

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Dr. Bene Zsolt

Témavezető: Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023

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

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

Írta: Dr. Bene Zsolt általános orvos

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

Témavezető: Dr. Nagy Béla, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Novák Zoltán, MTA doktora
Dr. Földesi Imre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Boda Zoltán, MTA doktora
tagok: Dr. Novák Zoltán, MTA doktora
Dr. Földesi Imre, PhD
Dr. Fagyas Miklós, PhD
Dr. Péterfalvi Ágnes, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati Intézet előadóterme
2023. március 17., 13.30.

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A cisztás fibrózis patomechanizmusa

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. Az európai, köztük a magyarországi betegpopulációban a leggyakoribb CFTR variáns a p.Phe508del (F508del, a régi nomenklatura szerint delta-F508), melyet hazánkban a betegek kb. 80-85%-a hordozza homozigóta vagy összetett („compound”) heterozigóta formában. Ennek a mutációnak a lényege egy 3 bázispárt érintő delécia 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.

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, melyet 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 gyulladásos aktivációt. A krónikus légúti gyulladás végsősoron a hörgők, majd a tüdőszövet károsodásához, és következményesen légzési elégtelenséghez, valamint a tüdőfunkció végleges romlásához vezet. 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-inflammatórikus folyamatok is. Az epithelsejtekben a mitogen-activated protein kinase (MAPK) fehérje és az NF- κ B-dependens

jelátviteli útvonalak fokozott aktivitása is jellemző. 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- κ B jelátvitel aktivitását. Mindezek alapján a CFTR gyulladáscsökkentő hatásának kifejtéséhez a fehérje ép csatornafunkciója látszik szükségesnek. 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.

A mutációspecifikus CFTR modulátorok szerepe a CF terápiában

Míg a CF hagyományos terápiája a betegség progressziójának fékezésére, valamint a következmények és szövödmények kezelésére irányult, az újabb 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). 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. A CFTR korrektorok, mint például a *lumacaftor*, *tezacaftor* vagy *elexacaftor* 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. Ez utóbbi mutáció esetén legalább egy korrektor és egy potenciátor molekula kombinált alkalmazása szükséges a klinikai hatásosság érdekében. A *lumacaftor/ivacaftor* (Orkambi[®]) vagy a *tezacaftor/ivacaftor* (Symdeco[®], Symkevi[®]) a p.Phe508del homozigóta betegekben, míg a legújabb hármas kombináció, a *tezacaftor/elexacaftor/ivacaftor* (Kaftrio[®]) már a CF-es betegek többségét kitevő p.Phe508del összetett heterozigóta genotípus esetén is hatásosnak bizonyult. 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.

A gyulladásos biomarkerek szerepe cisztás fibrózisban

A CF-es tüdőbetegség nyomon követése kulcsfontosságú a gondozás során, hiszen a betegség prognózisát, az életminőséget és a mortalitást leginkább a tüdőbetegség súlyossága határozza meg, melynek folyamatai már csecsemőkorban elkezdődnek. 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.

A köpetben vagy bronchoalveolaris mosófolyadékban (BAL) számos olyan gyulladásos biomarker meghatározható, mely alkalmas a prognosztikai célokra, a légzésfunkció romlásának előre jelzésére, valamint terápiás sémák hatásának monitorizálására (pl. NE, antiproteázok, IL-6, IL-8, IL-1 β , TGF- β 1). Azonban a mintavételi nehézségek, a BAL invazivitása, az egységes mérési eljárások hiányában ezek a rutin klinikai gyakorlatba nem kerültek bevezetésre.

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. 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,
2. követik a CF-es tüdőbetegség súlyosságát,
3. előre jelzik az akut pulmonális exacerbáció kialakulását,
4. jelentős koncentráció változást mutatnak a pulmonális exacerbáció lezajlása alatt, és
5. követik a gyulladás mértékének csökkenését antibiotikum vagy CFTR-specifikus kezelés alatt és után

Annak ellenére, hogy számos biomarkert vizsgáltak már a CF-es tüdőbetegség gyulladásos folyamatainak monitorizálására, 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/szérum 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.

A HE4 mint potenciális CF biomarker

A WFDC proteincsalád kis méretű fehérjét foglal magában, amelyek különböző, rendszerint protektív funkciót látnak el, például antiproteáz, antibakteriális, vagy gyulladáscsökkentő tulajdonsággal bírnak. A tüdőben nagy mennyiségben expresszálódnak, így a tüdő homeosztázisának fenntartásában és a proteolitikus hatások elleni védelemben játszhatnak szerepet. Jelenleg 18 altípusuk ismert, melyek közül az SLPI-t vagy másik néven WFDC4-et az epitheliális sejtek és az aktivált makrophágok termelik, és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a monocytákra, továbbá semlegesíti a NE-t és az IL-8-at, valamint fékezi a neutrophilek beáramlását. Az Elafin (WFDC14) szintén a légúti epithelsejtekben és az aktivált makrophagokban expresszálódik, és képes a *P. aeruginosa*-t opszonizálni.

A HE4 (másnéven WFDC2) fehérje expresszióját számos egészséges és malignus szövetben kimutatták. A klinikumban elsőként ovárium, majd endometrium carcinomában és tüdőtumorban 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. 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.

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.

Célkitűzések

A szérumban HE4 vizsgálata potenciális diagnosztikai és prognosztikai biomarkerként CF-ben

Célunk volt, hogy értékeljük, vajon a szérumban 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 szérumban HE4 eredményeivel.
- Kíváncsiak voltunk arra, hogy a CF-es betegekben a szérumban HE4 szintek korrelálnak-e a szérumban CRP szintekkel, a verejtékklorid koncentrációval, illetve mutatnak-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.

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.
- Értékeljük, 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.

A fokozott HE4 expresszió patomechanizmusának és az intraepitheliális gyulladással való kapcsolatának vizsgálata bronchoepitheliális sejt kultúrákban

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 410⁺ sejtek valóban fokozott HE4 expressziót mutatnak-e a wt-CFTR-t expresszáló CFBE 410⁺ sejtekhez képest.
- Megfigyeltük, hogy a CFTR funkció hogyan befolyásolja a HE4 expressziót vad típusú és F508del-CFTR-t expresszáló CFBE 410⁺ sejt kultúrákban.
- Analizáltuk továbbá, hogy a HE4 expresszió fokozható-e az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivációjával a CFBE sejtekben gyulladással stimulált (TNF- α) hatására.
- Megvizsgáltuk végül, hogy a CFTR-csatorna az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül vagy attól függetlenül szabályozza-e a HE4 expressziót a CFBE sejtekben.

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.

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 (Charles University, Prága, Csehország) összesen 57 felnőtt CF-es cseh beteget válogattunk be. A CF diagnózisának felállítása az aktuális CF konszenzusos diagnosztikai kritériumok alapján történt. 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 középsúlyosnak és ≤ 40 pont esetén súlyosnak definiálták a betegséget. A vérminták egy időpontban a járóbeteg kontrollvizsgálatok alkalmával kerültek összegyűjtésre, amikor általában enyhe vagy középsúlyos 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). A CRP szintek a súlyos CF-es gyermekek (n=29) és valamennyi cseh felnőtt beteg esetén álltak rendelkezésre.

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. Végül 12 magát egészségesnek mondó, tünetmentes CF-es magyar személyt (átlag életkoruk 31 [25-37] év) is megvizsgáltunk szérumban HE4-re, akik csak hordozói voltak a p.Phe508del CFTR mutációnak az egyik allélon.

Miután megvizsgáltuk a szérumban 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, illetve bevontunk helyben kezelt klinikai eseteket is (Adult CF Centre at The Prince Charles Hospital, Brisbane, Ausztrália). 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. 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.

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 megkezdése után már 1 hónappal levett mintáival. Ezeket a plazmamintákat szintén fagyasztva a CFFT Biorepository biobankból kaptuk, és korábban a betegek a PROSPECT tanulmányban vettek részt. Mivel ezen vizsgálatunk ideje alatt sem voltak még elérhetők *lumacaftor/ivacaftor* kezelt betegek mintái, ezért a mérésekhez újra külföldi mintaforrást vettünk igénybe.

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. 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 bronchoscopy során (Debreceni Egyetem, Gyermekgyógyászati Intézet). A kontroll csoportban a bronchoscopiára a ziháló epizódok hátterének tisztázása és a centrális légúti szűkület kizárása céljából került sor.

Reagensek a sejtes kísérletekhez

A CFTR korrektorként alkalmazott *lumacaftort* (VX-809, LUM) (S1565) és *tezacaftort* (VX-661, TEZ) (S7059), a CFTR potenciátor hatású *ivacaftort* (VS-770, IVA) (S1144), a CFTR gátlására használt feszültség-independens CFTR inhibitor CFTR_{inh172}-t (S7139), a CFTR aktivátor *forskolint* (FSK, S2449), 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 reagensek mindegyikének a dimethyl-sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) volt az oldószere.

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.

Az NF- κ B útvonal HE4 expresszióban betöltött szerepének *in vitro* vizsgálata céljából a pro-inflammatorikus jelátvitelt specifikusan gátlószerezrel, 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.

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.

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. 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). 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 áramgörbékét 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 vizsgálatok kivitelezésében Dr. Szántó Tibor és Prof. Panyi György (Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) nyújtottak segítséget.

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.

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 sejt kultúra) 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 μ M, 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.

Immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

A normál, valamint a csökkent CFTR funkciót mutató CFBE 410⁺ sejtekben az NF- κ B 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- κ B útvonalra gyakorolt hatását megvizsgáljuk, a CFBE sejteket előzetesen *lumacaftor* (3 μ M) + *ivacaftor* (10 μ M) vagy *tezacaftor* (5 μ M) + *ivacaftor* (10 μ M) 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 nemspecifikus antitest kötőhelyek blokkolása érdekében. Az NF- κ B p65 alegységet elsődlegesen poliklonális nyúl eredetű anti-humán p65 antitesttel (100 μ g/mL, Sigma-Aldrich) jelöltük 1 óráig, majd a másodlagos festés céljából Alexa Fluor 488-konjugált kecske eredetű nyúl-IgG ellenes antitestet (5 μ g/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 vizsgálatok kivitelezésében Dr. Fenyvesi Ferenc és Dr. Váradi Judit (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék) nyújtottak segítséget.

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.

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.

Eredmények

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, hanem mint egy új típusú gyulladásos paraméter. Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a korábban immunhisztokémiával tapasztalt fokozott pulmonális HE4 expresszió megmutatkozik-e a CF-es vérmintákban is.

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 egyéneknél, 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 ($n=76+18$). 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.

CF-ben jelentősen emelkedett szérumszintek HE4 szintek mérhetők a CFTR gén variánstól 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. 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 ($p < 0,001$). 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 ($p = 0,164$).

A szérumszintek 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 szérumszint CRP alapján nem volt jelentős szisztémás gyulladása a betegeknek. Amikor a szérumszint 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 szérumszintekhez vezet.

A magas szérums 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). 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 középsúlyos 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. Ugyanakkor a középsúlyos és a súlyos CF-es betegek között is volt szignifikáns különbség ($P < 0,05$) a szérums HE4-ben mindkét életkorcsoportban.

Ennek folytatásaként statisztikailag értékeltük Spearman teszttel, 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; $P < 0,0001$). 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.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a HE4 változásai és az emelkedett CRP szintek között van-e bármilyen 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; $P < 0,001$). 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; $P = 0,435$).

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; $P = 0,037$).

A szérum HE4 labordiagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálata CF-ben

Megvizsgáltuk a HE4 potenciális diagnosztikai szerepét a teljes CF-es betegpopulációban leértékelt 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. 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%).

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 szérum 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.

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

Három CF-es betegtől hörgőnyálkahártya biopsziás mintát vettünk bronchoscope során, míg három másik nem CF-es bronchitises beteg kontrollként szolgált. A CF-es betegekben 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 szérums HE4 koncentráció potenciális forrása a légúti epithélium lehet CF-ben.

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.

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. Az ivacaftor kezelésben részesült betegek min. egy, a III. osztályba tartozó p.Gly551Asp CFTR variánst mutattak. A csoportok eltérő súlyosságú tüdőbetegségben szenvedtek a mintavétel időpontjában. Négy kivétellel az összes többi CF-es beteg verejtékklorid szintje > 60 mmol/L volt. 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 szérums kreatinin eredményei alapján, ami befolyásolhatná a HE4 értékeket.

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), párhuzamosan a légzésfunkció és a BMI finom javulásával és a verejtékklorid koncentráció drasztikus csökkenésével.

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. 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). Ezzel szemben a 3. vizsgálati csoportban a betegek FEV₁ %-os értékei szélesebb tartományban mozogtak (medián [min-max] 78 [24-119] %) 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). 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; $P < 0,001$).

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, 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 $P = 0,011$). A klinikai vizsgálatok során a betegek tápláltsági állapotát is monitorozták BMI-vel, melyet szintén a rendelkezésünkre bocsátottak és javuló értékeket regisztráltak.

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. Hasonlóan, a delta HE4 eredmények is eltérő r érték mellett, de szignifikáns negatív korrelációt mutattak a delta FEV₁ % értékekkel az egyes betegcsoportokban. 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.

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.

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. 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).

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) 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.

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 FEV₁ %-os értéket, a középsúlyos/súlyos csoportba a < 70% FEV₁ %-ot mutató betegeket soroltuk. Mindkét alcsoportban csökkenő tendencia mutatkozott a HE4 szintekben az *ivacaftor* kezelésnek köszönhetően, azonban a HE4 jóval nagyobb mértékű csökkenését láttuk az alacsonyabb FEV₁ %-os értékek esetén. 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.

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.

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 ($P < 0,01$). 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 sejtenyészet 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 ($P < 0,05$).

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.

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 sejttypusban 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.

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. 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. 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. 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; $P = 0,560$). Összegzésképpen, 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.

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. 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. 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 gyógyszermolekulák hatását a HE4 expresszióra *in vitro*.

A TNF- α indukálja a HE4 mRNS szintet a CFBE 410⁻ 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 410⁻ 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 ($P < 0,0001$).

Ugyanezen kísérleti körülmények között a proinflammatorikus citokinek közül az IL6, IL8 és IL1B mRNS szinteket is meghatároztuk annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a TNF- α stimulus ezen gyulladásos mediátorok termelődését is ténylegesen fokozta, párhuzamosan a HE4 expresszióval. Az eredmények azt mutatták, hogy az IL6 és IL8 expresszió időbeli változásának mintázata a HE4 mRNS 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 410⁻ sejtek felülszójában 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. 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 felülszójában 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.

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. Jelen kísérleteinkben mi is vizsgáltuk, hogy az abnormális CFTR működés által kiváltott fokozott pro-inflammatórikus 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 transzkripció 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. 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 sejttypusban 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.

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 p65 nukleáris transzlokációját, valamint mértük az IL-6 koncentrációját a sejtek felülszójában.

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). Ezzel párhuzamosan a korrigált CFTR funkció mellett a F508del-CFTR CFBE sejtenyészetek felülúszójában mért csökkent IL-6 protein szintek szintén igazolták az alkalmazott CFTR modulátorok gyulladáscsökkentő hatását mind a bazális, mind pedig a TNF- α indukált IL-6 expresszió csökkentése révén. 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.

A CFBE 410⁺ sejt kultúrák felülúszójában 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 410⁺ sejtekben. A LUM/IVA vagy TEZ/IVA hozzáadása a sejtekhez csökkent HE4 szinteket eredményezett ($P < 0,001$) a TNF- α által aktivált CFBE sejtek felülúszójában 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 ($P < 0,05$). 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. Így az eredmények bizonyítékkul szolgálnak arra, hogy a korrigált CFTR funkciónak egyfajta protektív szerepe van a HE4 expresszió TNF- α indukálta fokozódásával szemben a CFBE sejtekben.

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. A kérdés tisztázása érdekében a F508del-CFTR-t expresszázó CFBE 410⁺ 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 ($P < 0,001$).

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 ($P < 0,05$). 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-inflammatórikus állapot közötti szoros összefüggésre vetít fényt. Összefoglalásként megállapítható, hogy a CFBE sejtkultúrák felülúszó mintáiban mért HE4 koncentrációk változása nemcsak az NF- κ B útvonal közvetítette gyulladásos jelátvitel szabályozásának a következménye, de a CFTR funkció közvetlen befolyásoló hatásának is köszönhető.

Megbeszélés

Vizsgálataink során azt állapítottuk meg, hogy mind a gyermek, mind a felnőtt CF-es betegek szérumban szignifikánsan magasabb HE4 koncentráció mérhető az egészséges személyek, illetve a nem CF-es tüdőbetegek 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. A szérumban mért HE4 értékekhez hasonlóan a CF-es gyermek betegek köpetmintáiban is magasabb HE4 koncentrációkat mértünk a nem CF-es tüdőbetegek és a kontrollok mintáihoz hasonlítva. 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 gyermek betegekben. Bár az életkornak általában hatása van a HE4 értékek alakulására, a bevont CF-es beteg esetében az életkornak nem volt befolyásoló hatása a HE4 szintekre, szemben a verejtékklorid koncentrációval, mely egy korábbi tanulmány alapján az életkorral növekvő tendenciát mutatott. A szérumban HE4 prognosztikai szerepére utal CF-ben, hogy szorosan korrelál a tüdőbetegség súlyosságával, a bakteriális kolonizáció jelenlétével és a pancreas elégtelenséggel.

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. 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. 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 intermediér 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 bronchoscoppal nyert hörgőnyálkahártya biopsziás mintában kvantáltuk a HE4-specifikus mRNS szintet, mely szignifikánsan emelkedett volt a nem CF-es bronchitises kontroll mintákhoz képest. 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.

A kísérletes munkánk célja annak vizsgálata is volt, hogy a CF-ben potenciális biomarkerként alkalmazható HE4 fokozott expressziója befolyásolható-e a CFTR funkció javításával. A F508del-CFTR CFBE sejtek felülszójában kb. 1,5-szer nagyobb HE4 koncentrációt találtunk a normál sejtekhez képest, míg a LUM/IVA, illetve a TEZ/IVA kezelés egyaránt csökkentette a HE4 szinteket ezen sejtekben. 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 sejttípusban. 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 egy korábbi tanulmánnyal, amelyben a CFTR_{inh172} adását követően emelkedett NF- κ B aktivitást és magasabb IL-8 szintet találtak, míg a FSK/IBMX hatására csökkenő NF- κ B aktivitást mutattak ki az epitheliális sejt kultúrában.

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⁺ sejtenyészeten 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 óra 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. 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.

A p65 nukleáris transzlokáció fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálata során a CF-re jellemző fokozott pro-inflammatórikus 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. 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. Az alkalmazott CFTR modulátorok (LUM/IVA és TEZ/IVA) 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. Az eredmények arra utalnak, hogy a CF-es légúti epithelsejtek gyulladásos állapota direkt módon csökkenthető CFTR modulátorokkal.

A kísérleteinkben alkalmazott NF- κ B inhibitor szignifikánsan csökkentette nem csak az alap, de TNF- α 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 szérum 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 expresszió a CFTR direkt hatása alatt is áll.

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. 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. 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. 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 vizsgált betegcsoportokban bekövetkezett átlagos FEV₁ %-os változást vettük alapul a ROC-görbe analízis során. A HE4 62,7 pmol/L-es „cut-off” érték mellett, jelentős (0,722) AUC értékkel 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 kezelések 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.

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. 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.

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 sejtenyészeten a HE4 expressziójának fokozódása részben a fokozott NF- κ B útvonal aktiválódásának az eredménye, mely részben a CFTR diszfunkció következménye, másrészt direkt módon a CFTR-csatorna abnormális működésének 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.

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 abnormális CFTR funkció a HE4 expressziót direkt módon képes modulálni CF-ben.
3. Külső gyulladásos stimulus, pl. TNF- α az NF- κ 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 (FEV₁ %) és hatékonyan követi a CFTR-specifikus *ivacaftor* gyógyszeres kezelés hatékonyságát.

Tárgyszavak

Biomarker kutatás, bronchoepitheliális sejt, cisztás fibrózis, CFTR, CRP, HE4, gyulladás, légzésfunkció, verejtékklorid



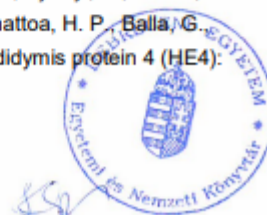
Nyilvántartási szám: DEENK/423/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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.



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.