtekhez képest [137]. A HE4 transzkripció szabályozása szintén nem kellően ismert. A HE4-nek mint tumormarkernek a kóros termelődése összefügghet azzal, hogy a bronchoepithelsejtek CF-ben kevésbé differenciált állapotban vannak a nem CF-es körülményekhez képest [138]. Génexpressziós profilok metaanalízise alapján a CF-es nazális epithelsejtek profilja jelentős átfedést mutatott a nem differenciált epithélium fenotípus géneivel [139]. Pulmonális epitheliális sejtekben ugyanakkor korábban kimutatták, hogy a *WFDC*-fehérjecsaldába tartozó Elafin termelésének citokin mediálta indukcióját egy NF- κ B kötőhely szabályozza a gén proximális promóter régióján belül [140]. Hasonlóan, a HE4 promóter régiójától -322 pozícióban is leírtak egy NF- κ B kötőhelyet [141]. Így feltételezhető, hogy a HE4 transzkripciója az NF- κ B útvonal befolyása alatt áll, de a kérdés további tisztázása céljából további molekuláris biológiai, pl. ChIP-seq alapú expressziós vizsgálatokra lesz szükség.

Sok kérdés vár még annak megválaszolására is, hogy a CFTR funkció korrekciója a károsodott veleszületett immunitás és/vagy az epithelsejt aktiváció modulálásával befolyásolja-e érdemben a légúti gyulladásos választ CF-ben [48]. A legutóbbi *in vitro* vizsgálatok csökkent IL-1 β és IL-18 szintet igazoltak a LPS által indukált monocytákban LUM/IVA, illetve TEZ/IVA kezelést követően [88], továbbá az IVA, vagy a LUM/IVA terápia jelentősen csökkentette a bakteriális fertőzés (*P. aeruginosa*) indukálta pro-inflammatorikus citokinek

termelődését a macrophag funkció javításával [142], végül alacsonyabb CXCL8 expressziót és p38 MAPK foszforilációt detektáltak a CFBE sejtekben Orkambi® kezelést követően [143]. A CFTR korrektorok és potenciátorok gyulladáscsökkentő képességéről - amit a CFTR funkció javításán és a csökkent verejtékklorid szinten keresztül képesek kifejezni [144, 48] - csak klinikai vizsgálatokból származó közvetett bizonyítékok állnak jelenleg rendelkezésre. Ráadásul ezek a gyógyszerek sem mindig voltak klinikailag hatékonyak a krónikus bronchiális gyulladás csökkentésében a köpetben vizsgált biomarkerek alapján [27], és gyulladáscsökkentő hatásuk pedig fokozatosan csökkenhet a kezelés megkezdése után 36 órával [88]. Ezért lenne fontos eme fontos hatásnak *in vitro* vizsgálatokkal történő alátámasztása [145].

A kísérletes munkánk célja ezért annak vizsgálata is volt, hogy a CF-ben potenciális biomarkerként alkalmazható HE4 fokozott expressziója befolyásolható-e a CFTR funkció javításával. Ennek érdekében a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejt kultúrákban analizáltuk a kiindulási és a TNF- α által indukált HE4 szinteket a CFTR funkció és az NF- κ B útvonal aktiválódásának farmakológiai befolyásolása mellett, és az eredményeket a vad típusú CFTR-t expresszáló kontroll sejteken végzett vizsgálatok eredményeihez hasonlítottuk. Kiemelendő, hogy F508del-CFTR CFBE sejtek felülúszójában kb. 1,5-szer nagyobb HE4 koncentrációt találtunk a normál sejtekhez képest (14/A ábra). A LUM/IVA, illetve a TEZ/IVA kezelés egyaránt csökkentette a HE4 szinteket a F508del-CFTR pozitív sejtekben a kontroll mintákhoz képest. Az általunk alkalmazott CFTR modulátorok hatásosságát egyrészt a CFTR funkció korrekciójának vonatkozásában korábban *in vitro* vizsgálatok már igazolták CF-es epithelsejt kultúrákban [123, 124]. Másrészt saját vizsgálatunkban „teljes sejt” patch-clamp technikával mi is igazoltuk a CFTR funkció helyreállítását a CFTR modulátorok alkalmazását követően egy korábbi publikációhoz hasonlóan [125]. Bár esetünkben a CFTR aktivitás csak részleges korrekciója következett be, de mértéke jelentősnek volt mondható mindkét alkalmazott gyógyszerkombináció mellett tekintettel arra, hogy Boinot és munkatársai szerint az ionáram erősség 4pA/pF feletti értéke esetén már korrigált CFTR aktivitásról beszélhetünk [125]. A két alkalmazott CFTR modulátor kombináció közül a TEZ/IVA nagyobb mértékben korrigálta a klorid áramot és csökkentette a HE4 expressziót a LUM/IVA-hoz képest. Ezt követően a CFTR-t a vad típusú sejtekben CFTR_{inh172} alkalmazásával gátoltuk, melynek eredményeképpen emelkedett HE4 szinteket mértünk. Ezzel ellentétben, a CFTR aktivátor FSK/IBMX kezelés csökkentette a HE4 koncentrációkat ugyanezen sejt típusban. Emellett, a FSK/IBMX kezelés a F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben is szignifikánsan csökkent HE4 expressziót váltott ki, bár a csökkenés mértéke alatta maradt a vad típusú sejtekben tapasztalt

csökkenéshez képest. Végezetül abban az esetben, ha a FSK/IBMX-t a CFTR modulátorokkal együtt alkalmaztuk a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben, a HE4 koncentráció tovább csökkent, különösen a TEZ/IVA esetén. A HE4 szintek változása megfelelt az adott körülmények között bekövetkező kloridáram változásnak. Eredményeink alapján a CF-es légúti epithelsejtekben a károsodott CFTR funkció növeli a HE4 expressziót, amely hatásosan csökkenthető az ioncsatorna funkciót helyreállító CFTR modulátorokkal. Az eredményeink párhuzamba állíthatók azzal a korábbi tanulmánnyal, amelyben a CFTR_{inh172} adását követően emelkedett NF-κB aktivitást és magasabb IL-8 szintet találtak, míg a FSK/IBMX hatására csökkenő NF-κB aktivitást mutattak ki az epitheliális sejtkultúrában [16].

A HE4 expresszió és a gyulladásos sejtaktiváció lehetséges kapcsolatának feltárása céljából a következőkben azt vizsgáltuk, hogy az eleve emelkedett HE4 expresszió szintje tovább fokozódik-e a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁺ sejttenyészetben gyulladásos stimulus hatására. Ennek érdekében TNF-α citokinnel kezeltük a sejteket rövid- és hosszútávon (1 órától 1 hétig terjedő időtartamig). A HE4 mRNS szint már 1 órás sejtaktivációt követően emelkedett, és 4 óráig magas maradt, de 24 óra múlva visszatért a kiindulási szintre. Az ennél hosszabb TNF-α stimulációt követően a HE4 expresszió még nagyobb mértékű fokozódása következett be. A TNF-α a HE4 fokozott expressziójával párhuzamosan kiváltotta a várt pro-inflammatórikus hatást a CFBE sejtekben, amit az IL6, IL8 és IL1B mRNS szinteken keresztül követtünk RT-qPCR módszerrel (17. ábra). Az IL6 és IL8 esetén a mRNS szintek időbeli változásának mintázata hasonló volt a HE4 expresszió változásának időbeli alakulásához, míg a magas IL1B expresszió kevésbé változott a különböző időpontokban. Adataink arra utaltak, hogy a CF-es bronchoepithelsejtekben a gyulladásos citokinek emelkedett szintjével párhuzamosan a HE4 bazális expressziója is megnövekedett, tehát tovább fokozódhat gyulladásos körülmények között. Ennek eredményeképpen amikor a HE4 és a gyulladásos citokinek termelődését fehérjeszinten is vizsgáltuk, a HE4 protein szintet 24 órás sejtaktivációt követően találtuk szignifikánsan emelkedettnek, ami fokozatosan tovább emelkedett 1 héten keresztül. Ezzel szemben az IL-6 fehérje koncentrációja az összes vizsgált időpontban szignifikánsan emelkedett volt (18. ábra). Az eredményeink összhangban vannak mások vizsgálatával, melyben hasonló HE4 expresszió időbeli változást mutattak ki az NF-κB jelátvitellel asszociált TLR2-mediálta útvonalon keresztül tumorsejtekben [146]. Az ugyancsak a WFDC fehérjecsaládba tartozó SLPI és az Elafin termelődése hasonlóan indukálható volt TNF-α-val humán alveoláris epithelsejtekben [147].

Annak érdekében, hogy az NF- κ B jelátvitel fokozott működése és az emelkedett HE4 expresszió közötti összefüggést vizsgáljuk a CFBE sejtekben, az NF- κ B aktivitást jelző p65 nukleáris transzlokációját fluoreszcens mikroszkóppal vizualizáltuk a wt-CFTR-t és a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁺ sejtekben TNF- α kezeléssel vagy anélkül (19. ábra). A CF-re jellemző fokozott pro-inflammatorikus aktivitásnak megfelelően a F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben szignifikánsan magasabb bazális p65 nukleáris pozitivitást detektáltunk a vad típusú sejtekhez képest TNF- α stimulus nélkül is. Az eredmény összhangban van korábban publikált adatokkal, nevezetesen a vad típusú CFTR a TRADD fehérje degradációján keresztül szabályozta a TNF- α stimuláció által kiváltott jelátvitelt és így gátolta az NF- κ B jelátviteli kaszkád lefolyását, míg a F508del-CFTR-t expresszáló sejtekben ez a gátló hatás nem jutott érvényre [122]. Abban az esetben, ha a sejteket TNF- α -val aktiváltuk, a p65 transzlokációjának vonatkozásában még szembe tűnőbb volt a különbség a két CFBE sejt kultúra között. Eredményeink így megerősítik az alaphelyzetben is fokozott, illetve a gyulladás indukálta HE4 expresszió és az NF- κ B aktivitás szintjei közötti összefüggést *in vitro* körülmények között. Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy a LUM/IVA vagy a TEZ/IVA kezelés képes-e csökkenteni az alap és a TNF- α aktivált NF- κ B jelátvitelt, amely folyamat végsősoron felelős lenne a felülúszóban mért csökkent HE4 plazmaszintekért a CFTR-specifikus terápia alatt. Eredményeink azt mutatták, hogy a CFTR modulátorok nemcsak az aktiválatlan F508del-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben, de a TNF- α -val stimulált sejtekben is szignifikánsan csökkentették a p65 nukleáris pozitivitását. Ezen korrigált CFTR funkcióval bíró CFBE sejtek felülúszójában csökkent IL-6 szintet mértünk, ami arra utal, hogy a CFTR modulátoroknak a HE4 expresszióra gyakorolt gátló hatás mellett további gyulladáscsökkentő tulajdonságuk is van, mint amire más szerzők is a közelmúltban rávilágítottak [48, 148, 147]. Az eredmények arra utalnak, hogy a CF-es légúti epithelsejtek gyulladásos állapota direkt módon csökkenthető CFTR modulátorokkal. Megfigyeléseinket és következtetéseinket több más publikált adat is támogatja:

- A LUM/IVA vagy TEZ/IVA kezelésben részesült CF-es betegek perifériás vérmintájából izolált polimorphonukleáris sejtjeiben (PBMK) csökkent inflammoszóma (NLRP3) aktivációt írtak le a caspase-1 aktivitás csökkenésének következtében 3 hónapos kezelést követően [88].
- Az Orkambi® (LUM/IVA) kezelés helyreállította a CFTR-dependens kloridáramot [148], továbbá csökkentette az IL-18 és a TNF- α expressziót a PBMK-kben [88] és javította a sérült légúti epithélium gyógyulását [149].

- A Symdeko[®] (TEZ/IVA) terápia csökkentette a szérumban IL-1 β szintet CF-es betegekben [88].

Érdekes módon léteznek olyan irodalmi adatok is, amelyek ellentmondanak a LUM/IVA vagy TEZ/IVA kezelt F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtek felülúszójában talált csökkent IL-6 koncentrációkra vonatkozó eredményeinknek mind a bazális, mind a TNF- α stimulált értékek tekintetében. Stanton és munkatársai egy *P. aeruginosa* törzs (PAO1) alkalmazásával magasabb IL-6 és IL-8 expressziót találtak CFBE sejtekben, azonban sem a LUM, sem a LUM/IVA kombinált kezelés nem csökkentette a kiindulási (nem fertőzött sejtek) vagy a PAO1 által indukált citokin termelődést [150]. Ennek részben az a magyarázata, hogy eredményeik szerint a baktériummal fertőzött CFBE sejtekben a CFTR modulátorok nem tudták a kloridáramot helyreállítani. Ugyanakkor egy másik munkacsoport szerint a PAO1 kezelt F508del-CFTR pozitív CFBE sejtekben az Orkambi[®] kezelés egy, a *P. aeruginosa* fertőzést elimináló antimikrobiális peptid (6K-F17), illetve a *tobramycin* jelenlétében képes volt helyreállítani a CFTR funkciót és csökkenteni az IL-6, IL-8 és TNF- α szinteket [151]. Véleményünk szerint vizsgálataink eredményei alátámasztják a CFTR modulátorok intraepitheliális gyulladásos folyamatokat csökkentő tulajdonságát *in vitro*.

A CF-es CFBE sejtekben nemcsak a bazális HE4 szintek csökkentek a CFTR modulátor kezelés hatására, hanem a TNF- α által indukált HE4 expresszió is. Ezzel összhangban, a TNF- α stimulált vad típusú CFBE sejtek szintén csökkent HE4 szinteket mutattak a CFTR aktivátor (FSK/IBMX) hatására. Mivel a F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 41o⁻ sejtekben az NF- κ B útvonal megnövekedett alapaktivitását találtuk a wt-CFTR-t expresszáló sejtekhez képest, megvizsgáltuk, hogy egy specifikus NF- κ B útvonalat gátló specifikus szer alkalmazásával gátolható-e a HE4 expressziója. Ennek céljából a széleskörűen használt BAY 11-7082 inhibitorot adtuk a CFBE sejtekhez különböző kezelési körülmények között: TNF- α előkezeléssel vagy anélkül, illetve CFTR modulátorok jelenlétében vagy hiányában. Ezt követően mértük a felülúszó HE4 és IL-6 fehérje koncentrációját. Az NF- κ B inhibitor szignifikánsan csökkentette nem csak az alap, de az indukált HE4 és IL-6 koncentrációt is. Az eredmény arra utal, hogy az NF- κ B jelátviteli útvonal szerepet játszik a HE4 expresszió szabályozásában. Ezzel a megállapítással összhangban vannak a CF-es betegek vizsgálatából származó adataink is: a súlyosabb légúti gyulladás (klinikai értelemben légúti exacerbáció) az emelkedett CRP szinttel együtt magasabb szérumban HE4 szintekkel járt. Ugyanakkor abban az esetben, ha az NF- κ B útvonal gátlása mellett CFTR modulátorokkal is kezeltük a CFBE

sejteket, a HE4 és IL-6 szintek további szignifikáns csökkenése következett be, ami arra enged következtetni, hogy a HE4 a CFTR direkt hatása alatt áll. Bár Bitam és munkatársai 6 órás TNF- α kezelés hatására fokozott CFTR érést és következményes növekvő kloridáramot detektáltak F508del-CFTR-t transzfektált HeLa sejtekben és primer bronchoepitheliás sejt kultúrákban, a későbbi időpontban (24 óra után) a CFTR funkció már alig javult a kontroll mintákhoz képest [152]. Így nem gondoljuk, hogy a CFTR funkció TNF- α által indukált esetleges javulása számottevően befolyásolta volna a HE4 szinteket a saját kísérletes körülményeink között. A CF-es bronchoepitheliális sejtekben tehát a fokozott HE4 expressziót kettős hatás okozza: a CFTR diszfunkció és az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivitása következtében kialakuló pro-inflammációs állapot.

A CFTR funkció helyreállítása konzekvensen alacsonyabb HE4 szinteket eredményezett *in vitro* kísérleteink során. Ezekkel az eredményekkel összhangban különböző CFTR modulátor kezelések alatt álló CF-es betegcsoportok plazma mintáinak elemzése alapján hasonló következtetésre jutottunk. Munkacsoportunk elsőként vizsgálta a plazma HE4 lehetséges biomarker szerepét a CFTR modulátor kezelések hatásosságának lemerésében. Elsőként *ivacaftorral* kezelt három független CF-es betegcsoport plazmamintáinak HE4 koncentrációját határoztuk meg és vetettük össze a tipikus klinikai követési paraméterekkel, így a FEV₁ %-kal, a verejtékklorid szintekkel és a BMI-vel [27, 120, 121]. Az *ivacaftor* olyan legalább 2 éves korú CF-es betegek kaphatják, akik a III. mutáció osztályba sorolt variánsok egyikét (leggyakrabban p.Gly551Asp CFTR) hordozzák. A gyógyszer a fenti mutációtípus esetén fokozza az apikális membránban lévő CFTR ioncsatorna nyitási frekvenciáját, így az ezen keresztüli klorid transzportot. A klinikai tanulmányok igazolták az *ivacaftor* hosszútávú klinikai hatásosságát, mivel javul a betegek FEV₁ %-os értéke, a tápláltsági állapotuk, csökken a *P. aeruginosa* kolonizáció események száma és a pulmonális exacerbációk kialakulásának kockázata [27, 120, 121, 153]. Vizsgálati csoportjaink összes betegének emelkedett volt az *ivacaftor* kezelés előtti plazma HE4 szintje az egészséges populációhoz képest. Az *ivacaftor* kezelés eredményeképp - a javuló légzésfunkció és csökkenő verejtékklorid értékek mellett - a kiindulási koncentrációktól függetlenül a HE4 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak már az első követési időpontban, és fokozatosan tovább csökkentek a vizsgálati periódus végéig. Ezek az adatok jól összefüggnek azzal a korábbi megfigyelésünkkel, hogy a HE4 szintek korreláltak a tüdőbetegség súlyosságával. Ráadásul a HE4 abszolút és delta értékei fordítottan voltak arányosak a FEV₁ és delta FEV₁ értékekkel mindhárom betegcsoportban. A CRP értékeknek jelentős része mérhetetlenül alacsony volt, míg abnormálisnak csak 15-58%-a

bizonyult a különböző kohorszokban. Ezek az adatok is arra utalnak, hogy CF-es betegek jelentős részében a CRP nem igen használható a CFTR modulátor terápiák hatásának monitorizálására. A CRP ráadásul csak kisebb mértékű összefüggést mutatott a FEV₁ %-kal a HE4-hez képest. Ugyanakkor más szerzők szerint a CRP szintek változásai hozzájárulhatnak a CF súlyosságának követéséhez, és akár a pulmonális exacerbáció predikciójára is alkalmasak lehetnek [92]. Bár szoros összefüggés mutatkozott a HE4 és a CRP értékek között a vizsgálati populációinkban (8. ábra), összeségében a HE4-et alkalmasabb biomarkernek találtuk a CRP-hez képest az *ivacaftor* kezelés monitorizálásában. Az *in vitro* sejtes kísérletek mellé megmértük külön a *lumacaftor/ivacaftor* terápia HE4 szintekre gyakorolt hatását. Ennek érdekében 10 Orkambi® kezelés alatt álló, p.Phe508del-CFTR mutációra homozigóta CF-es beteg plazmamintáiban mértük le a HE4 koncentrációt. Eredményeink azt mutatták, hogy az Orkambi® terápia már egy hónappal a kezelés elindítása után szignifikánsan csökkentette a plazma HE4 koncentrációit, és a csökkenés mértéke független volt a kiindulási HE4 szinttől.

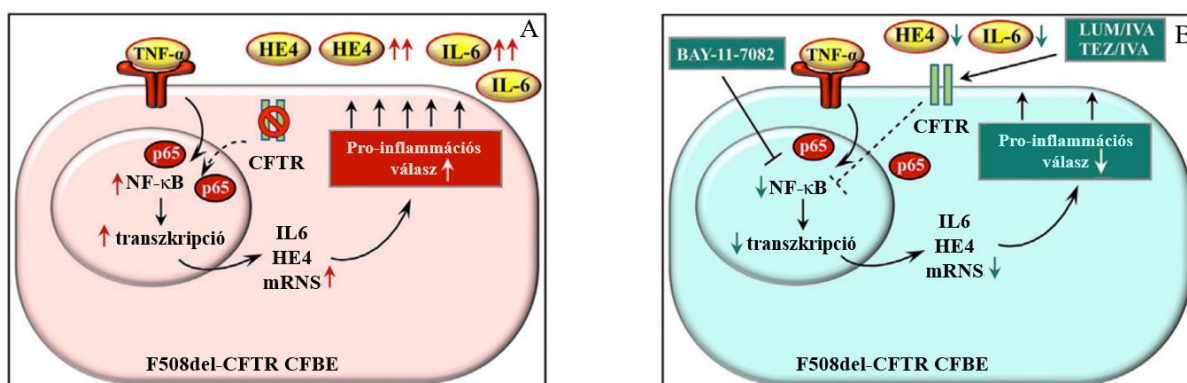
Vizsgálataink során a HE4 abszolút és delta értékeinek megkülönböztető ereje mutatkozott, amikor az átlagos FEV₁ %-os változást vettük alapul a ROC-görbe analízis során. Abban az esetben, ha a kiindulási (abszolút) HE4 szint AUC értékét számoltuk ki 7%-os FEV₁ % változást alkalmazva „elválasztóként”, jelentős (0,722) AUC értékeket találtunk az összes csoportban: a HE4 62,7 pmol/L-es „cut-off” érték mellett képes volt előre jelezni a 7%-os FEV₁ % javulást *ivacaftor* kezelés hatására 74%-os szenzitivitással és 79%-os specificitással. Ennél is nagyobb AUC értéket (0,806) állapítottunk meg a delta HE4-re vonatkozóan 1-2 hónapos gyógyszeres kezelést követően 81%-os szenzitivitással, 89%-os specificitással -15,8 pmol/L-es cut-off érték mellett, míg a delta HE4 már kevésbé volt prediktív 3-6 hónapos kezelést követően (AUC: 0,648).

Vizsgálataink néhány limitáló tényezőjét is meg kell említeni. Az IVA, illetve LUM/IVA kezelés alatt álló CF-es betegcsoportok plazmamintáiban a HE4-et retrospektív módon analizáltuk CFTR modulátor kezelést nem kapó (placebo) klinikai kontroll csoport nélkül. Az eredményeket torzíthatja a minták különböző forrásokból való származása. TEZ/IVA kezelést kapott CF-es betegeket nem tudtunk beválogatni a plazma HE4 szint mérése céljából, mivel ilyen betegektől származó minták nem álltak akkor rendelkezésre, sem a CFFT-nél, sem hazai vizsgálatokban. Mindezek miatt további kutatásra van szükség a HE4 biomarker végpontként való használatának validálása céljából különböző CFTR modulátor kezeléseket alatt. A CFBE sejtekkel végzett kísérleteink során nem vizsgáltuk, hogy az emelkedett HE4 szintet maga a CFTR funkció hiánya vagy az abnormális, „misfolded” CFTR fehérje jelenléte

eredményezte-e. Végezetül a CF-re jellemző gyulladás és a HE4 expresszió közötti összefüggés mechanizmusát nem minden részletében tudtuk vizsgálni, így újabb *in vitro* vizsgálatok szükségesek a patomechanizmus további feltárása érdekében.

Jelenleg az sem tisztázott, hogy mi lehet a HE4 funkcionális szerepe a CF-es tüdőbetegség lezajlásában. A fehérje ismert tulajdonságai és a gyulladásos citokinekkal való kapcsolata alapján feltételezzük, hogy a bakteriális stimulusok és a gyulladásos folyamatok által kiváltott immunológiai válasz következményeként fokozódik expressziója CF-ben [112]. Antiproteáz aktivitása révén gátolta a MMP-9 aktivitását *in vitro*, mely enzim a szöveti „remodelling”-ben vesz részt [117]. Ezzel párhuzamosan a fibroblast eredetű HE4 vesefibrózist tudott indukálni egy egérmodellben szintén a MMP-9 gátlása révén, míg a HE4-elleni blokkoló antitest segítségével megelőzhető volt a fibrózis a kollagén degradációs termékek felszaporodása mellett [154]. Mi több, nem CF-es primer tüdőfibrózisban is emelkedett szérumban HE4 koncentrációkat találtak nemrégiben [155]. Így lehetséges, hogy a magas HE4 szint hozzájárulhat a CF-es tüdő fibrotikus átépüléséhez is. További vizsgálatok szükségesek ezen feltételezések bizonyításához.

A disszertáció alapját képező három vizsgálatsorozat eredményeinek összesítéséből azt gondoljuk, hogy a keringésben mérhető HE4 fehérje szintje jelentősen megemelkedik, mely összefügg a CFTR diszfunkcióval és az NF- κ B útvonal aktiválódásával (23. ábra). Mindezt alátámasztják azok a klinikai adataink, melyek szerint a CFTR-specifikus gyógyszerek csatorna működést korrigáló/moduláló hatása mellett a HE4 szintje jelentősen csökken, ami követi a légzésfunkció javulását.



23. ábra: Sematikus összefoglaló ábra a HE4 expresszió regulációjában résztvevő CFTR csatorna-mediálta és külső pro-inflammatorikus stimulus által kiváltott intracelluláris gyulladásos folyamatokról CF-es bronchoepitheliális sejtekben. Abnormális CFTR működés esetén, valamint gyulladásos környezetben a bazális HE4 szint megnő egyéb citokinekkal (pl. IL-6) együtt (A). Amennyiben a CFTR funkció korrigálódik kezelés (pl. LUM/IVA, TEZ/IVA) által és/vagy az NF- κ B útvonal gátolt (pl. BAY 11-7082 inhibitorral), akkor jelentősen csökken a HE4 és az IL-6 expressziója (B). Rövidítések: CFBE: cystic fibrosis bronchial epithelial cell, CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, TNF- α : tumor necrosis factor alpha, HE4: human epididymis protein 4, IL-6: interleukin-6, NF- κ B: nuclear factor-kappa B.

7. Összefoglalás

A CF a leggyakoribb monogénes örökletes anyagcsere betegség a kaukázusi populációban. A sokszervi érintettséggel járó betegségben a prognózist nagy mértékben a légzőrendszeri következmények határozzák meg. A tüdőbetegség patomechanizmusának középpontjában alapvetően a neutrophil granulocyták dominanciájával jellemezhető krónikus légúti gyulladás áll, melynek intenzitása és fenntartása a rekurrens légúti infekcióknak és a CFTR diszfunkció következményeként fellépő immunregulációs zavaroknak, valamint ezek egymást erősítő hatásának köszönhető.

A CF-es tüdőbetegség követésére jelenleg elérhető klinikai paraméterek korlátozott képességűek, különösen fiatalkori, illetve enyhe tüdőérintettség esetén. A légúti gyulladás már a betegség korai stádiumában kimutatható, így a kóros folyamatokban szerepet játszó mediátorok koncentrációjának mérése akár vérből, akár légúti mintából kézenfekvő lehetőségnek tűnik a tüdőbetegség monitorizálására, akár már kisgyermekkorban. Az emelkedett szérum HE4-et a rutin biomarkerekhez (pl. CRP) képest hatékonyabbnak találtuk a CF-es légúti gyulladás követésére. A plazma HE4 koncentrációja jól korrelált a CF-es tüdőbetegség súlyosságával, így alkalmasnak tűnt az *ivacaftor* kezelés monitorizálására. Kísérletes vizsgálataink rávilágítottak arra is, hogy CF-ben a fokozott HE4 expresszió a légúti epithelsejtekből származik. *In vitro* eredményeink szerint a F508del-CFTR pozitív CFBE sejttenyészetben a HE4 expressziójának fokozódása részben a fokozott NF- κ B útvonal aktiválódásának az eredménye, részben pedig a kóros CFTR funkció direkt hatásának is köszönhető.

Összességében megállapíthatjuk, hogy CF-ben a HE4 vérkoncentrációja jelentősen emelkedik nemcsak az egészséges személyek, hanem a nem CF-es tüdőbetegek mintáihoz képest is. A rutin klinikai körülmények között hozzáférhető HE4 fehérje olyan új biomarkernek tekinthető CF-ben, amely szoros összefüggést mutat a légúti epithelsejtek gyulladásos folyamataival, és alkalmas lehet a CFTR modulátor kezelések monitorizálására a klinikai vizsgálatokban és a mindennapi betegellátás során egyaránt.

8. Summary

CF is the most frequent monogenic metabolic disease in the Caucasian population. Prognosis is mainly determined by the respiratory consequences in case of the typical severe manifestation of the disease with multi-organ involvement. The essential processes of the respiratory pathomechanism include chronic airway inflammation because of recurrent airway infections and the immunoregulatory dysfunction due the deteriorated CFTR activity.

Actually, the available clinical procedures for the clinical routine care has notable limitations in the monitoring of CF lung disease, especially in young patients with mild airway disease. Significant airway inflammation can already be detected in the early stage of CF lung disease, thus the measurement of different mediators playing a role in the pathomechanism of airway inflammation seems to be suitable for monitoring lung disease even in the young ages in CF. In our experiments, we found the elevated plasma HE4 levels to be more reliable in monitoring CF lung disease compared to the widely used blood-based biomarkers (e.g. serum CRP). Plasma HE4 concentrations showed a significant correlation with the severity of CF lung disease and seemed to be suitable for monitoring of the CFTR modulator *ivacaftor* treatment. Our experiments further confirmed that the site of elevated HE4 expression was mainly the CF airway epithelium. We also concluded that increased HE4 expression was not only caused by the activated NF- κ B signaling pathway as a consequence of impaired CFTR, but the direct effect of CFTR dysfunction also contributed to abnormal HE4 expression.

In conclusion, marked elevation of blood levels of HE4 can be measured in CF patients compared to healthy individuals and even to patients with non-CF pulmonary disease. HE4, a widely available blood-based biomarker, shows a strong association between the inflammatory processes of the airways in CF, and can be suitable for monitoring of different CFTR specific drugs.

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

1. A HE4 szérum/plazma koncentrációja CF-ben jelentősen megemelkedik nemcsak egészséges személyekhez, hanem nem CF-es tüdőbetegekhez képest is.
2. Az abnormalis CFTR funkció a HE4 expressziót direkt módon képes modulálni CF-ben.
3. Külső gyulladásos stimulus, pl. $\text{TNF-}\alpha$ az $\text{NF-}\kappa\text{B}$ jelátviteli útvonal által közvetített pro-inflammatorikus citokinek termelésének fokozódásával együtt tovább indukálja a HE4 expressziót is a bronchoepitheliális sejtekben.
4. A plazma HE4 szint jól korrelál a légzésfunkció paraméterrel ($\text{FEV}_1\%$) és hatékonyan követi a CFTR-specifikus gyógyszeres kezelés hatékonyságát.

10. Irodalomjegyzék és publikációs lista

10.1. Irodalomjegyzék

1. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002; 19(6): 575-606.
2. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005; 352(19): 1992-2001.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989; 245(4922): 1066-1073.
4. ECFS Patient Registry Annual Report, 2019. (<https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports>)
5. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevínek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek M Jr, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011; 10 Suppl 2: S86-102.
6. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020; 109(5): 893-899.
7. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003; 67(Pt 5): 471-485.
8. Bombieri C, Seia M, Castellani C. Genotypes and phenotypes in cystic fibrosis and cystic fibrosis transmembrane regulator-related disorders. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015; 36(2): 180-193.
9. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M Jr, Madge S, Davies JC, Burgel PR, Tullis E, Castaños C, Castellani C, Byrnes CA, Cathcart F, Chotirmall SH, Cosgriff R, Eichler I, Fajac I, Goss CH, Drevínek P, Farrell PM, Gravelle AM, Havermans T, Mayer-Hamblett N,

- Kashirskaya N, Kerem E, Mathew JL, McKone EF, Naehrlich L, Nasr SZ, Oates GR, O'Neill C, Pypops U, Raraigh KS, Rowe SM, Southern KW, Sivam S, Stephenson AL, Zampoli M, Ratjen F. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(1): 65-124.
10. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007; 13(6): 231-240.
 11. Borowitz D. CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2015; 50 Suppl 40: S24-S30.
 12. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(8): 918-951.
 13. Yonker LM, Cigana C, Hurley BP, Bragonzi A. Host-pathogen interplay in the respiratory environment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015; 14(4): 431-439.
 14. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016; 4(8): 662-674.
 15. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 2015; 14(4): 419-430.
 16. Hunter MJ, Treharne KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. Expression of Wild-type CFTR Suppresses NF-kappaB-Driven Inflammatory Signalling. *PLoS One* 2010; 5: e11598.
 17. Muhlebach MS, Stewart PW, Leigh MW, Noah TL. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160(1): 186-191.
 18. Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jan;74(1):129-140.
 19. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sernett-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017; 181S: S4-S15.e1.

20. Ivády G, Madar L, Nagy B, Gonczi F, Ajzner E, Dzsudzsak E, Dvořáková L, Gombos E, Kappelmayer J, Macek M Jr, Balogh I. Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2011; 10(3): 217-220.
21. Ivády G, Koczok K, Madar L, Gombos E, Toth I, Gyori K, Balogh I. Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - An Update to the Mutational Spectrum. *J Med Biochem*. 2015; 34(1): 46-51.
22. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ Jr, Willey-Courand DB, Bujan J, Finder J, Lester M, Quittell L, Rosenblatt R, Vender RL, Hazle L, Sabadosa K, Marshall B; Cystic Fibrosis Foundation, Pulmonary Therapies Committee. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176(10): 957-969.
23. Lands LC, Stanojevic S. Oral non-steroidal anti-inflammatory drug therapy for lung disease in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019; 9(9): CD001505.
24. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, Coquillet S, Fieberg AY, Accurso FJ, Campbell PW 3rd; Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003; 290(13): 1749-1756.
25. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Barben J, Flume PA, Hodková P, Kashirskaya N, Kirszenbaum MN, Madge S, Oxley H, Plant B, Schwarzenberg SJ, Smyth AR, Taccetti G, Wagner TOF, Wolfe SP, Drevinek P. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros*. 2018; 17(2): 153-178.
26. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*. 2015; 277(2): 155-166.
27. Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, Donaldson SH, Borowitz D, Gelfond D, Sagel SD, Khan U, Mayer-Hamblett N, Van Dalfsen JM, Joseloff E, Ramsey BW; GOAL Investigators of the Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network. Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 190(2): 175-184.

28. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015; 373(3): 220-231.
29. Chilvers MA, Davies JC, Milla C, Tian S, Han Z, Cornell AG, Owen CA, Ratjen F. 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(7): 721-732.
30. Sagel SD, Khan U, Heltshe SL, Clancy JP, Borowitz D, Gelfond D, Donaldson SH, Moran A, Ratjen F, VanDalfsen JM, Rowe SM. Clinical Effectiveness of Lumacaftor/Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for F508del-CFTR. A Clinical Trial. *Ann Am Thorac Soc*. 2021; 18(1): 75-83.
31. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, Wang LT, Ingenito EP, McKee C, Lu Y, Lekstrom-Himes J, Elborn JS. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017; 377(21): 2013-2023.
32. Walker S, Flume P, McNamara J, Solomon M, Chilvers M, Chmiel J, Harris RS, Haseltine E, Stiles D, Li C, Ahluwalia N, Zhou H, Owen CA, Sawicki G; VX15-661-113 Investigator Group. A phase 3 study of tezacaftor in combination with ivacaftor in children aged 6 through 11 years with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2019; 18(5): 708-713.
33. Zemanick ET, Taylor-Cousar JL, Davies J, Gibson RL, Mall MA, McKone EF, McNally P, Ramsey BW, Rayment JH, Rowe SM, Tullis E, Ahluwalia N, Chu C, Ho T, Moskowitz SM, Noel S, Tian S, Waltz D, Weinstock TG, Xuan F, Wainwright CE, McColley SA. 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(12): 1522-1532.
34. Barry PJ, Mall MA, Álvarez A, Colombo C, de Winter-de Groot KM, Fajac I, McBennett KA, McKone EF, Ramsey BW, Sutharsan S, Taylor-Cousar JL, Tullis E, Ahluwalia N, Jun LS, Moskowitz SM, Prieto-Centurion V, Tian S, Waltz D, Xuan F, Zhang Y, Rowe SM, Polineni

D; VX18-445-104 Study Group. Triple Therapy for Cystic Fibrosis Phe508del-Gating and - Residual Function Genotypes. *N Engl J Med*. 2021; 385(9): 815-825.

35. Taylor-Robinson D, Whitehead M, Diderichsen F, Olesen HV, Pressler T, Smyth RL, Diggle P. Understanding the natural progression in FEV1 % decline in patients with cystic fibrosis: a longitudinal study. *Thorax*. 2012; 67(10): 860-866.

36. Szczesniak R, Heltshe SL, Stanojevic S, Mayer-Hamblett N. Use of FEV1 in cystic fibrosis epidemiologic studies and clinical trials: A statistical perspective for the clinical researcher. *J Cyst Fibros*. 2017; 16(3): 318-326.

37. Koerbin G, Greaves RF, Robins H, Farquhar J, Hickman PE. Total intra-individual variation in sweat sodium and chloride concentrations for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2008; 393(2): 128-129.

38. Vermeulen F, Lebecque P, De Boeck K, Leal T. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat tests: A retrospective analysis. *J Cyst Fibros*. 2017; 16(1): 30-35.

39. Fidler MC, Beusmans J, Panorchan P, Van Goor F. Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *J Cyst Fibros*. 2017; 16(1): 41-44.

40. Giddings O, Esther CR Jr. Mapping targetable inflammation and outcomes with cystic fibrosis biomarkers. *Pediatr Pulmonol*. 2017; 52(S48): S21-S28.

41. Liou TG, Adler FR, Argel N, Asfour F, Brown PS, Chatfield BA, Daines CL, Durham D, Francis JA, Glover B, Heynekamp T, Hoidal JR, Jensen JL, Keogh R, Kopecky CM, Lechtzin N, Li Y, Lysinger J, Molina O, Nakamura C, Packer KA, Poch KR, Quittner AL, Radford P, Redway AJ, Sagel SD, Sprandel S, Taylor-Cousar JL, Vroom JB, Yoshikawa R, Clancy JP, Elborn JS, Olivier KN, Cox DR. Prospective multicenter randomized patient recruitment and sample collection to enable future measurements of sputum biomarkers of inflammation in an observational study of cystic fibrosis. *BMC Med Res Methodol*. 2019; 19(1): 88.

42. Chmiel JF, Konstan MW, Accurso FJ, Lymp J, Mayer-Hamblett N, Van Devanter DR, Rose LM, Ramsey BW; Assessment of Induced Sputum in Cystic Fibrosis Study Group. Use of ibuprofen to assess inflammatory biomarkers in induced sputum: Implications for clinical trials in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015; 14(6): 720-726.

43. Breuer O, Caudri D, Stick S, Turkovic L. Predicting disease progression in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2018; 12(11): 905-917.
44. Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(9): 857-865.
45. Moffitt KL, Martin SL, Jones AM, Webb AK, Cardwell C, Tunney MM, Elborn JS. Inflammatory and immunological biomarkers are not related to survival in adults with Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014; 13(1): 63-68.
46. Waters VJ, Stanojevic S, Sonneveld N, Klingel M, Grasemann H, Yau YC, Tullis E, Wilcox P, Freitag A, Chilvers M, Ratjen FA. Factors associated with response to treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2015; 14(6): 755-762.
47. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, Coquillette S, Fieberg AY, Accurso FJ, Campbell PW 3rd; Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003; 290(13): 1749-1756.
48. Hisert KB, Heltshe SL, Pope C, Jorth P, Wu X, Edwards RM, Radey M, Accurso FJ, Wolter DJ, Cooke G, Adam RJ, Carter S, Grogan B, Launspach JL, Donnelly SC, Gallagher CG, Bruce JE, Stoltz DA, Welsh MJ, Hoffman LR, McKone EF, Singh PK. Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017; 195(12): 1617-1628.
49. Twigg MS, Brockbank S, Lowry P, FitzGerald SP, Taggart C, Weldon S. The Role of Serine Proteases and Antiproteases in the Cystic Fibrosis Lung. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 293053.
50. Reihill J, Moffitt K, Douglas L, Stuart Elborn J, Jones A, Lorraine Martin S. Sputum trypsin-like protease activity relates to clinical outcome in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2020; 19(4): 647-653.
51. Müller U, Hentschel J, Janhsen WK, Hünninger K, Hippler UC, Sonnemann J, Pfister W, Böer K, Lehmann T, Mainz JG. Changes of Proteases, Antiproteases, and Pathogens in Cystic Fibrosis Patients' Upper and Lower Airways after IV-Antibiotic Therapy. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 626530.

52. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. 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(47): 32377-32385.
53. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004; 3(4): 223-231.
54. Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4(4): 406-417.
55. Colombo C, Costantini D, Rocchi A, Cariani L, Garlaschi ML, Tirelli S, Calori G, Copreni E, Conese M. Cytokine levels in sputum of cystic fibrosis patients before and after antibiotic therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2005; 40(1): 15-21.
56. Colombo C, Faelli N, Tirelli AS, Fortunato F, Biffi A, Claut L, Cariani L, Daccò V, Prato R, Conese M. 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(2): 423-432.
57. Nixon LS, Yung B, Bell SC, Elborn JS, Shale DJ. Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157(6 Pt 1): 1764-1769.
58. Chirico V, Lacquaniti A, Leonardi S, Grasso L, Rotolo N, Romano C, Di Dio G, Lionetti E, David A, Arrigo T, Salpietro C, La Rosa M. Acute pulmonary exacerbation and lung function decline in patients with cystic fibrosis: high-mobility group box 1 (HMGB1) between inflammation and infection. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(4): 368.e1-9.
59. Rowe SM, Jackson PL, Liu G, Hardison M, Livraghi A, Solomon GM, McQuaid DB, Noerager BD, Gaggar A, Clancy JP, O'Neal W, Sorscher EJ, Abraham E, Blalock JE. Potential role of high-mobility group box 1 in cystic fibrosis airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178(8): 822-831.
60. Liou TG, Adler FR, Keogh RH, Li Y, Jensen JL, Walsh W, Packer K, Clark T, Carveth H, Chen J, Rogers SL, Lane C, Moore J, Sturrock A, Paine R 3rd, Cox DR, Hoidal JR. Sputum biomarkers and the prediction of clinical outcomes in patients with cystic fibrosis. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42748.

61. Hector A, Kormann MS, Mack I, Latzin P, Casaulta C, Kieninger E, Zhou Z, Yildirim AÖ, Bohla A, Rieber N, Kappler M, Koller B, Eber E, Eickmeier O, Zielen S, Eickelberg O, Griesse M, Mall MA, Hartl D. The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24399.
62. Forrest OA, Chopyk DM, Gernez Y, Brown MR, Conrad CK, Moss RB, Tangpricha V, Peng L, Tirouvanziam R. Resistin is elevated in cystic fibrosis sputum and correlates negatively with lung function. *J Cyst Fibros*. 2019; 18(1): 64-70.
63. Ramsey KA, Schultz A, Stick SM. Biomarkers in Paediatric Cystic Fibrosis Lung Disease. *Paediatr Respir Rev*. 2015; 16(4): 213-218.
64. Fayon M, Kent L, Bui S, Dupont L, Sermet I; European Cystic Fibrosis Society Clinical Trial Network Standardisation Committee. Clinimetric properties of bronchoalveolar lavage inflammatory markers in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2014; 43(2): 610-626.
65. Simpson SJ, Mott LS, Esther CR Jr, Stick SM, Hall GL. Novel end points for clinical trials in young children with cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2013; 7(3): 231-243.
66. Armstrong DS, Hook SM, Jansen KM, Nixon GM, Carzino R, Carlin JB, Robertson CF, Grimwood K. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2005; 40(6): 500-510.
67. Bergin DA, Hurley K, Mehta A, Cox S, Ryan D, O'Neill SJ, Reeves EP, McElvaney NG. Airway inflammatory markers in individuals with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Inflamm Res*. 2013; 6: 1-11.
68. Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, Ramsey BW; Inhaled Tobramycin in Young Children Study Group; Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2009; 154(2): 183-188.
69. Sly PD, Brennan S, Gangell C, de Klerk N, Murray C, Mott L, Stick SM, Robinson PJ, Robertson CF, Ranganathan SC; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST-CF). Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(2): 146-152.

70. Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, Murray CP, Stick SM; AREST CF Investigators. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2013; 368(21): 1963-1970.
71. Montgomery ST, Dittrich AS, Garratt LW, Turkovic L, Frey DL, Stick SM, Mall MA, Kicic A; AREST CF. Interleukin-1 is associated with inflammation and structural lung disease in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2018; 17(6): 715-722.
72. Meyer KC, Lewandoski JR, Zimmerman JJ, Nunley D, Calhoun WJ, Dopico GA. Human neutrophil elastase and elastase/alpha 1-antiprotease complex in cystic fibrosis. Comparison with interstitial lung disease and evaluation of the effect of intravenously administered antibiotic therapy. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 144(3 Pt 1): 580-585.
73. Harris WT, Muhlebach MS, Oster RA, Knowles MR, Noah TL. Transforming growth factor-beta(1) in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009; 44(11): 1057-1064.
74. Fantino E, Gangell CL, Hartl D, Sly PD; AREST CF. Airway, but not serum or urinary, levels of YKL-40 reflect inflammation in early cystic fibrosis lung disease. *BMC Pulm Med*. 2014; 14: 28.
75. Esther CR Jr, Turkovic L, Rosenow T, Muhlebach MS, Boucher RC, Ranganathan S, Stick SM; AREST CF. Metabolomic biomarkers predictive of early structural lung disease in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2016; 48(6): 1612-1621.
76. Shoki AH, Mayer-Hamblett N, Wilcox PG, Sin DD, Quon BS. Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *Chest*. 2013; 144(5): 1659-1670.
77. Cantin AM, Bilodeau G, Larivée P, Richter MV. Plasma biomarkers and cystic fibrosis lung disease. *Clin Invest Med*. 2012; 35(4): E173-81.
78. Hendry J, Elborn JS, Nixon L, Shale DJ, Webb AK. Cystic fibrosis: inflammatory response to infection with *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J*. 1999; 14(2): 435-438.
79. Sagel SD, Wagner BD, Ziady A, Kelley T, Clancy JP, Narvaez-Rivas M, Pilewski J, Joseloff E, Sha W, Zelnick L, Setchell KDR, Heltshe SL, Muhlebach MS. Utilizing centralized biorepository samples for biomarkers of cystic fibrosis lung disease severity. *J Cyst Fibros*. 2020; 19(4): 632-640.

80. Quon BS, Ngan DA, Wilcox PG, Man SF, Sin DD. Plasma sCD14 as a biomarker to predict pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89341.
81. Sharma A, Kirkpatrick G, Chen V, Skolnik K, Hollander Z, Wilcox P, Quon BS. Clinical utility of C-reactive protein to predict treatment response during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0171229.
82. Singh A, He M, Chen V, Hollander Z, Tebbutt SJ, Ng RT, McManus BM, Sin DD, Ratjen F, Quon BS. Blood biomarkers to predict short-term pulmonary exacerbation risk in children and adolescents with CF: A pilot study. *J Cyst Fibros*. 2020; 19(1): 49-51.
83. Harris WT, Muhlebach MS, Oster RA, Knowles MR, Clancy JP, Noah TL. Plasma TGF- β_1 in pediatric cystic fibrosis: potential biomarker of lung disease and response to therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2011; 46(7): 688-695.
84. Dong K, Moon KM, Chen V, Ng R, Foster LJ, Tebbutt SJ, Quon BS. Identification of novel blood biomarkers of treatment response in cystic fibrosis pulmonary exacerbations by label-free quantitative proteomics. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 17126.
85. Sagel SD, Thompson V, Chmiel JF, Montgomery GS, Nasr SZ, Perkett E, Saavedra MT, Slovis B, Anthony MM, Emmett P, Heltshe SL. Effect of treatment of cystic fibrosis pulmonary exacerbations on systemic inflammation. *Ann Am Thorac Soc*. 2015; 12(5): 708-717.
86. Dong K, Singh A, Ng RT, Sin DD, Tebbutt SJ, Ratjen F, Quon BS. Proteomic Profiling to Identify Blood Biomarkers Predictive of Response to Azithromycin in Children and Adolescents With Cystic Fibrosis. *Chest*. 2019; 156(4): 667-673.
87. Guerra L, D'Oria S, Favia M, Castellani S, Santostasi T, Polizzi AM, Mariggiò MA, Gallo C, Casavola V, Montemurro P, Leonetti G, Manca A, Conese M. CFTR-dependent chloride efflux in cystic fibrosis mononuclear cells is increased by *ivacaftor* therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2017; 52(7): 900-908.
88. Jarosz-Griffiths HH, Scambler T, Wong CH, Lara-Reyna S, Holbrook J, Martinon F, Savic S, Whitaker P, Etherington C, Spoletini G, Clifton I, Mehta A, McDermott MF, Peckham D. Different CFTR modulator combinations downregulate inflammation differently in cystic fibrosis. *Elife*. 2020; 9: e54556.
89. Rayner RJ, Wiseman MS, Cordon SM, Norman D, Hiller EJ, Shale DJ. Inflammatory markers in cystic fibrosis. *Respir Med*. 1991; 85(2): 139-145.

90. Levy H, Kalish LA, Huntington I, Weller N, Gerard C, Silverman EK, Celedón JC, Pier GB, Weiss ST. Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42(3): 256-262.
91. Pereira LC, Moreira EA, Bennemann GD, Moreno YM, Buss Zda S, Barbosa E, Ludwig-Neto N, Wilhelm Filho D, Fröde TS. Influence of inflammatory response, infection, and pulmonary function in cystic fibrosis. *Life Sci.* 2014; 109(1): 30-36.
92. Matouk E, Nguyen D, Benedetti A, Bernier J, Gruber J, Landry J, Rousseau S, Ahlgren HG, Lands LC, Wojewodka G, Radzioch D. C-Reactive Protein in Stable Cystic Fibrosis: An Additional Indicator of Clinical Disease Activity and Risk of Future Pulmonary Exacerbations. *J Pulm Respir Med.* 2016; 6(5): 1000375.
93. Wojewodka G, De Sanctis JB, Bernier J, Bérubé J, Ahlgren HG, Gruber J, Landry J, Lands LC, Nguyen D, Rousseau S, Benedetti A, Matouk E, Radzioch D. Candidate markers associated with the probability of future pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2014; 9(2): e88567.
94. Ratjen F, Saiman L, Mayer-Hamblett N, Lands LC, Kloster M, Thompson V, Emmett P, Marshall B, Accurso F, Sagel S, Anstead M. Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.* 2012; 142(5): 1259-1266.
95. Bell SC, Bowerman AM, Nixon LE, Macdonald IA, Elborn JS, Shale DJ. Metabolic and inflammatory responses to pulmonary exacerbation in adults with cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 30 (2000) 553-559.
96. Kohlhoff SA, Köhler E, Sollich V. Serum myeloperoxidase in cystic fibrosis patients receiving systemic antibiotics. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39(2): 163-166.
97. Rath T, Zwaschka L, Hage L, Kügler M, Menendez K, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E. Identification of neutrophil activation markers as novel surrogate markers of CF lung disease. *PLoS One.* 2014; 9(12): e115847.
98. Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros.* 2009; 8(5): 338-347.

99. Gray RD, Imrie M, Boyd AC, Porteous D, Innes JA, Greening AP. Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. *J Cyst Fibros*. 2010; 9(3): 193-198.
100. Reid PA, McAllister DA, Boyd AC, Innes JA, Porteous D, Greening AP, Gray RD. Measurement of serum calprotectin in stable patients predicts exacerbation and lung function decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191(2): 233-236.
101. Nagy B Jr, Nagy B, Fila L, Clarke LA, Gönczy F, Bede O, et al. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. *Chest* 150 (2016) 661-672.
102. Nagy B Jr, Bene Z, Fejes Z, Heltshe SL, Reid D, Ronan NJ, 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*. 18 (2019) 271-277.
103. Bene Z, Fejes Z, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, Nagy B Jr. Laboratory biomarkers for lung disease severity and progression in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2020; 508: 277-286.
104. Girón-Moreno RM, Justicia JL, Yamamoto S, Valenzuela C, Cisneros C, Gómez-Punter RM, Fernandes-Vasconcelos G, Ancochea J. Role of C-reactive protein as a biomarker for prediction of the severity of pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2014; 14: 150.
105. Meyer KC. Neutrophils, myeloperoxidase, and bronchiectasis in cystic fibrosis: green is not good. *J Lab Clin Med*. 2004; 144(3): 124-126.
106. Forrester DL, Barr HL, Fogarty A, Knox A. sTREM-1 is elevated in cystic fibrosis and correlates with proteases. *Pediatr Pulmonol*. 2017; 52(4): 467-471.
107. Yang SF, Wu TF, Tsai HT, Lin LY, Wang PH. New markers in pelvic inflammatory disease. *Clin. Chim. Acta*. 431 (2014) 118-124.
108. Coriati A, Massé C, Ménard A, Bouvet GF, Berthiaume Y. Neutrophils as a Potential Source of Chitinase-3-like Protein 1 in Cystic Fibrosis. *Inflammation* 41 (2018) 1631-1639.
109. Leonardi S, Parisi GF, Capizzi A, Manti S, Cuppari C, Scuderi MG, Rotolo N, Lanzafame A, Musumeci M, Salpietro C. YKL-40 as marker of severe lung disease in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2016; 15(5): 583-586.

110. Clauss A, Lilja H, Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J*. 2002; 368(Pt 1): 233-242.
111. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Rassl D, Yuan G, Hellstrom I, Campos MA, Bingle CD. 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(1): 61.
112. Small DM, Doherty DF, Dougan CM, Weldon S, Taggart CC. The role of whey acidic protein four-disulfide-core proteins in respiratory health and disease. *Biol Chem*. 2017; 398(4): 425-440.
113. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol*. 2006; 19(6): 847-853.
114. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N, Hellström KE. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63(13): 3695-3700.
115. Bignotti E, Ragnoli M, Zanotti L, Calza S, Falchetti M, Lonardi S, Bergamelli S, Bandiera E, Tassi RA, Romani C, Todeschini P, Odicino FE, Facchetti F, Pecorelli S, Ravaggi A. Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2011; 104(9): 1418-1425.
116. Nagy B Jr, Bhattoa HP, Steiber Z, Csobán M, Szilasi M, Méhes G, Müller M, Lázár J, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2014; 52(11): 1639-1648.
117. Hua L, Liu Y, Zhen S, Wan D, Cao J, Gao X. Expression and biochemical characterization of recombinant human epididymis protein 4. *Protein Expr Purif*. 2014; 102: 52-62.
118. Muhlebach MS, Clancy JP, Heltshe SL, Ziady A, Kelley T, Accurso F, Pilewski J, Mayer-Hamblett N, Joseloff E, Sagel SD. Biomarkers for cystic fibrosis drug development. *J Cyst Fibros*. 2016; 15(6): 714-723.
119. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of

respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 1994; 331(10): 637-642.

120. Ronan NJ, Einarsson GG, Twomey M, Mooney D, Mullane D, NiChroinin M, O'Callaghan G, Shanahan F, Murphy DM, O'Connor OJ, Shortt CA, Tunney MM, Eustace JA, Maher MM, Elborn JS, Plant BJ. CORK Study in Cystic Fibrosis: Sustained Improvements in Ultra-Low-Dose Chest CT Scores After CFTR Modulation With Ivacaftor. *Chest*. 2018; 153(2): 395-403.

121. Wood ME, Smith DJ, Reid DW, Masel PJ, France MW, Bell SC. Ivacaftor in severe cystic fibrosis lung disease and a G551D mutation. *Respirol Case Rep*. 2013; 1(2): 52-54.

122. Wang H, Cebotaru L, Lee HW, Yang Q, Pollard BS, Pollard HB, Guggino WB. CFTR Controls the Activity of NF-KappaB by Enhancing the Degradation of TRADD. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 40: 1063-1078.

123. Pranke IM, Hatton A, Simonin J, Jais JP, Le Pimpec-Barthes F, Carsin A, Bonnette P, Fayon M, Stremler-Le Bel N, Grenet D, Thumerel M, Mazenq J, Urbach V, Mesbahi M, Girodon-Boulandet E, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Correction of CFTR Function in Nasal Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients Predicts Improvement of Respiratory Function by CFTR Modulators. *Sci Rep*. 2017; 7: 7375.

124. Kmit A, Marson FAL, Pereira SV, Vinagre AM, Leite GS, Servidoni MF, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Bertuzzo CS, Amaral MD. 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(6): 1323-1331.

125. Boinot C, Jollivet Souchet M, Ferru-Clément R, Becq F. Searching for combinations of small-molecule correctors to restore f508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and processing. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014; 350(3): 624-634.

126. Billet A, Froux L, Hanrahan JW, Becq F. Development of Automated Patch Clamp Technique to Investigate CFTR Chloride Channel Function. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 195.

127. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Steinhoff M, Messerlian G, DiSilvestro P, Granai CO, Bast RC Jr. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2008; 108(2): 402-428.

128. Kappelmayer J, Antal-Szalmás P, Nagy B Jr. Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. *Clin Chim Acta*. 2015; 438: 35-42.
129. Nagy B Jr, Krasznai ZT, Balla H, Csobán M, Antal-Szalmás P, Hernádi Z, Kappelmayer J. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem*. 2012; 49(Pt 4): 377-380.
130. Liu W, Yang J, Chi PD, Zheng X, Dai SQ, Chen H, Xu BL, Liu WL. Evaluating the clinical significance of serum HE4 levels in lung cancer and pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013; 17(10): 1346-1353.
131. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC Jr, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 206(4): 349.e1-7.
132. Mishra A, Greaves R, Smith K, Carlin JB, Wootton A, Stirling R, Massie J. Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age-specific reference intervals. *J Pediatr*. 2008; 153(6): 758-763.
133. Seia M, Costantino L, Paracchini V, Porcaro L, Capasso P, Coviello D, Corbetta C, Torresani E, Magazzù D, Consalvo V, Monti A, Costantini D, Colombo C. Borderline sweat test: Utility and limits of genetic analysis for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Biochem*. 2009; 42(7-8): 611-616.
134. Clarke LA, Sousa L, Barreto C, Amaral MD. Changes in transcriptome of native nasal epithelium expressing F508del-CFTR and intersecting data from comparable studies. *Respir Res*. 2013; 14(1): 38.
135. Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol*. 2004; 37(5): 393-399.
136. Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JG, Guggino WB, Boyle MP. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35(3): 327-336.
137. Zabner J, Scheetz TE, Almabrazi HG, Casavant TL, Huang J, Keshavjee S, McCray PB Jr. CFTR DeltaF508 mutation has minimal effect on the gene expression profile of differentiated human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289(4): L545-553.

138. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol.* 2007; 211(3): 340-350.
139. Clarke LA, Botelho HM, Sousa L, Falcao AO, Amaral MD. Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies CFTR regulators. *Genomics.* 2015; 106(5): 268-277.
140. Bingle L, Tetley TD, Bingle CD. Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(1): 84-91.
141. Chen F.E, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal Structure of P50/p65 Heterodimer of Transcription Factor NF-Kb Bound to DNA. *Nature* 1998; 391: 410–413.
142. Barnaby R, Koeppen K, Nymon A, Hampton TH, Berwin B, Ashare A, Stanton BA. Lumacaftor (VX-809) restores the ability of CF macrophages to phagocytose and kill *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 314(3): L432-L438.
143. Ruffin M, Roussel L, Maillé É, Rousseau S, Brochiero E. Vx-809/Vx-770 treatment reduces inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in primary differentiated cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 314(4): L635-L641.
144. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 2011; 365(18): 1663-1672.
145. Roda J, Pinto-Silva C, Silva IAI, Maia C, Almeida S, Ferreira R, Oliveira G. New drugs in cystic fibrosis: what has changed in the last decade? *Ther Adv Chronic Dis.* 2022; 13: 20406223221098136.
146. Janeckova L, Pospichalova V, Fafílek B, Vojtechova M, Tureckova J, Dobes J, Dubuissez M, Leprince D, Baloghova N, Horazna M, Hlavata A, Stancikova J, Sloncová E, Galuskova K, Strnad H, Korinek V. HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF-κB Signaling and Promotes Tissue Damage-Associated Tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(7): 1139-1148.

147. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 11(6): 733-741.
148. Favia M, Gallo C, Guerra L, De Venuto D, Diana A, Polizzi AM, Montemurro P, Marigliò MA, Leonetti G, Manca A, Casavola V, Conese M. Treatment of Cystic Fibrosis Patients Homozygous for F508del with Lumacaftor-Ivacaftor (Orkambi®) Restores Defective CFTR Channel Function in Circulating Mononuclear Cells. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(7): 2398.
149. Adam D, Bilodeau C, Sognigbé L, Maillé É, Ruffin M, Brochiero E. CFTR rescue with VX-809 and VX-770 favors the repair of primary airway epithelial cell cultures from patients with class II mutations in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts. *J Cyst Fibros*. 2018; 17(6): 705-714.
150. Stanton BA, Coutermarsh B, Barnaby R, Hogan D. *Pseudomonas aeruginosa* Reduces VX-809 Stimulated F508del-CFTR Chloride Secretion by Airway Epithelial Cells. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127742.
151. Laselva O, Stone TA, Bear CE, Deber CM. Anti-Infectives Restore ORKAMBI® Rescue of F508del-CFTR Function in Human Bronchial Epithelial Cells Infected with Clinical Strains of *P. aeruginosa*. *Biomolecules*. 2020; 10(2): 334.
152. Bitam S, Pranke I, Hollenhorst M, Serval N, Moquereau C, Tondelier D, Hatton A, Urbach V, Sermet-Gaudelus I, Hinzpeter A, Edelman A. An unexpected effect of TNF- α on F508del-CFTR maturation and function. *F1000Res*. 2015; 4: 218.
153. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014; 13(4): 403-439.
154. LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, Charytan D, Müller GA, Müller CA, Sugimoto H, Kalluri R. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med*. 2013; 19(2): 227-231.
155. Nishiyama N, Masuo M, Nukui Y, Tateishi T, Kishino M, Tateishi U, Morota K, Ohbo K, Miyazaki Y. Human epididymis protein 4 is a new biomarker to predict the prognosis of progressive fibrosing interstitial lung disease. *Respir Investig*. 2021; 59(1): 90-98.

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

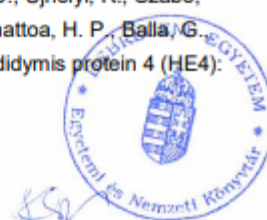
Nyilvántartási szám: DEENK/423/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bene Zsolt

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bene, Z.**, Fejes, Z., Szántó, G. T., Fenyvesi, F., Váradi, J., Clarke, L. A., Panyi, G., Macek, J. M., Amaral, M. D., Balogh, I., Nagy, B. Jr.: Enhanced Expression of Human Epididymis Protein 4 (HE4) Reflecting Pro-Inflammatory Status Is Regulated by CFTR in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells.
Front. Pharmacol. 12, 1-16, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.592184>
IF: 5.988
2. **Bene, Z.**, Fejes, Z., Macek, J. M., Amaral, M. D., Balogh, I., Nagy, B. Jr.: Laboratory biomarkers for lung disease severity and progression in cystic fibrosis.
Clin. Chim. Acta. 508, 277-286, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.015>
IF: 3.786
3. Nagy, B. Jr., **Bene, Z.**, Fejes, Z., Heltshe, S. L., Reid, D. M., Ronan, N. J., McCarthy, Y., Smith, D., Nagy, A. C., Joseloff, E., Balla, G., Kappelmayer, J., Macek, J. M., Bell, S. C., Plant, B. J., Amaral, M. D., Balogh, I.: Human epididymis protein 4 (HE4) levels inversely correlate with lung function improvement (delta FEV1) in cystic fibrosis patients receiving ivacaftor treatment.
J. Cyst. Fibros. 18 (2), 271-277, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2018.08.013>
IF: 4.759
4. Nagy, B. Jr., Nagy, B., Fila, L., Clarke, L. A., Gönczy, F., Bede, O., Nagy, D., Újhelyi, R., Szabó, Á., Anghelyi, A., Major, M., **Bene, Z.**, Fejes, Z., Antal-Szalmás, P., Bhattoa, H. P., Balla, G., Kappelmayer, J., Amaral, M. D., Macek, J. M., Balogh, I.: Human epididymis protein 4 (HE4): a novel serum inflammatory biomarker in cystic fibrosis.
Chest. 150 (3), 661-672, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2016.04.006>
IF: 6.044





További közlemények

5. Balogh, E., Nagy, B. Jr., Gyetvai, Á., **Bene, Z.**, Hendrik, Z., Jeney, V., Nagy, P., Papp, Á., Balla, J., Balla, G., Kappelmayer, J., Nagy, B.: Impaired Immunosuppressive Effect of Bronchoalveolar Mesenchymal Stem Cells in Hypersensitivity Pneumonitis: preliminary findings.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. 94 (2), 363-368, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21490>
IF: 2.938
6. Papp, Á., **Bene, Z.**, Gáspár, I. L., Nagy, B. Jr., Kádár, L., Marialigeti, T., Bánfi, A., Baktai, G., Balla, G., Nagy, B.: Decreased VEGF Level Is Associated with Elevated Ferritin Concentration in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Children with Interstitial Lung Diseases.
Respiration. 90 (6), 443-450, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000440888>
IF: 2.651
7. Nagy, B., Gáspár, I. L., Papp, Á., **Bene, Z.**, Nagy, B. Jr., Vokó, Z., Balla, G.: Efficacy of Methylprednisolone in Children With Severe Community Acquired pneumonia.
Pediatr. Pulmonol. 48 (2), 168-175, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.22574>
IF: 2.297
8. Nagy, B., Gáspár, I. L., **Bene, Z.**, Papp, Á.: Súlyos átmeneti tüdőparenchyma-károsodás szubakut exogén allergiás alveolitisben.
Med. Thorac. 64 (3), 167-172, 2011.
9. Papp, Á., Gáspár, I. L., **Bene, Z.**, Balázs, G., Nagy, B.: Tévhitek az allergiás náthával kapcsolatban.
Med. Thorac. 64, 375-379, 2011.
10. Nagy, B., Papp, Á., Gáspár, I. L., **Bene, Z.**: A tüdő diffúz parenchymás (interstitialis) fibrotizáló betegségei gyermekkorban.
Medicina Thorac. 63 (6), 388-396, 2010.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,463

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):

20,577

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

Debrecen, 2022.09.08.



11. Tárgyszavak – keywords

Biomarker kutatás – biomarker research

Bronchoepitheliális sejt – bronchoepithelial cell

Cisztás fibrózis – cystic fibrosis

CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CRP – C-reactive protein

HE4 – human epididymis protein 4

Gyulladás – inflammation

Légzésfunkció – spirometry

Verejtékklorid – sweat chloride

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm 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.

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

Köszönetet mondok korábbi és jelenlegi intézetigazgatómnak, **Prof. Balla György** akadémikus úrnak és **Dr. Szabó Tamás** tanár úrnak, hogy támogatták a PhD-tanulmányaim elvégzését.

Köszönöm az együttműködő hazai klinikus kollégáknak (**id. Dr. Nagy Béla, Dr. Gönczy Ferenc, Dr. Bede Olga, Dr. Nagy Dóra, Dr. Újhelyi Rita, Dr. Szabó Ágnes, Dr. Anghelyi Andrea, Dr. Major Miklós**) az értékes magyar CF-es beteganyag biztosítását.

Köszönetemet fejezem ki a külföldi kollaborációs partnereinknek (**Dr. Libor Fila, Dr. Luka A. Clarke, Dr. Sonya L. Heltshe, Dr. David Reid, Dr. Nicola J. Ronan, Dr. Yvonne McCarthy, Dr. Daniel Smith, Dr. Elizabeth Joseloff és Prof. Milan Macek Jr, Prof. Scott C. Bell, Prof. Barry J. Plant és Prof. Margarida D. Amaral**), hogy a betegminták összegyűjtésében és elküldésében, valamint a kísérletek megtervezésében a segítségünkre voltak.

Köszönöm **Dr. Fejes Zsoltnak, Pócsi Mariannának, Dr. Antal-Szalmás Péternek és Dr. Balogh Istvánnak**, hogy a módszerek kivitelezésével és az eredmények interpretálásával nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Külön köszönöm **Dr. Szántó Tibor Gábornak, Dr. Panyi Györgynek, Dr. Fegyvesi Ferencnek és Dr. Váradi Juditnak** a metodikai beállításokban, valamint **Dr. Nagy Attilának és Dr. Bhattoa Harjit Palnak** a statisztikai számolásokban nyújtott segítségét.

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

Tudományos pályázatok, támogatások:

A kutatómunka a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 kódszámú „Szív- és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)” pályázat, az OTKA „FK-135327” kódszámú pályázat (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal) (NB), az „OTKA Bridging fund 2018-19” támogatás (NB) (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar), a Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj (A2-MZPDÖ-13-0137) (NB) és a Nemzeti Kiválóság Program, Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíj (ÚNKP-17-4, III. típus) támogatásával (NB) készült.

13. Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények gyűjteménye:

Nagy B Jr, Nagy B, Fila L, Clarke LA, Gönczy F, Bede O, Nagy D, Újhelyi R, Szabó Á, Anghelyi A, Major M, **Bene Z**, Fejes Z, Antal-Szalmás P, Bhattoa HP, Balla G, Kappelmayer J, Amaral MD, Macek M Jr, Balogh I. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. *Chest*. 2016; 150(3): 661-672.

Nagy B Jr, **Bene Z**, Fejes Z, Heltshe SL, Reid D, Ronan NJ, McCarthy Y, Smith D, Nagy A, Joseloff E, Balla G, Kappelmayer J, Macek M Jr, Bell SC, Plant BJ, Amaral MD, Balogh I. 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(2): 271-277.

Bene Z, Fejes Z, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, Nagy B Jr. Laboratory biomarkers for lung disease severity and progression in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2020; 508: 277-286.

Bene Z, Fejes Z, Szanto TG, Fenyvesi F, Váradi J, Clarke LA, Panyi G, Macek M Jr, Amaral MD, Balogh I, Nagy B Jr. 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; 12: 592184.