

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

2952.

PÁKÓ JUDIT ERZSÉBET

Légzőszervi megbetegedések

című program

Programvezető: Dr. Müller Veronika, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Horváth Ildikó, egyetemi tanár

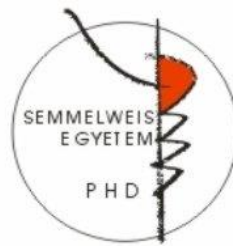
Szolubilis alfa-klotho fehérje vizsgálata
légzőszervi megbetegedésekben

Doktori értekezés

dr. Pákó Judit Erzsébet

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Horváth Ildikó, DSc, igazgató

Hivatalos bírálók:

Dr. Eszes Noémi, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Lőrinczi Lilla, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság:

Dr. Bogos Krisztina, Ph.D., főigazgató

Dr. Krikovszky Dóra, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2023

*„csak ne kutasd, tudni tilos, hogy nekem és neked
mit szántak, mi jövőt isteneink”*

Horatius: Leukonoéhoz

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	7
1.1. Klotho fehérje felfedezése.....	8
1.2. Klotho fehérjecsalád.....	8
1.2.1. β -klotho	8
1.2.2. γ -klotho.....	9
1.2.3. α -klotho	9
1.3. α -klotho élettani hatásai	10
1.3.1. Parakrin funkciók	11
1.3.2. Endokrin funkciók.....	12
1.4. Megváltozott klothoszintek	14
1.4.1. Klotho-többlet	15
1.4.2. Klotho-hiány.....	16
1.5. Öregedés.....	18
1.5.1. Klotho és az öregedés.....	19
1.6. Klotho – vizsgálatok és limitációk	20
1.6.1. Klotho-terápia.....	22
1.6.1.1. Vesebetegségek	22
1.6.1.2. Neurológiai kórképek.....	22
1.6.1.3. Kardiovaszkuláris megbetegedések	23
1.6.1.4. Daganatok.....	23
1.7. Az öregedő tüdő	24
1.7.1. Klotho és a tüdő.....	26
1.7.2. Klotho a légzőszervi megbetegedésekben.....	27
1.7.2.1. COPD	27
1.7.2.2. Tüdőrák	28
1.7.2.3. Obstruktív alvási apnoe.....	31
1.7.2.4. Ok és/vagy okozat?	32
2. Célkitűzések	33
3. Módszerek	35
3.1. Plazmaklotho-koncentráció mérésének módszertana.....	35
3.2. Plazma klotho-koncentráció mérése COPD-ben.....	35

3.2.1.	Alanyok	35
3.2.2.	Statisztikai analízis	37
3.3.	Plazmaklotho-koncentráció mérése tüdőrákban.....	38
3.3.1.	Alanyok	38
3.3.2.	Statisztikai analízis	39
3.4.	Plazma klotho-koncentráció mérése obstruktív alvási apnoe szindrómában	40
3.4.1.	Alanyok	40
3.4.2.	Statisztikai analízis	41
4.	Eredmények.....	42
4.1.	Plazma klotho vizsgálatának módszertani kérdései	42
4.1.1.	A plazmaklotho-szint meghatározásának megbízhatósága	42
4.1.2.	A plazma klotho-koncentráció napok közötti variabilitása COPD-s betegekben.....	42
4.2.	Plazma klotho-szint stabil COPD-ben.....	43
4.2.1.	A plazma klotho koncentrációjának kapcsolata a stabil COPD-s páciensek klinikai paramétereivel	43
4.2.2.	Légzőszervi rehabilitáció hatása a stabil COPD-s páciensek klotho-szintjére	45
4.2.3.	Rehabilitációs válaszkészség előrejelzése	46
4.3.	Plazmaklotho-szint tüdőrákban	46
4.3.1.	Egészségesek és tüdőrákosok klothoszintjének összehasonlítása	46
4.3.2.	Alcsoport-analízisek.....	47
4.4.	Plazmaklotho-szint obstruktív alvási apnoe-ben.....	49
4.4.1.	OSA páciensek klinikai paramétereit	49
4.4.2.	Egészséges és OSA-s páciensek klothoszintje	51
4.4.3.	A plazma klothoszintje és az alvásparaméterek közötti kapcsolat	51
4.4.4.	A plazma klothoszintje és a klinikai paraméterek közötti kapcsolat.....	53
5.	Megbeszélés	54
6.	Következtetés	63
7.	Összefoglalás.....	65
8.	Summary	66
9.	Irodalomjegyzék.....	67
10.	Saját publikációk jegyzéke.....	88
10.1.	Disszertációhoz kapcsolódó közlemények	88
10.2.	Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények	88
11.	Köszönetnyilvánítás	90

Rövidítések jegyzéke

6MWD	6 perces sétatávolság
ACA	adenokarcinóma
ADAM	dezintegrin és metalloproteináz domént tartalmazó fehérje
AHI	apnoe-hypopnoe index
AI	ébredési index
Akt	protein kináz B
ALK	anaplasztikus limfóma kináz
ANOVA	variancia-analízis
BMI	testtömeg-index
BODE	testtömeg-index, obstrukció, diszpnoé, fizikai teljesítőképesség
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CAT	COPD állapotfelmérő kérdőív
CKF	krónikus veseelégtelenség
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség
CPAP	folyamatos pozitív légúti nyomásterápia
CRP	C-reaktív fehérje
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EKG	elektrokardiográfia
ELISA	enzimhez kapcsolt immunoszorbens assay
eNOS	endotheliális nitrogén-monoxid szintáz
ER	endoplazmatikus retikulum
ESS	Epworth Álomosság Skála
FEV1	forszírozott kilégzési volumen első másodpercre eső része
FGF	fibroblaszt növekedési faktor

FGFR	FGF receptor
FOX	forkhead box (villafejű fehérje)
GFR	glomerulus filtrációs ráta
GH	növekedési hormon
GOLD	Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein
HIF	hipoxia indukált faktor
ICAM	intercelluláris adhéziós molekula
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IGFR	inzulinszerű növekedési faktor receptor
IL	interleukin
IPF	idiopátiás tüdőfibrozis
IQR	interquartilis range
IR	inzulin receptor
IRS	inzulin receptor szubsztrát
KL1, KL2	klotho domén
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
minSatO ₂	legalacsonyabb O ₂ -szaturáció
mMRC	módoított Medical Research Council diszpnóe skála
mRNS	messenger RNS
mTOR	emlős rapamycin-célpont
n.a.	nem értelmezhető
n.s.	nem szignifikáns
NF-κB	nukleáris faktor kappa B
NO	nitrogén-monoxid
ODI	O ₂ -deszaturációs index
OSA	obstruktív alvási apnoe

PCR	polimeráz láncreakció
PD1	programozott sejthalál fehérje
PDL1	programozott sejthalál ligand
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
pO ₂	oxigén parciális nyomása a kapillárisokban
PPAR	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
rpm	percenkénti fordulatszám
SCC	kissejtes tüdőrák
SCLC	laphámsejtes tüdőrák
SD	standard deviáció
SOD	szuperoxid dizmutáz
SPT	periódusidő
TGFβ	transzformáló növekedési faktor béta
TNFα	tumor nekrozis faktor alfa
TRFIA	időfelbontású fluoreszcens immunoassay
TRPV	tranziens receptor potenciál csatorna
TST	teljes alvásidő
TST90%	a teljes alvásidő 90% szaturáció alatt töltött aránya
VCAM	vaszkuláris sejtadhéziós molekula
Wnt site)	szárnyatlan típusú integrációs hely (wingless-related integration site)

1. Bevezetés

Klóthó a görög mitológia egyik Moirája (latin nevén Párkája), aki két nővérével a sors fonalát alakítja. Közülük Klóthó az, aki az emberi élet fonalát fonja (1). A mitológia szerint a Moirák hatalma még az istenekénél is nagyobb volt, hiszen az ő sorsuk is a Moirák kezében formálódott. Még Zeusz is kénytelen volt meghajolni a Sors akarata előtt (2).

Mára a klotho fogalma orvostudományi jelentőséggel is kiegészült. Róla kapta ugyanis a nevét egy rendkívül szerteágazó, helyi és szisztémás hatásokkal bíró fehérje, melyet az öregedés folyamatában szerepet játszó kulcsmolekulának tartanak.

A bevezetésben bemutatom a klotho fehérjecsaládot, ezt követően pedig a legjelentősebb tagjára, az alfa-klothora koncentrálnék. Áttekintem a hatásait élettani körülmények között, majd a megváltozott klothokonzentrációkkal kapcsolatos jelenlegi ismereteinket. Ezt követően tárgyalom az öregedés folyamatának kulcsfontosságú tényezőit, illetve azt, hogy a klotho fehérje hogyan avatkozik be ezekbe a folyamatokba. Külön kitérek a tüdő öregedésére, és a klotho ezen mechanizmusokban, illetve a tüdőbetegségekben betöltött szerepére.

Bár az elmúlt 25 év kutatásainak köszönhetően megannyi ismerettel rendelkezünk a klotho fehérjéről, még ennél is több a nyitott kérdés. Ezeket, valamint a klothoval kapcsolatos preklinikai vizsgálatokat mutatja be a bevezetés utolsó fejezete, rámutatva a klinikai vizsgálatok és a terápiás beavatkozások megkezdéséhez vezető út legfőbb kihívásaira.

Bízom abban, hogy a jelen disszertációban bemutatott vizsgálataink - melyek között egyaránt megtalálhatóak módszertani vizsgálatok és légzőszervi betegek körében végzett kutatások - új puzzle-darabokat adnak hozzá a fehérje rendkívül összetett képének majdani megalkotásához.

1.1. Klotho fehérje felfedezése

A klotho gén 1997-ben egy véletlen folytán került felfedezésre. Na⁺/H⁺-antiportereket overexpresszáló transzgenikus hipertóniás egérmódellet létrehozása során a kezelt egerek utódainak egy csoportja váratlanul számos, öregedésre jellemző tünetet mutatott. Visszamaradtak a növekedésben, érelmeszesedés és a légyszövetek kalcifikációja, bőratrófia, gonadális diszplázia, terméketlenség, csonttritkulás, emfizéma, súlyos hiperfoszfatémia alakult ki, valamint az élethosszuk is lerövidült. Míg a vad típus átlagos várható élethossza 2,5-3 év, addig a klotho nullmutáns állat 2 hónap. Szisztémás és szervspecifikus tünetek mellett a szövettani vizsgálatok is alátámasztották a korai öregedés jeleit (3).

Az esetet vizsgálva kiderült, hogy a transzgén inzerciója egy 8 kilobázisos deléció okozott az 5-ös kromoszóma promotor régiójában. Ez a régió egérben a klothonak elnevezett gén lokusza (3).

Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a gén fokozott expressziója a fentiekkel szemben lassítja az öregedés folyamatát, és 20-30%-kal megnöveli az állatok élettartamát (4).

A fenti elváltozások, ma már tudjuk, hogy az alfa-klotho expresszióváltozásának eredményeképpen alakultak ki.

Maga a klotho elnevezés egyaránt utalhat a gén- és a fehérjecsaládra, melyeknek több tagja is van. Így pl. alfa-, béta- és gamma-klotho gén, ill. alfa-, béta- és gamma-klotho fehérje.

A fibroblaszt növekedési faktorok (FGF-ek) jelátvitelére FGF-receptorok (FGFR-ok) útján történik, melyhez klothora van szükség. Ez lényegében azt jelenti, hogy a klothok az FGF-ek kötelező koreceptorai.

1.2. Klotho fehérjecsalád

1.2.1. β -klotho

A β -klotho fehérje legnagyobb mennyiségben a májban és a zsírszövetben termelődik, a sejtmembránban helyezkedik el. Az FGF19 és az FGF21 kötelező koreceptorai, az FGFR1 és 4 receptorokkal képez komplexet (5).

Az FGF21 részt vesz az éhezésben lezajló metabolikus adaptációban, módosítja a zsírszövetben a lipolízist és a glükózfelvételt, serkenti a zsírsejtek glükózfelvételét. Növeli az inzulinérzékenységet, az energiefelhasználást, serkenti a súlycsökkenést. Az FGF19 révén pedig a β -klotho hozzájárul a koleszterin-7- α -hidroxiláznak (CYP7A1), az epesavsztézis sebességmeghatározó enzimének transzkripció gátlásához (5, 6).

Figyelemre méltó, hogy több tüdőráktípusban (laphámrákok 3,4%-ában, adenocarcinomák 1,8%-ában) is megfigyeltek esetlegesen onkogén missense mutációkat (melyeket 15 daganattípus 4440 daganatmintájának vizsgálata alapján azonosítottak) (7).

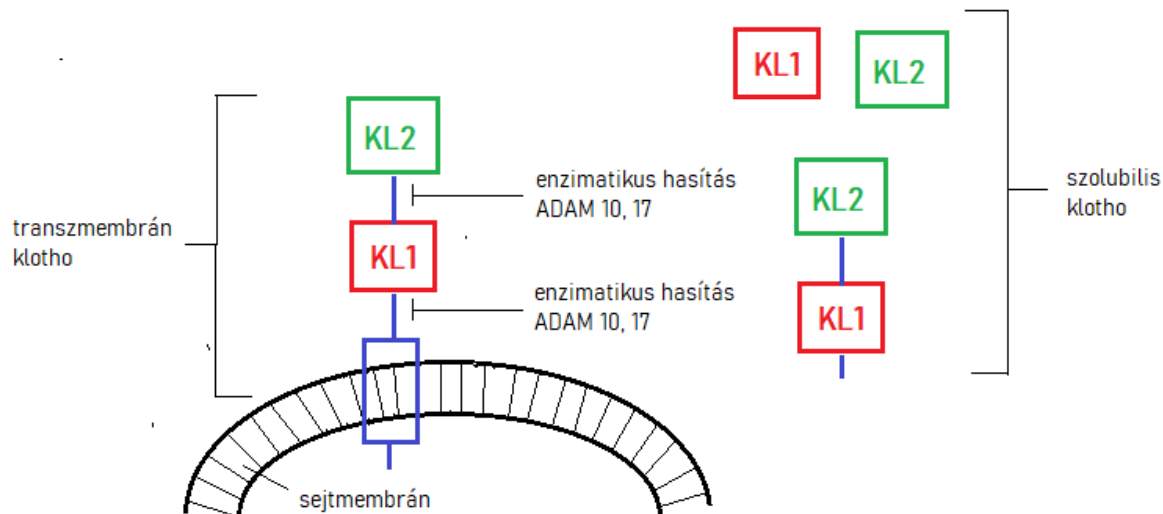
A β -klothonak szekretált, szolubilis formája nem ismert (8).

1.2.2. γ -klotho

A γ -klotho fehérjének kritikus szerepe van a szemlencse szerkezetének kialakításában (9), de egyre több bizonyíték mutat arra, hogy bizonyos daganatok proliferációjában, progressziójában és inváziójában is szerepet játszik (pl. urothelialis húgyhólyagtumorban) (10). Emberi húgyhólyagtumorból vett szövetmintában a magas γ -klotho-expresszió magasabb stádiummal és nyirokinvázióval társul, mint az alacsony expressziójú tumorszövet esetén megfigyelhető (10).

1.2.3. α -klotho

Az α -klotho génje emberben a 13-as kromoszóma q karján, a 13.12 lókuszon helyezkedik el. A klotho génről átíródik egy teljes hosszúságú mRNS, valamint alternatív *splicing* hatására egy ennél rövidebb mRNS jön létre (11). A teljes hosszúságú mRNS egy 3 doménből álló *single-pass* transzmembrán fehérjét kódol. Ez egy transzmembrán doménből és két homológ extracelluláris doménből áll (KL1 és KL2). Ez a membránfehérje több helyen is áteshet enzimátikus hasításon, melyet a dezintegrin és metalloproteinázt tartalmazó fehérjék családjába tartozó ADAM10 és 17 végeznek. A hasítás történhet közvetlenül a membrán fölött, úgy, hogy KL1 és KL2 együtt maradnak, valamint KL1 és KL2 között is (1. ábra). Így jön létre a szolubilis α -klotho, illetve a szolubilis α -klotho fragmentumok (12). A rövidebb mRNS-ről legújabb ismereteink szerint az emberi szervezetben nem történik transláció (13).



1. ábra. Transzmembrán és szolubilis klotho

Az α -klotho gén és az α -klotho fehérje is nagy egyezőséget mutat egérben, patkányban és emberben. Az emberi és az egér fehérje szekvenciája 98%-ban megegyezik (8).

A szolubilis α -klotho fehérje megtalálható a vizeletben (14), vérben, cerebrospinális folyadékban (15). A klotho gén legmagasabb expressziója a vesében, annak is a disztális kanyarulat csatornájában figyelhető meg (16), de expresszálódik a plexus choroideusban, a mellékpajzsmirigyben, placentában, tüdőben, zsírszövetben, hipofízisben stb., és bár kisebb mértékben, de számos más szervben is, mint ahogy a fehérje jelenléte is kimutatható számos szövetben (17).

Ahol külön nem jelezzük, ott a továbbiakban a klotho kifejezés az alfa-klotho fehérjét jelöli.

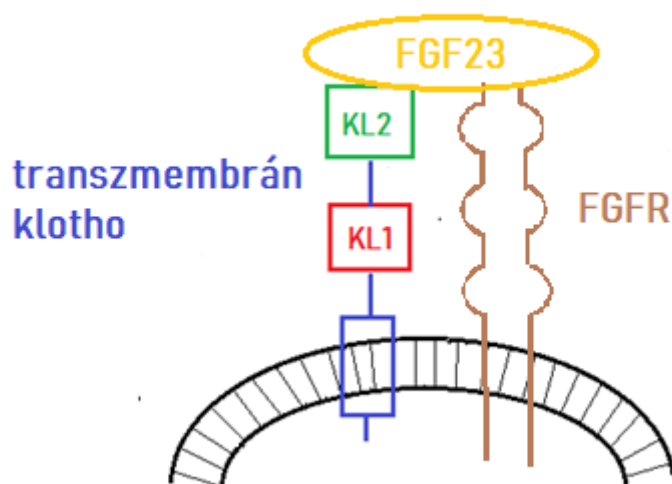
1.3. α -klotho élettani hatásai

A klotho pleiotróp fehérje, közvetlen és közvetett módon befolyásol számos jelátviteli utat, metabolikus folyamatokat szabályoz. Hatásmechanizmusa szerteágazó, autokrin, parakrin és endokrin hatásait is azonosították. A szisztémás hatások döntően a vérkeringésben jelen lévő szolubilis klothonak köszönhetőek, míg a helyi hatásokért a transzmembrán klotho felel (18).

A klotho alapvetően befolyásolja a foszfát- és kalciumháztartást, de hatással van az ásványianyag-háztartásra, metabolikus jelátviteli utakra (19), fenntartja az endothel épségét és funkcióját (20), gátolja a sejtek öregedését és apoptózisát, megőrzi az őssejteket (21) és csökkenti az oxidatív stresszt (22).

1.3.1. Parakrin funkciók

A transzmembrán klotho az FGF23, egy csonteredetű növekedési faktor kötelező koreceptora. A klotho több FGF receptorral (FGFR1c, FGFR3c, FGFR4c) komplexet képez, ezzel magas affinitású kötőhelyet létrehozva az FGF23-nak (2. ábra) (23).



2.ábra. Klotho/FGFR/FGF23 komplex

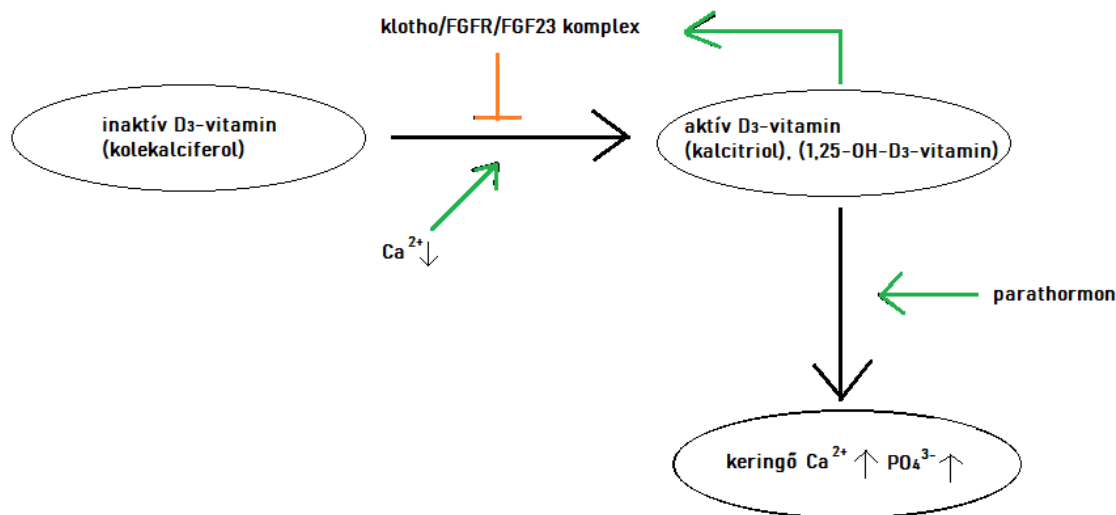
A klotho/FGF23/FGFR komplexek több kolekalciferolt (inaktív D₃-vitamin) metabolizáló enzimet is csendesítenek (downregulálnak), ezáltal csökkentik az aktív D₃-vitamin szintet. Az aktív D₃-vitamin növeli a keringő kalcium és foszfát koncentrációját, így érthető módon a klotho csökkenti azokat. A D₃-vitamin és a klotho, illetve az FGF23 negatív visszacsatolási kört alkot. A D₃-vitamin serkenti a klotho és FGF23-expressziót, melyek a fentieknek megfelelően csökkentik a D₃-vitamin szintjét (3. ábra) (24).

A klotho/FGF23-jelátvitel megelőzi a hiperfoszfátémia által elősegített, D₃-vitamin indukálta apoptotikus sejtkárosodást (25). A klotho, az FGF23 és a D₃-vitamin közötti kölcsönhatás a parathormon szintézisét is befolyásolja (26).

A komplexek csendesítik a vese II-es típusú Na⁺-P_(i) kotranszportját, csökkentik a foszfát reabszorpcióját, tehát fokozzák a vese foszfát kiválasztását, tovább csökkentve a keringő foszfát szintjét (27).

Deglikozilálják és stabilizálják továbbá a vese disztális kanyarulat csatornái epithel sejtjeinek membránján található tranziens receptor potenciál csatornákat (TRPV5),

ezáltal serkentik a Ca^{2+} -reabszorpciót, az előzőekkel ellentétben ezzel növelve a kalciumszintet (28).



3.ábra. Klotho hatása a D₃-vitamin szintézisére

(az ábrán a zöld nyíl a serkentő hatást, a narancssárga jel a gátló hatást jelöli)

1.3.2. Endokrin funkciók

A szolubilis klotho számos membránsatornát, transzportereket, intracelluláris jelátviteli utakat modulál: szupresszálja az inzulin/IGF-1 (4), a Wnt/ β -katenin (29) és a p53/p21 jelátviteli utakat (30), modulálja a cAMP-jelátvitelt (31), a TGF β -jelátvitelt (32), iontranszportot befolyásol (19), hat a renin-angiotenzin rendszerre (33). Csökkenti az oxidatív stresszt, gyulladáscsökkentő hatású (34). Az erekben serkenti a NO-termelést (35), szerepet játszik a kalcium-egyensúly fenntartásában (19). Ezen hatások kiváltásában közreműködő receptorok jelenleg még nem ismertek.

Antioxidáns hatás

Az inzulin receptor (IR) és az IGFR gátlása megelőzi a FOX fehérjék foszforilációját, így azok képesek bejutni a sejtmagba és antioxidáns enzimek promotor régiójához kötődni. Ez például a kataláz és a szuperoxid-dizmutáz enzimek (SOD) transzkripciójához és

felülszabályozásához (upregulálásához) vezet. A cAMP jelátvitel felülszabályozása szintén a SOD emelkedéséhez vezet. A klotho tehát véd az oxidatív stressztől, elsősorban az antioxidáns fehérjék kifejeződésének serkentése révén (22).

Gyulladáscsökkentő hatás

A klotho felfüggeszti számos sejtadhéziós molekula (pl. ICAM-1, VCAM-1) expresszióját, blokkolja az NF- κ B aktivitását, valamint a TNF- α indukált monocita adhéziót (36). A retinsav-indukálható gén I gyulladáscitokinek (pl. IL-6, IL-8) termelődését szabályozza, és a klotho képes ezt gátolni, ezzel csökkentve a gyulladáscitokinek termelődését (37).

Szív- és érrendszeri védő hatás

A klotho érrendszert védő hatása egyrészt a molekuláris hatásoknak köszönhető: antioxidáns, gyulladásellenes és antiapoptotikus; másrészt az érfalra kifejtett hatásoknak: kalcifikáció csökkentése, érfali simaizomsejtek proliferációjának gátlása, foszfát-felvétel csökkentése, média hipertrófia megelőzése, endothel diszfunkció csökkentése, perivaszkuláris fibrózis megelőzése (38). A cAMP-jelátvitel serkentése az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) expresszió fokozódását eredményezi, a NO-termelést növeli. Ez segíti az érfal relaxációját, vazodilatációt eredményez (31).

Antialdoszteron hatás

A CYP11B2 az aldoszteron-szintézis sebességmeghatározó enzime, a klotho pedig a mellékvese sejtjeinek CYP11B2 expresszióját szabályozza. A klotho gén elcsendesítése felülszabályozza, túltermelése csendesíti a CYP11B2 expresszióját. A klotho tehát csökkenti az aldoszteron-termelést (39).

Tumorszuppresszív hatás

Elsődlegesen a tumorprogresszióban szerepet játszó IGF-1 (4), Wnt/ β -katenin (29) és TGF- β (32) jelátviteli utak gátlásának köszönhető a klotho tumorsuppresszív hatása, de szabályozza a daganatképződésben szerepet játszó PI3K/Akt jelátvitelt (40) és a stanniocalcin-1-et is (41). Proapoptotikus jeleket aktivál. Csökken a tumor növekedése, migrációja, inváziója és a sejtproliferáció, illetve a fehérjeszintézis (42). A foszfáttérhelés, a magasabb foszfátkoncentráció növeli több daganatos megbetegedés

kockázatát, mely összefüggésben áll azzal, hogy a daganatsejteken több foszfát kotranszporter fejeződik ki és több foszfátot raktároznak, mint a normál sejtek (43). A foszfátszint csökkenése is szerepet játszik tehát a protektív mechanizmusban.

Öregedésgátló hatás

Az öregedés endokrin gátlását az 1.5.1. fejezet részletezi.

1.4. Megváltozott klothoszintek

Az első adataink a humán szolubilis klotho koncentrációjáról az ELISA kitek kifejlesztéséhez köthetőek. Egészséges gyermekek szérumklotho-koncentrációja szignifikánsan magasabb (952 ± 282 pg/ml), mint az egészséges felnőtteké (562 ± 146 pg/ml) (44).

Idős (65 év feletti) lakosság körében végzett vizsgálatban a legalacsonyabb harmadba tartozó plazmaklotho-értékekhez (<575 pg/ml) nagyobb halálozási kockázat társult, mint a felső harmadba tartozókhoz (>763 pg/ml) (45).

Rágcsálókön és emberen végzett vizsgálatok is elemezték a kapcsolatot a klotho és a fizikai állóképesség különböző paraméterei között. Arra következtettek, hogy a vázizom kontraktilis aktivitása növeli a keringő klotho szintjét, és ez a szabályozás szerepet játszhat a mozgás jól ismert szisztémás öregedésgátló hatásában (46, 47).

A kéz szorítóereje a teljes test izomerejét jellemzi és a halálozás prediktora (48, 49, 50). A plazma klothokonzentrációja és a kéz szorítóereje között kapcsolat mutatható ki (51). Magasabb plazmaklotho-értékek esetén a térdnyújtó erő is magasabb (52), illetve COPD-s páciensek klotho szintje korrelál a quadriceps izom erejével (53).

Egészséges felnőttek és edzett atléták klotho szintjeinek összehasonlításakor megfigyelhető, hogy az atléták körében szignifikánsan magasabb a plazma klotho koncentráció (3375 ± 1480 pg/ml), mint a nem sportolók körében (1390 ± 430 pg/ml) (54).

Klothohiány miatt alulfejlett egerek esetében a futásteljesítmény és az elülső végtagok szorítóereje is jelentősen csökkent a vad típushoz és a klotho-túlexpresszázó egérhez képest (55).

Avin és munkatársai vizsgálata megállapította, hogy az akut fizikai terhelés nem változtat a szolibilis klotho koncentrációján, ellenben, amikor ugyanazok a páciensek egy hosszú tréningprogramot követően végezték el ugyanazt az akut fizikai terhelést, az már szignifikáns klothoemelkedéshez vezetett (46). Három hónapos közepesen intenzív aerob mozgásprogramot követően a plazmaklotho-koncentráció növekedését mutatták ki (414 ± 28 vs. 453 ± 36 pg/ml) egészséges posztmenopauzális nők esetében (5).

A klothoszintet a tápláltsági állapot is befolyásolja. Szignifikánsan alacsonyabb plazmaklotho-koncentráció mérhető anorexia nervosában szenvedő ($764,64 \pm 65,4$ pg/ml) és elhízott páciensek esetében is ($847,09 \pm 111,3$ pg/ml), mint a kontrollcsoportban ($1391,62 \pm 144,9$ pg/ml) (57). A krónikus pszichés stressz is csökkenti a fehérje koncentrációját ($836 \pm 327,7$ pg/ml vs. $949 \pm 311,8$ pg/ml) (58). További, emelkedett szisztémás stresszel járó állapotokban is alacsonyabb klothokoncentráció figyelhető meg (pl. 1-es típusú diabetes mellitus) ($2041,9 \pm 1017,6$ pg/ml vs. $2790,3 \pm 1423,9$ pg/ml) (59).

1.4.1. Klotho-többlet

Az egyetlen olyan kórkép, melyben konzekvensen kiugró klotho értékek detektálhatók: az akromegália (60). Az akromegáliát az esetek döntő többségében növekedéshormon-termelő hipofízisadenóma okozza, tehát emelkedett növekedési hormon (GH) szintek jellemzik, következményes IGF-1 emelkedéssel. Az IGF-1 szint áll a betegség aktivitásával a legszorosabb kapcsolatban. Akromegáliában szenvedő páciensek szolibilis klothokoncentrációja extrém magas, az átlagos érték kb. 10-szerese, majd kezelést követően visszatér az átlagos tartományba (4217 (1812-6623) pg/ml vs. 645 (550-1503) pg/ml, medián (IQR)) (61). Amennyiben a betegség kiújul, a klothoszint ismét megemelkedik, hasonlóan az IGF-1-hez. A klothokoncentráció pozitívan korrelál az IGF-1 expressziójával (62). A megemelkedett klothokoncentráció oka lehet például a vese FGF-23 rezisztenciája vagy a membránklotho GH-mediálta enzimatikus hasítása is, ami önmagában is magyarázhatja az FGF23-rezisztenciát (60).

Bár lényegesen kisebb mértékben, de egyes daganatokban, mint például petefészekdaganatban is emelkedett a klothokoncentráció (63). Negatív korreláció áll fenn a klotho és a tumorméret, ill. stádium között, valamint a szöveti és a keringő klothoszintek szignifikánsan korrelálnak és összefüggenek a túléléssel (64). Több

daganatos megbetegedésben a magasabb klothoexpressziót vagy -aktivitást kedvezőbb kimenetellel társítják (65,66).

A magasabb klothoszint csökkent szív- és érrendszeri kockázathoz (67), diabéteszes páciensek esetén csökkent makrovaszkuláris kockázathoz (68) és jobb fizikai teljesítőképességhez (pl. nagyobb szorítóerő) (50) társul.

1.4.2. Klotho-hiány

Krónikus veseelégtelenség (CKF) csökkent klothotermeléssel jár, ami hozzájárulhat a CKF-re jellemző degeneratív elváltozások (pl. érlemezésedés, csontritkulás, bőratrófia) és társuló kórképek (pl. hipertónia) kialakulásához. Klotho génkiütött egerek esetében a veseproblémákkal együtt ektópiás kalcifikáció, hiperfoszfátémia és magas FGF23-szint figyelhető meg (69). Mídhárom lelet jellemző krónikus veseelégtelenségben, így feltételezhető, hogy a krónikus veseelégtelenség egy klotho-hiányos állapot (70), ahogy ezt a vizelet klothokoncentrációja is jelzi (71).

CKF-ben az aldosteron szintje korrelál a betegség súlyosságával, és fordított korreláció áll fenn a szolubilis klotho koncentrációjával. A vesekárosodáshoz társuló klotho-hiány együtt járhat a plazma aldosteron felülszabályozásával (72). Ugyanígy a klotho-hiány mellett kialakuló spontán hipertónia és vesekárosodás részben a CYP11B2 enzim expressziójának és az aldosteron-szintézis növelésének tudható be. Az aldosteron hatásainak felfüggesztése képes visszafordítani a klotho-hiány mellett megjelenő hipertóniát, valamint csökkenteni a vesekárosodás mértékét (39).

Figyelemre méltó, hogy a klothokoncentráció csökkent renovaszkuláris hipertóniában és esszenciális hipertóniában, GFR-re korrigálva is (73).

Alacsonyabb klothokoncentrációhoz magasabb szív- és érrendszeri megbetegedési kockázat társul (74). Szívkoszorúér-beteg páciensek plazmaklotho-szintje alacsonyabb, mint ahogy az érfalban alacsonyabb a klotho-mRNS expressziója is (75). Egy klotho génpolimorfizmus (KL-VS) kapcsolatba hozható szív- és érrendszeri kockázati tényezőkkel, mint alacsony HDL, magas szisztolés vérnyomás. Homozigóta KL-VS társul a legmagasabb vaszkuláris eseményekre és relatív halálózásra vonatkozó kockázattal (76).

Klotho heterozigóta egerekben csökkent aorta és arterioláris vazodilatáció figyelhető meg az endothelsejtek csökkent NO-termelése miatt (35). Homozigóta mutáns egerek esetében az érújdonképződés (NO-dependens) folyamata is sérül (77).

A klotho-hiányos egerek FGF23-szintje emelkedett, parathormon-szintje csökkent és D₃-hipervitaminózisuk van. Ez hiperfoszfatémiához vezet, a vese erőteljesebb kalcifikációjához, és előidézi a korai öregedési jelleget (77). A hiperkalcémia oka vélhetően a magas D₃-vitaminszint által előidézett, bélrendszerben és vesében történő Ca²⁺-abszorpció. Egérben az FGF23, valamint a klotho gén kiütése ugyanazokkal a következményekkel jár: magas szérumfoszfát-szint, érlemeszesedés, lágyszöveti és vaszkuláris kalcifikáció, az endothel működési zavara jellemzi (78). Megnö a vese Na⁺-P_(i) kotranszporterének, illetve az 1-alfa-hidroxiázinnak az expressziója, ami önmagában is magasabb D₃-vitamin szinteket eredményez. A D₃-vitamin receptorának kiütése véd a fenti hatásoktól, mely arra enged következtetni, hogy ezek a változások nagyban függenek a D₃-vitamintól (79).

A csontképződés lassul, valamint fokozott csontfelszívódás figyelhető meg, melyek együttesen oszteopéniához vezetnek (80).

A klotho gén csendesítése figyelhető meg daganatos megbetegedések esetén, pl. vesesejtes karcinómában (81) és hepatocelluláris karcinómában (82). Ezzel összhangban vesedaganat esetén alacsonyabb klothokoncentráció mérhető az egészségesekhez képest, és még további csökkenés figyelhető meg metasztatizált daganat esetében (83).

A klotho a GH/IGF-1 tengely megváltoztatásával közvetlenül képes szabályozni a növekedési hormon (GH) szekrécióját. A klotho-hiány a GH/IGF-1 tengelyhez kapcsolódó növekedési rendellenességekkel jár (84).

Gyulladásos állapotok (85), megemelkedett oxidatív stressz (86), illetve magas aldosteron-szint csökkentik a klotho expresszióját (33).

1.5. Öregedés

Annak ellenére, hogy milyen jelentős ütemben nő az időskorú populáció nagysága, az öregedés folyamatát akár sejt-, szerv- vagy a teljes szervezet szintjén mégsem ismerjük kellőképpen. Az öregedés molekuláris változások sorozata, melyek a szövetek, szervek, az egész szervezet működésének fokozódó elégtelenségéhez vezetnek, ezzel növelve a környezeti hatásokkal szembeni sérülékenységet, a megbetegedések és a halál beálltának valószínűségét. Az öregedés számos sejtípust érint valamekkora mértékben, és változó hatással van a szervezetre.

Az öregedés folyamatát az orvostudomány hajlamos szervekre koncentrálni és megítélni. A klotho fehérje szerteágazó hatásmechanizmusa sokat segít abban, hogy holisztikusan, a szervezet egésze szintjén szemléljük a jelenséget.

Az öregedés jelei, ún. „*hallmarkjai*” a genomikai instabilitás, a telomér rövidülés, epigenetikai módosulások, a proteosztázis megszűnése, a tápanyagok érzékelésének zavara, a mitokondriális diszfunkció, a sejtöregedés, a megváltozott intercelluláris kommunikáció és az őssejtek kimerülése (87). Mivel ezek a folyamatok egymással kölcsönhatásban állnak, így már egyetlen ponton történő beavatkozás is képes pozitívan hatni a megromlott funkciókra.

A genomikai instabilitás és a DNS-helyreállítás zavara miatt a genetikai károsodások idővel felgyülemlelnek (88). A telomervédő szekvenciák elvesztése csökkenti a sejtek proliferációs képességét, ezzel járul hozzá a sejtöregedéshez (89). A sejtöregedés magában foglalja a sejtciklus megállását és az öregedés-mediálta jelátvitelt. Ezek a folyamatok megelőzik a károsodott sejtek szaporodását (90). Az őssejtek kimerülését a folytonos és ismétlődő sérülések idézik elő (87). A sejtek közötti kommunikáció megváltozását elsősorban az immunválasz módosulása, az *inflammaging* jelensége idézi elő. Ez azt jelenti, hogy az immunrendszer immunológiai fenyegetettség hiányában is aktivitást mutat, megemelkedik például a gyulladásos citokinek (IL-1 β , IL-6, TNF- α) mennyisége (91).

A fehérjék és sejtalkotók minőségellenőrzésében döntő szerepet játszó proteosztázis csökkenése, majd elvesztése az öregedés egy korai molekuláris eseménye (87). Az autofágia, az önmérsztés programozott folyamata kulcsfontosságú a proteosztázis fenntartásában. Ennek során a hibás térszerkezetű és öregedő fehérjék, károsodott és más

abnormális sejtalkotók megsemmisítésére kerül sor a lizoszómákban (87). Az autofágiát a szervezet az IGF1/Akt/mTOR jelátviteli úton keresztül szabályozza. Az Akt foszforilálja a mTOR-t, egy szerin/treonin protein kinázt, mely gátolja az autofágiát, míg értelemszerűen a PI3K/Akt jelátvitel gátlása serkenti azt (92). A túlzott autofágia azonban szintén kóroki tényező (87).

Az IGF1/Akt/mTOR tengely felelős a tápanyagellátottság és a sejtnövekedés közötti kapcsolat megteremtéséért is. Tápanyaghiány esetén ez a növekedési tengely szupresszálódik, a sejtek élettartama megnő (87). A tengely szupresszálása megakadályozza a FOXO transzkripciós faktorok aktivációját is, ami központi szerepet játszik a metabolizmus, stresszrezisztencia, sejtciklus progresszió és a programozott sejthalál szabályozásában. A FOXO a protektív autofágiában is szerepet játszik (93).

A Wnt/ β -katenin jelátvitel az őssejtproliferációban és őssejtfenntartásban játszik kulcsszerepet. A Wnt aktivációja hozzájárul az őssejtek kimerüléséhez és fogyáshoz, a gyorsuló sejtöregedéshez (94).

1.5.1. Klotho és az öregedés

Sejtöregedés

Az inzulin/IGF1 jelátvitel depressziója az öregedés lassításának evolúciósan konzervált mechanizmusa (95). A klotho az öregedésgátló hatását elsődlegesen az inzulin receptor szubsztrát (IRS)/IGF-1 receptor (IGF-1R) jelátvitel gátlásával feje ki, mellyel csökkenti az inzulin/IGF-1 hatását (4).

A klotho lassítani képes a sejtek öregedését azáltal is, hogy gátolja a p53 mediálta sejtciklus megállást. A p53 a ciklin dependens kináz inhibitorok, mint amilyen a p16 és a p21 is, aktiválásán keresztül megállítja a sejtciklust G1 és S fázis között. Ezt képes gátolni a klotho (96).

Intercelluláris kommunikáció

Az IL-6 és IL-8 gyulladáscsökkentő citokinek termelődését a retinsav-indukálható gén I gátlásán keresztül csökkenti a klotho (37).

Őssejtek kimerülése

A klotho képes gátolni a Wnt/ β -katenin jelátviteli utat a Wnt-hez való kötődéssel, valamint a β -katenin degradálásával is (97). A Wnt jelátvitel meghosszabbítja a sejtciklust, ezzel hozzájárul az őssejtek kimerüléséhez és fogyáshoz (98). Ennek az

útvonalnak a gátlásával a klotho értelemszerűen az őssejtek további fennmaradásához járul hozzá.

A fentiek alapján könnyen érthető tehát, hogy egérben a fokozott klotho expresszió egyaránt növeli az egészségben eltöltött életidőt és az élettartamot (4), valamint humán vizsgálatokban is a magasabb klotho szintek jobb egészségi állapothoz és hosszabb élettartamhoz kapcsolódnak (45).

1.6. Klotho – vizsgálatok és limitációk

A fentiek jól mutatják, hogy a klotho számos, az öregedéshez hozzájáruló jelátviteli útra hatással van, így több életkorhoz kötött megbetegedésben potenciális terápiás célpontnak tekinthető.

A klotho szervezetbe juttatására több lehetőség is rendelkezésre áll (pl. adenovírus, rekombináns klotho fehérje, génterápia) (99, 100, 101) de lehetőség van a metiláció gátlásával csökkenteni a klotho-veszteséget, illetve léteznek olyan kismolekulák, melyek serkentik a klotho-mRNS és -fehérje expressziót (102). Utóbbiak azért lényegesek, mert az exogén klotho nem jut át a vér-agy gáton, közvetlenül az agyba pedig nem juttatható a molekula, pedig neurológiai folyamatok (akár neurodegeneratív kórképek, akár neurológiai daganatok) kezelésében ez szükséges lenne (102).

Több biotechnológiai start-up cég alakult a különböző stratégiák alkalmazására a potenciális indikációkban – pl. krónikus veseelégtelenség, kognitív funkciózavarok, daganatos megbetegedések, kardiovaszkuláris kórképek. Intenzív kutatás zajlik annak érdekében, hogy kirajzolódjon a klotho pontos szerepe ezeknek a kórállapotoknak a megjelenésében és progressziójában.

A fehérjével kapcsolatos legtöbb információnk klothohiányos vagy klothot overexpresszáló sejtvonalak vizsgálatából és állatkísérletekből származik. Az egyes hatásokra, hatásmechanizmusokra az ezek során megfigyelhető tünetekből következtetünk.

Az elmúlt 25 év egyre növekvő számú és mélységű alapkutatási eredményei ellenére számos nyitott kérdés maradt, melyekre választ kell adnunk, mielőtt klotho-alapú diagnosztikus és terápiás eljárások hatékonyságának vizsgálatára sor kerülhet.

Nem ismert, hogy az emberi szervezetben mely életkorban milyen klotho koncentráció lenne elégséges és kívánatos, illetve, hogy az ennél alacsonyabb vagy magasabb értékek élő szervezetben milyen következményekkel járnak. Mely értékeknél beszélhetünk/beszélhetünk-e egyáltalán az egyes szervek vagy a szervezet egészének funkciózavaráról. Van-e terápiás hatása vagy toxikus következménye az optimálisnak tartott szint fölötti klotho koncentrációknak. Retinitis pigmentosa-ban például magas klothokonzentráció figyelhető meg (103), illetve kiugróan magas klothoszintek mellett angolkór és hiperparatireózis léphet fel (104). Így a dozírozásnál erre is figyelemmel kell lenni. Az időzítés is körültekintést igényel, ugyanis eltérő hatást fejt ki attól függően is, hogy egy szervsérülést követően hány napon belül kerül beadásra (105).

Ugyanígy a beavatkozásból potenciálisan leginkább profitáló betegcsoport kiválasztása is további ismereteket igényel, ahogy azt is külön kell választani, hogy profilaktikus kezelés tervezendő-e magas kockázatú páciensek számára, vagy már kialakult betegség terápiája a kívánt cél.

A klotho szerteágazó hatását ismerve még számos további molekuláris szintű ismeretre van szükség a hatásmechanizmusok azonosítására. Akár a megelőzés, akár a terápia számos genetikai útvonal felboroulásával járhat. Tisztázásra vár még a különböző klotho izoformák aránya és szerepe fiziológiás és patológiás állapotokban, valamint az FGF23-független hatások során a klotho receptora sem ismert. A receptor ismeretének hiánya egyben azt is jelenti, hogy jelenleg még nem érdemes olyan molekulákat fejleszteni, melyek csak utánozzák a klotho hatását.

Akár az egyes izoformák, akár a teljes klotho koncentráció kapcsán eltérő populációkra vonatkozó adatokra is szükség lesz. Mélyebb ismeretekre van szükség a fehérje stabilitásával kapcsolatban, illetve standardizálni szükséges a mintavételi és -tárolási technikákat is.

A jelenleg rendelkezésünkre álló vizsgálati technikák (enzimkapcsolt immunoszorbens assay (ELISA), time-resolved fluoreszcens immunoassay (TRFIA), immunprecipitáció-immunoblot) eredményei nem összehasonlíthatóak egymással (106). Egyes kereskedelmi forgalomban lévő próbáknál az sem ismert, hogy a KL1-KL2 és/vagy a KL1 izoformát

detektálják. Nem rendelkezünk továbbá olyan funkcionális próbával, mely a klotho aktivitását tudná mérni (107).

A klotho szerteágazó hatása felveti a genetikai meghatározottság lehetőségét is, azonban nem rendelkezünk információval az öröklődés és a környezeti tényezők szerepével, klotho koncentrációra vonatkozó jelentőségével kapcsolatban.

A fenti limitációk ellenére több területen is megkezdődött a terápiás alkalmazások vizsgálata állatkísérletes modelleken. Ezek eredményeiből is sok következtetést tehetünk a még hiányzó ismereteinkkel kapcsolatban.

1.6.1. Klotho-terápia

1.6.1.1. Vesebetegségek

Tekintettel arra, hogy a klotho legnagyobb mértékben a vesében expresszálódik, a legtöbb vizsgálat a vesére, azon belül is a krónikus veseelégtelenségre fókuszál.

Kísérletes akut vesekárosodást követően egérben a klotho overexpresszió csökkenti a vesekárosodást, jobb helyreállítást és vesefunkciót eredményez (108).

Krónikus veseelégtelenségben szenvedő, klotho overexpresszáló egerekben csökken a vaszkuláris kalcifikáció mértéke, jobb vesefunkcióval és megemelkedett foszfaturiával társul a CKF-es vad típushoz képest (109). CKF-es egérmodellben klotho injekció csökkenti a vese- és a szívkárosodás mértékét (110).

Obstruktív nefropátiás egérmodellen egy nappal az uréter obstrukcióját megelőzően vagy 3 nappal utána, plazmid segítségével bejuttatva az exogén klothot, mindkét esetben, azaz a preventív és a terápiás modellben is csökkent a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer elemeinek szintje (111). Maradék vese esetén bejuttatott exogén klotho csökkenti a fibrotikus léziók kialakulását, javítja a vesefunkciót – csökkenti a szérum kreatinin koncentrációját (111).

Diabéteszes egérmodellekben is javította az exogén klotho a vese működését, valamint a renális ischemia-reperfúziós károsodástól is védett (112).

1.6.1.2. Neurológiai kórképek

Az olyan neurodegeneratív kórképek, mint az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór, illetve a demencia tünetegyüttese leginkább időskorban fordulnak elő. Mivel a klotho az agyban

is nagymértékben expresszálódik (113), az agyi funkciókra kifejtett közvetlen hatását is vizsgálták. A klotho overexpresszió feltételezhetően neuroprotektív az agy öregedésével szemben, és neurodegeneratív állapotokkal szemben (4).

Egérben a klotho overexpressziója javítja a kognitív funkciókat, már egyszeri klotho injekció is szignifikáns javulást eredményez a munkamemóriában és a térbeli memóriában (114).

UBX2089 néven fejlesztési fázisban van egy α -klotho terápia neurológiai és pszichiátriai zavarokhoz társuló kognitív diszfunkciók kezelésére (115).

1.6.1.3. Kardiovaszkuláris megbetegedések

A klotho jelentős szerepet játszik a vaszkuláris homeosztázis fenntartásában, így a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásában (pl. hipertónia, érlemeszesedés, szívizom-hipertrófia stb.) (74). In vitro és in vivo vizsgálatok is alátámasztják, hogy a klotho overexpressziója javítja a kardiovaszkuláris státuszt (75, 116, 117). A klotho antioxidáns és antiapoptotikus hatásai felvetették az ischemiás sérülések terápiájának lehetőségét is (118).

A klotho adminisztrációja vaszkuloprotektív hatásokkal jár. Rágcsáló-vizsgálatokban csökkentette az aorta kalcifikációt, javította a CKF-et (119). Spontán hipertóniában szenvedő állatokban a klotho-termelés növelése megállította a vérnyomás emelkedését (120), ateroszklerotikus állatmodellben pedig a klotho-termelés növelése csökkentette a megemelkedett vérnyomást és meggátolta a media hipertrófia kialakulását (121).

1.6.1.4. Daganatok

A klotho overexpressziója több daganattípusban is csökkenti a daganatos szövet életképességét: tüdőrák sejtvonalakban például tumorproliferációt gátol (122), illetve áttétképzést csökkent és érzékenyít kemoterápiás szerekre (123). Preklinikai tumormodellekben (pl. gyomorrák, hasnyálmirigyrák, vastagbélrák, mellrák) akár in vitro, akár állatkísérletes modellekben, a klotho overexpressziója vagy klotho injekció csökkenti a daganat térfogatát, lassítja a növekedését (124, 125, 126).

Exogén klotho szignifikánsan javítja a túlélést daganatsejtekkel transzplantált állatokban, valamint csökkenti a metasztatikus léziók számát (127).

1.7. Az öregedő tüdő

A tüdő a külső környezetnek rendkívüli módon kitett szervünk. Az örökletes tényezők és epigenetikai változások befolyásolják az egyensúlyt a környezeti stresszorokkal szemben védő repair mechanizmusok és a krónikus tüdőbetegségek kialakulása között. Annak a megértése, hogy ezek az adaptív mechanizmusok hogyan és miért merülnek ki vagy válnak túlterheltté, nagyban segítené az öregedéssel járó megbetegedések megismerését. A stresszorokra adott válasz módosulása eredményezhet csökkent reakciót: a behatást követően nem történik teljes helyreállítás, vagy túlzott reakciót: rendellenes sejtaktiváció, fibrotikus hegesedés, tüdőremodelling (128).

A tüdő fiziológiás öregedése egészséges idősokban egy a COPD I-es stádiumához hasonló légzésfunkció-csökkenéshez vezet (129). Ez számos anatómiai és élettani változásra vezethető vissza, melyek emfizémaszerű strukturális változásokat idéznek elő a tüdőben. Ez a „senilis emfizéma” a ductus alveolarisok megnagyobbodásával jár, az alveolusfal destrukciója nélkül, tehát különbözik a COPD-s betegek tüdejétől. Ugyanez rágcsőknél is megfigyelhető, ahogy a legtöbb korai öregedést modellező egérben is (130).

Az idő előrehaladtával megváltozik a légzőhám, a tüdő progenitor sejtjei, az immunsejtek, illetve az interstitium összetétele és funkciója. Az öregedést az alveoláris felszín fokozatos csökkenése, a légutak dilatációja, a mucociliaris clearance, valamint az elaszticitás csökkenése jellemzi (131).

A légúti és alveoláris *légzőhám* sejtjei jelentik az első védvonalat a környezet és a szövetek között. Pusztán az életkor előrehaladtával, tehát betegség fennállása nélkül is csökken a mukociliáris clearance a felső és az alsó légutakban (128), valamint telomer rövidülés figyelhető meg a sejtekben (132). A *progenitor sejtek* funkcionális kapacitása határozza meg a légzőrendszer repair, regeneráló és remodelláló képességét. A progenitor sejtek mennyisége és minősége is romlik az életkor előrehaladtával. Csökken a bazális sejtek száma és proliferációs képessége, valamint a Club sejtek száma, önmegújító és differenciációs képessége - megnövekedett apoptózis mellett - valamint a 2-es típusú alveoláris sejtek megújulási és differenciálódási képessége (133). Az *őssejtek* életkorhoz kapcsolódó kimerülésének egyik fő oka az oxidatív stressz lehet. *Immunsejtek*: A légzőrendszer kritikus immunológiai határfelület, melynek magasan szabályozott választ kell adnia a folyamatos környezeti kihívásokra. A tüdő immun homeosztázisát fenntartó

komplex hálózatot az epithel sejtek, illetve a helyi és rekrutált immunsejtek jelentik (134). *Interstícium:* Az extracelluláris mátrix komponenseinek változása az életkor előrehaladtával kritikus, mert az elasztikus tulajdonságokban bekövetkező változások meghatározzák a tüdőfunkció romlását. Az interstícium épsége elengedhetetlen a gázcsere fenntartásához, az itt található fehérjék bioaktív molekulákat kötnek az extracelluláris térben, rezervoárt képezve ezzel növekedési faktoroknak, citokineknek és metabolitoknak. A fibroblasztok szintén fontos elemei az interstíciumnak, öregedésük felelős a pulmonális remodellingért, az öregedéssel összefüggésben kialakuló tüdőfibrozisért. Az ECM fehérjéinek megváltozott expressziója miatt a tüdő elveszti elaszticitását és tömörebbé válik (133).

Az öregedő epithelsejtek mitokondriális diszfunkció jeleit mutatják, illetve a hipoxémiára adott válasz szabályozásában részt vevő jelátviteli utak is felborulnak (HIF, MAPK, mTOR) (133).

A szirtuinok metabolikus szenzorként vesznek részt az öregedésben (135). A SIRT1 helyreállítása gátolja a korai sejtöregedést a tüdőben FOXO3-függő módon, ami véd a dohányzás-indukálta emfizematózus változásoktól, ami a SIRT1/FOXO3 tengelyt potenciális farmakológiai célponttá emeli (136).

A Wnt jelátvitel zavarát számos öregedéssel összefüggő krónikus tüdőbetegségben azonosították (29).

Az antioxidáns kapacitás az idő előrehaladtával nem képes lépést tartani a ROS termeléssel. Az oxidánsok csökkentik a csillók mozgásának frekvenciáját, romlik a mucociliáris clearance, az érfal sejtjei is ki vannak téve az oxidatív stressznek. Az oxidatív stressz szerepet játszik a pulmonáris hipertónia, a fibrózissal járó tüdőbetegségek és a COPD kialakulásában (137).

Az autofágia csökkenése szerepet játszik a fibrotikus tüdőbetegségekben (137).

A sejtöregedés gyorsítja a tüdő szerkezeti, funkcionális és biomechanikai hanyatlását. A tüdő sejtjeinek károsodása olyan öregedési markereket indukál, mint a p53, p21, p16 stb., a sejtciklus megállításhoz vezetve (133).

Az öregebb monociták stimulációja kevesebb gyulladáshoz vezető citokin termelődését eredményezi, mint fiatalokban (133).

Az öregedés fent leírt hallmarkjai mind részt vesznek az életkorral összefüggő krónikus tüdőbetegségek, pl. COPD, tüdőrák kialakulásában (137).

1.7.1. Klotho és a tüdő

A klotho gén felfedezésekor megfigyelték, hogy egérben a klotho hiány a tüdő emfizéma-szerű elváltozásához vezet (3). Azóta számos további információ rendelkezésünkre áll a tüdőre kifejtett hatásokról, ismert, hogy a klotho gén elengedhetetlen a tüdő szerkezeti épiségének fenntartásában.

Klotho-hiányos egerek fogékonyabbá válnak a cigarettafüst-indukált tüdőkárosodásra (138), valamint fal nélküli alveolus megnagyobbodást mutatnak (139). Klotho-hiányos egér a humán emfizéma modellezésére is alkalmas (139). Kérdés azonban, hogy klotho-hiány esetén a tüdő fejlődése szenved zavart, vagy a már megfelelően kialakult szerv korai károsodása zajlik (140).

Suga és munkatársai vizsgálata (139) megállapította, hogy kéthetes korban a klotho egerek tüdeje szövettani vizsgálattal nem különböztethető meg a vad típustól. Ez azt erősíti meg, hogy nem fejlődési rendellenességről van szó, hanem a kifejlődött szerv korai destrukciója történik. 4 hetes korban már az alveoláris ductusok egyértelmű megnagyobbodása észlelhető, a testtömeg és a tüdőkapacitás is szignifikánsan csökken. Klotho mutáns egérben az első szövettani változások, a légzőfelület megnagyobbodása és az alveolusfalak destrukciója a tüdőben ekkor történik (139, 141). 10 hetes korban még jobban kifejeződnek az emfizémára jellemző elváltozások, normális alveolus struktúra elvétele észlelhető. Az alveoláris szeptumokhoz kis homogén nodulusok kapcsolódnak, melyek kalcifikációnak felelnek meg (139).

A klotho dózis-hatását jelzi, hogy klotho heterozigóta állatokban 10 hetes korig nincs szövettani eltérés a tüdőben, azonban 2 éves kor körül a homozigóta recesszív állatra jellemző struktúra mutatható ki (139).

Klotho-hiányos egérben lényegesen kisebb testmérethez kb. azonos nagyságú tüdő társul, ebből arra lehet következtetni, hogy hiperinflált a tüdő. Hasonlóan az emfizémás páciensekhez, gyulladással járó sejtek infiltrációja vagy intersticiális fibrózis nem figyelhető meg (139).

A tüdő elváltozásai nem lokális okokra vezethetők vissza, hanem elsődlegesen olyan szisztémás okokra, melyek a D₃-vitamin abnormális aktivációjához kapcsolódnak. Az emfizéma mértékét a D₃-vitamin megvonása csökkenti. Úgy tűnik tehát, hogy a klotho hiányos egerek emfizémája mögötti morfológiai elváltozások szisztémás okokra vezethetők vissza (141).

Az I-es típusú kollagénrostokban és az alveoláris szeptumokban kalcium lerakódások jelennek meg, a II-es típusú pneumociták degenerációja figyelhető meg. Feltehető, hogy ez a degeneráció ronthatja az alveoláris sejtek regenerációját, mert a károsodott alveolusok újjáépítésében kritikus szerepük van (139).

1.7.2. Klotho a légzőszervi megbetegedésekben

1.7.2.1. COPD

A leggyakoribb krónikus légzőszervi megbetegedés a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD). A kórkép elsősorban a légúti áramlás csökkenése következtében kialakuló perzisztáló légzőszervi tünetekkel jár, melyhez a kislégutak rendellenessége és a parenchyma károsodása (emfizéma) vezet. Ezek jelenléte és aránya egyénenként és időben változó mértékű (142).

A COPD prevalenciája nagy elemszámú nemzetközi epidemiológiai vizsgálatok alapján (143) 10% fölötti, és évi kb. 3 millió halálesetért felelős. Legmagasabb az előfordulása a dohányosok körében.

A COPD kialakulása is a fentebb részletezett öregedési elváltozásokkal van összefüggésben (137). Az alveoláris, endothel és simaizomsejtek, limfociták telomer hossza rövidült, ami korrelál a betegség súlyosságával. COPD patogenezisében a proteosztázis sporadikus vagy örökletes zavara is szerepet játszik, de kiemelendő a megnövekedett autofágia, amit maga a dohányzás is aktivál. A szabadgyökök koncentrációjának emelkedése és a felborult antioxidáns védekezés mind a betegség kialakulásában, mind pedig progressziójában szerepet játszik, ahogy a tüdő parenchymális sejtjeinek és endothel sejtjeinek öregedése is. A bazális sejtek regeneratív kapacitása csökkent. A megváltozott intercelluláris kommunikáció, azon belül is a megváltozott immunválasz szintén patogenetikai tényező. A FOXO3 csökkenése az emfizéma kialakulását segíti. A tápanyagellátottság-érzékelés szabályozásának felbomlása a proteosztázis romlásával szintén szerepet játszik a COPD kialakulásában. A

proteozázis felbomlásával a nem megfelelő térszerkezetű fehéjék felgyűlnek az endoplazmatikus retikulumban és gyulladást generálnak. Az extracelluláris mátrixban (ECM) a megbomlott proteáz/antiproteáz-egyensúly az alveoláris szeptumok elvesztéséhez és emfizéma kialakulásához vezet (137).

Jelenleg nem áll rendelkezésünkre sem széles körben használt diagnosztikus, sem prognosztikus biomarker a COPD lefolyásának követésére. Egyedül a vér eozinofilsejt száma az, amit a GOLD ajánlása (142) szerint terápiaválasztás során alkalmazhatunk, egyebekben a spirometria és az életminőség-kérdőívek használata a gold standard. Nagy szükség lenne olyan biomarkerekre, melyek objektíven, megbízhatóan előrejelzik és követik a betegség lefolyását, illetve a terápiás válasz-készséget.

A klothoval kapcsolatos eddigi ismereteink alapján felmerül, hogy emfizémában alacsonyabb lehet a szintje, és esetleg arányban állhat az emfizéma mértékével, súlyosságával, illetve biomarkerként alkalmas lehet a betegség lefolyásának jellemzésére.

COPD-s páciensek klotho mRNS expressziója (144) - hasonlóan a légúti epithel sejtekben megfigyelhető klotho expresszióhoz (145) - csökkent az egészségesekhez képest, míg plazmaklotho-szint tekintetében Patel és munkatársai nem találtak különbséget (146), azonban ez az információ a vizsgálatunk megkezdése előtt nem állt rendelkezésre.

Tekintettel arra, hogy a COPD-s betegek jelentős része erős dohányos, vagy számottevő dohányzási anamnézissel rendelkezik, lényeges a dohányzás és a klotho szintek összefüggéseinek ismerete. Nem egyöntetűek az eredmények azzal kapcsolatban, hogy a dohányosok szérum-/plazmaklotho-koncentrációja eltér-e a nemdohányzóképtől (146), erős dohányosokban azonban szignifikánsan magasabb klothoszinteket mértek (147) és a dohányzás abbahagyása csökkenti a klothoszintet (148).

A klotho downregulációja abnormális autofágia aktivitást eredményez, fokozott expressziója pedig csökkenti azt (149).

1.7.2.2. Tüdőrák

A tüdőrák a második legmagasabb morbiditású daganat mind a férfiak, mind a nők körében, évente kb. 2 200 000 esetben diagnosztizálják, ez az összes daganatos megbetegedés több mint 11%-a. Mortalitása mindkét nem esetében a legmagasabb, kb.

1 800 000 évente, az összes daganatos halálozás 18%-a (150). 5 éves túlélése az USA-ban 24% (151).

Elsődleges kockázati tényezője a dohányzás (akár aktív, akár passzív), de más környezeti (pl. radon, azbeszt) és genetikai tényezők, illetve az életkor előrehaladása önmagában is kockázatot jelent.

A tüdőrák is az öregedő tüdő betegségének tekinthető, melynek legfontosabb kóroki tényezője a genomikai instabilitás, a megváltozott DNS-helyreállító mechanizmusok (137). A daganatsejtekre olyan epigenetikai módosulások jellemzők, mint a DNS hipermetiláció, hiszton modifikációk stb. A tumorképződés során a genetikai és epigenetikai módosulások szoros egymásra hatásban vannak. A daganatsejtek számára is egyensúlyban lévő proteosztázis szükséges, azonban ezt a maguk képére tudják formálni, hogy alkalmazkodjanak például a hipoxémiához, pH-változáshoz. A tumorprogresszió során megváltozik a sejtek közötti kommunikáció, ami a megváltozott mikro környezetért felelős, illetve segít abban, hogy a malignus sejtek kikerülhessék az immunrendszert. Az ECM szabályozási zavara hozzájárul a daganat kialakulásához, progressziójához és metasztázisképzéséhez, a neoangiogenezishez és a gyulladás létrejöttéhez (137).

Mind az IGF-1/inzulin (152), mind a Wnt/ β -katenin jelátviteli út (153) szerepet játszik a tüdő karcinogenezisében. Emelkedett plazma IGF-1-koncentráció összefüggésben van a tüdőrák kialakulásának kockázatával (154) és tüdőrákos páciensek keringő IGF-1 szintje emelkedett az egészséges személyekhez képest (155), bár az eredmények ellentmondásosak e tekintetben (156). Továbbá, daganatos tüdőszövetben emelkedett IGF-1-szinteket detektáltak (157).

Az őssejtek kimerülése tumorszupresszorként hathat. Ez a jelenség szerepet játszhat abban, hogy idős korban csökken a tüdőrák incidenciája, míg a többi öregedéssel összefüggő tüdőbetegség, pl. COPD, IPF előfordulása tovább nő (137). A sejtöregedés protektív a daganatsejtek túlzott proliferációjával szemben. A tápanyagérzékelés zavara, az Akt/mTOR tengely kóros aktiválódása folyamatos proliferatív jeleket ad a tumorsejteknek, ezzel a daganatterápia egyik fontos terápiás célpontja (101). Az autofágiának kettős szerepe van, egyrészt gátolja a daganat kialakulását, másrészt lehetővé teszi a daganatsejteknek, hogy megbirkózzanak a metabolikus és környezeti stresszel (101).

Tüdőrák esetében a kórkép magas prevalenciája és rossz prognózisa miatt kulcsfontosságú a prediktív és prognosztikus biomarkerek alkalmazása. A jelenleg is alkalmazott biomarkerek közül például az EGFR, ALK, PD1/PDL1 stb. megbízhatóan vizsgálhatóak szövettani mintákon, bár a szükséges szövettani mintavétel nem kivitelezhető minden tüdőrákos páciens esetében. Ezeket a biomarkereket szofisztikált módszerekkel (immunkémiai vizsgálatokkal, PCR-rel) lehet vizsgálni, melyekhez speciális eszközökre és szaktudásra van szükség. Ez gyakran késlelteti az eredményt.

Tekintettel arra, hogy a carcinogenezisben részt vevő IGF-1/inzulin, Wnt- β -katenin jelátviteli utak gátlása terápiás érdeklődésre tart számot, és a klotho gátolni képes ezeket, a klotho tüdőrákban betöltött szerepének jobb megértésére van szükség, hiszen felmerül a szerepe, mint potenciális biomarker.

A klotho gén diszregulációját írták le több daganattípusban (pl. mellrákban és hepatocelluláris karcinómában) (158, 159), de más daganatok esetében is tumorszuppresszorként viselkedett (160). Génexpressziós vizsgálatok tüdőrák esetében is előrevetítették a klotho potenciális szerepét: csökkent az expresszió tüdőrák szövetmintákban és sejtvonalakban is az egészséges tüdőhöz képest (161), valamint méginkább csökkent kemoterápia-rezisztens tüdőrákban (162, 123). Több tüdőráktípusban is összefüggést mutattak ki a klotho expresszió és a túlélés között (163, 164).

Bár a klotho fehérje szerepe és funkciója csak részben ismert, az IGF-1 jelátvitelt gátló hatása ismert, legvalószínűbb, hogy az IGF-1 receptor autofoszforilációját akadályozza meg (18). Ez a hatásmechanizmus feltételezhetően a rákos sejtek proliferáció-szabályozásának és túlélésének fő komponense (165).

Tüdő laphámrákok 2,9%-ában, adenocarcinómák 2,3%-ában figyelték meg az alfa-klotho fehérje potenciálisan onkogén mutációit (166).

A klotho befolyásolja a tüdőráksejtek növekedését, proliferációját, apoptózisát, motilitását (167, 168), és összefüggést mutattak ki in vitro a terápia-rezisztenciával is (162). Ezekért a hatásokért legalább részben az IGF-1R/Akt (167), a Wnt3a/ β -katenin jelátvitel (161) és a csökkent IL-6, IL-8 termelés felelős (168). Nagysejtes neuroendokrin karcinómás vagy kissejtes tüdőrákos megbetegedések szöveti klothoexpresszióval jobb

kimenetűek, mint klothoexpresszió nélkül, a szöveti klothoexpresszió a túlélés független pozitív prediktív faktora (164, 169). A klotho érzékenyítheti a tüdőrákos sejteket ciszplatin indukált apoptózisra a PI3K/Akt jelátvitelen keresztül (123) vagy a csökkent autofágia által (162).

A klotho túlexpresszió csökkenti a malignus sejtek növekedését (161), míg a gén elcsendesítése növeli a tumor fejlődését (162). Alacsonyabb klothokonzentrációt mutattak ki terápiarezisztens sejtvonalakban (162), és a klothoexpresszió változása megváltoztatta a ciszplatin-rezisztens sejtek proliferációját is (123), felvetve a lehetőséget, hogy a klotho növelheti a rákos sejtek kemoterápia-érzékenységét.

A génexpresszióra vonatkozó vizsgálatokkal ellentétben a keringő klothoval kapcsolatban vizsgálatunk megkezdése előtt nem rendelkezünk információval.

1.7.2.3. Obstruktív alvási apnoe

Az obstruktív alvási apnoét a felső légutak visszatérő, részleges vagy teljes kollapszusa jellemzi az alvásidő alatt, ami intermittáló hipoxémához és az alvásszerkezet megbomlásához vezet. A krónikus intermittáló hipoxémia növeli a reaktív oxigén származékok és a gyulladáshoz vezető mediátorok termelődését (170). Az oxidatív stressz markerek szintje és a szisztémás gyulladás mértéke összefüggésben áll a betegség súlyosságával (171) és hozzájárul a társbetegségek kialakulásához (172).

OSA-ban a gyulladáshoz vezető markerek megemelkednek, ezért legszélesebb körben ezeket a proinflammatorikus markereket vizsgálták (CRP, IL-6, TNF- α), de nem elég specifikusak, mert számos más, OSA-hoz gyakran társuló kórképben is emelkedettek. Ugyanez a helyzet a metabolikus és oxidatív stressz markerekkel (pl. 8-izoprosztán, NO). A jelenlegi megítélés szerint inkább a fenti biomarkerek kombinációjának elemzése jelenthet megoldást, vagy proteomikai vizsgálatok, de egyelőre távolinak látszik ezek gyakorlati alkalmazása a klinikumban.

Több szempontból is felmerül, hogy OSA-ban megváltozott klotho-konzentrációkkal találkozhatunk.

A klotho fehérje gyulladásgátló hatása (19) és oxidatív stresszt mérséklő hatása ismert (22), serkenti az eNOS expresszióját (35). Ezzel párhuzamosan a klotho elégtelen termelődése endothel diszfunkcióhoz vezet (74).

A szisztémás gyulladás csökkenti a klotho termelődését a vesében (173, 174); a D₃-vitamin szintje, mely a klotho potenciális aktivátora (175), csökkent OSA-ban (176). A kóros elhízás, az alvási apnoe leggyakoribb etiológiai tényezője alacsony klotho szintekkel párosul (57).

1.7.2.4. Ok és/vagy okozat?

A fenti légzőszervi megbetegedések kialakulásában tehát nemcsak az életkor előrehaladása, hanem sok esetben a kockázati tényezők éveken, évtizedeken keresztül fennállása (dohányzás, elhízás) is szerepet játszik. Ezek már a kórkép kialakulása előtt is az oxidatív stressz növelését eredményezik, lokális és szisztémás gyulladást tartanak fenn. Máig nincs elegendő ismeretünk azzal kapcsolatban, hogy miért alakul ki egyes dohányosokban COPD, tüdőrák, míg másokban nem. Miért társul egyes páciensekben COPD-hez és/vagy elhízáshoz OSA, míg másokban nem. Az egyéni válaszkészség fontos elemei lehetnek a kompenzációs mechanizmusok, hogy mennyi ideig és milyen mértékben képes a szervezet megbirkózni a patomechanisztikus hatásokkal. A klotho, tekintettel a rendkívül szerteágazó hatásmechanizmusára, kulcsmolekulája lehet a védekezésnek. Feltételezhetjük, hogy koncentrációjának csökkenése, korai kimerülése a kompenzáció visszaszorulásához, végül a kórkép kialakulásához vezet. Azonban felmerülhet a klotho esetleges kórfejlődést befolyásoló szerepe is, miszerint a kórkép kialakulását követően megemelkedett koncentrációval igyekszik a szervezet csökkenteni a károsodásokat. Az ok-okozati dilemma mellett szintén tisztázásra szorul, hogy a klotho változása ténylegesen a patomechanisztikus folyamat része-e, tekinthetjük-e kóroki tényezőnek, vagy pusztán tünetként, markerként tekintsünk rá és koncentrációváltozásaira.

2. Célkitűzések

Az irodalmi adatok alapján több légzőszervi kórkép kapcsán felmerült, hogy a klotho patomechanizmusban betöltött szerepéből adódóan biomarker funkcióval bírhat, azaz jelezheti egyes légzőszervi megbetegedések súlyosságát, lefolyását, progresszióját. Vizsgálataink célja a vérben keringő, szolubilis klotho fehérje koncentrációjának mérése, koncentrációváltozásainak elemzése, változékonyságának megítélése volt különböző légzőszervi megbetegedésekben.

A plazmaklotho-koncentráció rövid- és hosszú távú változásait különböző beavatkozások hatására, illetve csoportok közötti eltéréseket számos munkacsoport vizsgált, ennek ellenére a klotho koncentráció technikai reprodukálhatóságával kapcsolatban nem rendelkezünk információval. A korábban leírt eredmények értelmezéséhez, interpretálásához olyan információra is szükségünk van, mint a klotho koncentrációjának napok közötti variabilitása.

Első lépésben olyan vizsgálómódszert kerestünk, mellyel megbízható módon tudjuk mérni a fehérje koncentrációját. Ennek érdekében meg kívántuk határozni az általunk használt módszerrel elérhető intra-assay variabilitást.

Tekintettel arra, hogy szeretnénk volna hosszmetzeti vizsgálatban, beavatkozásokat követően is mérni a klotho koncentrációját, szükségesnek tartottuk meghatározni a fehérje plazmakoncentrációjának napi variabilitását.

Ezt követően célunk volt megvizsgálni a kapcsolatot a keringő klotho fehérje és a COPD-s páciensek klinikai paraméterei között, hogy lássuk, a plazma klotho koncentrációja tükrözi-e a páciensek funkcionális paramétereit: annak megítélésére, hogy a plazma klotho koncentrációja szolgálhat-e a COPD biomarkereként.

Daganatos megbetegedésekben a klotho által mediált jelátviteli utak gátlása régóta terápiás érdeklődésre tart számot. Több, az IGF, mTOR valamint Wnt jelátvitelre ható molekulával végeznek klinikai vizsgálatokat például tüdőrákban is (177, 178, 179). A fenti jelátvitelket gátló klotho viselkedésével, plazma klotho koncentrációjával kapcsolatban azonban kevés információval rendelkezünk tüdőrákos páciensek esetén, szeretnénk volna ezt megismerni.

Korábbi vizsgálatok hiányában célunk volt még a plazma klotho koncentrációjának elemzése OSA-ban, összevetése a páciensek klinikai és alvási paramétereivel, éjszakai hipoxémia-markereivel.

Hipotézisek

1. COPD-s páciensek plazma klotho koncentrációja komplex tüdőgyógyászati rehabilitációs program hatására (fizikai tréning, étrend és a gyógyszeres terápia optimalizálása, pszichoszociális támogatás) megemelkedik.
2. A csökkent klotho mRNS szintekhez hasonlóan a plazma klotho fehérje koncentrációja is csökken tüdőrákban, és változhat a szövettani típusnak és a betegség stádiumának függvényében. A keringő klotho információt adhat a tumor proliferatív és metasztázisképző potenciáljáról, a túlélésről, és előjelezheti a platinaérzékenységet, ezzel információt nyújtva a terápiaválasztáshoz.
3. Obstruktív alvási apnoe alacsonyabb plazma klotho koncentrációkkal jár, és utóbbi összefüggésben áll a betegség klinikai paramétereivel

3. Módszerek

3.1. Plazmaklotho-koncentráció mérésének módszertana

A következőkben bemutatásra kerülő három vizsgálatban a plazmaklotho-koncentráció meghatározását végeztük el különböző egészséges- és betegcsoportokban, illetve a koncentráció változását mértük beavatkozás hatására. A mérést minden esetben ugyanazzal a módszerrel végeztük.

Vénás vérvételt követően a minták azonnali centrifugálására került sor (fordulatszám: 1500 rpm, időtartam: 10 perc, hőmérséklet: 4°C). A felülúszót, a plazma mintákat -80°C-on tároltuk felhasználásig.

A plazma klothokonzentrációját humán szolubilis enzimkapcsolt immunoassay-vel (ELISA, Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Takasaki, Japan) határoztuk meg. A gyártó adatai alapján a kit alsó és felső detekciós határai 93,75 pg/ml és 6000 pg/ml.

A vérvétel vizsgálatától függően EDTA-csövekbe vagy citrátos csövekbe történt, ezt az adott vizsgálatnál jelezzük.

Az általunk használt ELISA (180) a klotho mindkét izoformáját (KL1-KL2 és KL1) kimutatja. Az általunk várt koncentráción a kit gyártó által meghatározott inter-assay variabilitása 6,5%.

Az intra-assay variabilitás meghatározásához egyazon plazmamintából egyazon ELISA kit 2 lyukába adagoltunk mintát.

Az alábbiakban az egyes vizsgálatokba bevont pácienseket és az adott vizsgálat során elvégzett statisztikai elemzéseket mutatom be.

3.2. Plazma klotho-koncentráció mérése COPD-ben

3.2.1. Alanyok

A vizsgálatba 31 stabil COPD-s páciens (életkor $63,9 \pm 7,9$ év, FEV1 $38,6 \pm 14,1\%$ (átlag \pm SD)) került bevonásra (181). Egyik páciens sem volt asztmás, és nem kerültek bevonásra krónikus veseelégtelenségben, illetve az elmúlt 5 évben daganatos megbetegedésben szenvedők. Kizárási kritérium volt továbbá az elmúlt 3 hónapban lezajlott akut exacerbáció.

Fentiek közül 19 páciens, a betegség stádiumától és dohányzási szokásuktól függetlenül, részt vett egy 3 hetes elektív, komplex kórházi légzőszervi rehabilitációs programban. A páciensek részletes állapotfelméréseken mentek keresztül a rehabilitációs program első és utolsó napján. Légzésfunkciós vizsgálat és 6 perces sétateszt (6MWD) történt, CAT (COPD Assessment Test) és mMRC (módosított Medical Research Council diszpnóe skála) kérdőíveket töltöttek ki. Mindkét alkalommal megtörtént a szorítóerő, a mellkastágulás és az akaratlagos apnoe idő mérése. A páciensek klinikai jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze. Ahol másképp nincs jelezve, az adatok átlag \pm SD formátumban vannak megadva.

1. táblázat. COPD-s páciensek klinikai paraméterei

	Összes páciens	Rehabilitációs alcsoport
Páciensek száma (f/n)	19/12	11/8
Életkor (év)	63,9 \pm 7,9	63,3 \pm 8,8
FEV1 (%)	38,6 \pm 14,1	35,7 \pm 10,7
pO ₂ (kPa)	8,2 \pm 1,9	8,2 \pm 1
Dohányos/ex-dohányos	14/17	8/11
Dohányzási anamnézis (csomagév)	49,1 \pm 25,4	47,3 \pm 23,7
GOLD stádium (db)		
A	2	0
B	2	1
C	6	3
D	21	15
BODE-index	3,8 \pm 2	4,1 \pm 1,9
BMI	23,9 \pm 4,9	23,1 \pm 4,3
6MWD (m)	376,3 \pm 102	373,7 \pm 123,5
CAT	13,7 \pm 6,5	14,9 \pm 7,3
mMRC	1,7 \pm 0,9	1,8 \pm 1
Szorítóerő (kg)	27,9 \pm 10,4	27 \pm 10,9
Akaratlagos apnoe idő (s)	20,9 \pm 8,1	19,2 \pm 7,3
Mellkastágulás (cm)	3,6 \pm 1,3	3,6 \pm 0,7

A komplex légzésrehabilitációs program az alábbi elemekből tevődött össze: napi légzőizomtréning, kontrollált légzési technikák elsajátítása, mellkasmobilizálás (kb. 40 perc); egyéni állóképességi tréning szobabiciklin és/vagy futópadon (napi 2 vagy 3 alkalom); személyre szabott étrend; szükség esetén gyógyszeres terápia optimalizálása; szükség esetén pszichés támogatás.

A klinikai paraméterek mérését tapasztalt gyógytornászok végezték. A maximális szorítóerőt a domináns karon, kézi dinamométerrel végezték (Kern&Sohn GmbH, Germany). A 6 perces sétatesztet az Amerikai Tüdőgyógyász Társaság (ATS) ajánlása alapján, 33 méter hosszú beltéri folyosón végezték (182). A mellkastágulás a mellkas körfogatának különbsége a maximális belégzés és a maximális kilégzés idején. A mérés mérőszalaggal történik a processus xyphoideus magasságában. Egymást követő 3 alkalommal történt mérés, ezek átlaga került rögzítésre. Az akaratlagos apnoe idő mérése során mély kilégzést követően maximális belégzés történt, majd a kilégzésig eltelt időt mérték. A vizsgálat során a páciensek orrcsipeszt viseltek.

A metodikai vizsgálatokat is ezen betegcsoportban végeztük, ezért a rehabilitációs program 1. és 3. napján is történt vérvétel, illetve az utolsó napon is. A vénás vérmintát EDTA csőbe vettük. Minden mintavételre reggel, legalább 8 óra nyugalmat követően került sor.

A vizsgálatok a szükséges kutatás-etikai engedélyek birtokában (OGYÉI/29037, IKEB 19/2015), az 1964. évi Helsinkii Deklaráció és annak módosításainak szellemében kerültek elvégzésre. Minden páciens tájékozott beleegyezését adta írásban a vizsgálatban való részvételhez.

3.2.2. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését kereskedelmi forgalomban elérhető szoftverekkel (SPSS20 és Graph Pad Prism) végeztük. A bevonandó esetszámot GPower használatával határoztuk meg. A plazma klotho napi variabilitását Bland-Altman teszttel és variációs koefficienssel jellemeztük. Az intra-assay variabilitást szintén variációs koefficienssel jellemeztük. A párosított adatokat páros t-próbával vagy Wilcoxon-féle rangszám próbával hasonlítottuk össze. A nem párosított adatok összehasonlítását párosítatlan t-próbával vagy Mann-Whitney U teszttel végeztük, az eloszlás függvényében. Az adatok eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A három időpontban mért klotho

koncentrációkat varianciavizsgálattal (ismételt méréses ANOVA) hasonlítottuk össze. 5% alatti p értéket tekintettünk szignifikánsnak. Az adatokat átlag \pm standard eloszlás (SD) formában adtuk meg.

3.3. Plazmaklotho-koncentráció mérése tüdőrákban

3.3.1. Alanyok

45 újonnan diagnosztizált tüdőrákos páciens vett részt a vizsgálatban (183). A szövettani diagnózis 14 esetben kissejtes, 31 esetben nem kissejtes tüdőrák volt (16 adenokarcinóma, 15 laphámkarcinóma). A daganat stádiumát is rögzítettük. Krónikus veseelégtelenség és más eredetű tumoros megbetegedés kizáró kritériumok voltak. Csak olyan páciensek kerültek bevonásra, ahol a szövettani diagnózis megtörtént. Azon klinikai paraméterekre, melyekről munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy nem befolyásolják a plazma klotho értékeket (légzésfunkció és dohányzási anamnézis), nem voltunk figyelemmel a bevonásnál.

A kontrollcsoportot 43 páciens alkotta. A bevonás kritériuma volt a negatív mellkasi képalkotó vizsgálat, illetve az, hogy ne legyen ismert daganatos megbetegedésük. A páciensek jellemzőit a 2. táblázat mutatja be. Az adatok, ahol másképp nincs jelezve, átlag \pm SD formátumban vannak megadva

Az alanyoktól vénás vérvétel történt, a vérmintákat EDTA-csőbe gyűjtöttük.

A vizsgálatok a szükséges kutatás-etikai engedély birtokában (TUKEB 238/2015), az 1964. évi Helsink Deklarációban és annak módosításaiban foglaltaknak megfelelően kerültek elvégzésre. Minden páciens tájékozott beleegyezését adta írásban a vizsgálatban való részvételhez.

2. táblázat. Tüdőrákos páciensek klinikai paramétere

	Betegcsoport	Kontrollcsoport	p
Nem (ffi/nő)	45 (23/22)	43 (15/28)	n.s.
Életkor (év)	65,1±7,9	62,3±6,8	n.s.
COPD (+/-)	27/18	17/26	n.s.
FEV1 (%)	62,4±19,8	73,9±316	n.s.
Dohányzás igen / nem / nincs adat (db)	24/13/8	14/28/1	0,005
Szövettani diagnózis (I/II/III/IV stádium, db)		n.a.	n.a.
kissejtes	14 (0/0/7/7)		
mirigyhámsejtes	16 (1/0/6/9)		
laphámsejtes	15 (0/3/7/5)		

3.3.2. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését és vizualizációját Statistica és Graph Pad Prism (4.00 verzió Windows-ra, La Jolla California, USA) szoftverekkel végeztük. Az alanyok paramétereit Student-féle t-tesztel és Chi-négyzet próbával hasonlítottuk össze. A klotho-értékek eloszlását Kolmogorov-Smirnov tesztel vizsgáltuk. Az adatok normál eloszlást mutattak, így a klotho-értékeket Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze a csoportok között (egészséges vs. tüdőrákos; metasztatizált vs. nem áttétes). Egyszempontos ANOVA-t használtunk a három szövettani csoport összehasonlítására, melyet Tukey-teszt követett a bármely 2-2 csoport között esetlegesen fennálló szignifikáns különbség igazolására. A tüdőrákos és a kontrollcsoport összehasonlításához szükséges minimális esetszámot korábbi, egészséges felnőttek körében végzett plazma-klotho méréseink eredményei alapján kalkuláltuk (átlag 562 pg/ml és standard eloszlás 146 pg/ml), a hatásnagyság (effect size) pedig az ELISA kit adott koncentrációnál várható

assay-k közötti variabilitásának duplája (19%). A tüdőrákos betegek alcsoportjainak elemzésére, a szükséges esetszám meghatározásához nem történt power-analízis.

3.4. Plazma klotho-koncentráció mérése obstruktív alvási apnoe szindrómában

3.4.1. Alanyok

62 felnőtt önkéntes vett részt a vizsgálatban (184). Mindannyian a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinika alváslaboratóriumába kaptak beutalót OSA gyanúja miatt (pl. horkolás, apnea megfigyelése, nappali álmoság, fáradtság stb.) Kizárási kritériumok voltak az elmúlt 5 évben fennálló danagatos megbetegedés; autoimmun betegség, nem kontrollált krónikus megbetegedés (pl. diabétesz), ismert veseelégtelenség az anamnézisben, illetve a vizsgálatot megelőző 4 hétben zajló fertőzés. Egyik résztvevő sem volt korábban OSA-val diagnosztizálva vagy kezelve.

Poliszomnográfias vizsgálat történt 44 páciens esetében, 18 esetben pedig kardiorespiratorikus poligráfia. A diagnosztikus vizsgálatot követően vénás vérvétel történt a plazma klotho koncentrációja, illetve a vércukorszint, kreatinin, koleszterin, HDL-C, LDL-C, triglicerid és CRP meghatározása céljából. A klothoszint méréséhez a vérvétel citrátos csőbe történt. A glomerulus filtrációs ráta (GFR) a Modification of Diet in Renal Disease egyenlet segítségével lett kiszámítva.

$$\text{GFR} \left(\frac{\frac{\text{ml}}{\text{min}}}{1.73 \text{ m}^2} \right) = 175 \times (\text{szérum kreatinin})^{-1.154} \\ \times (\text{kor})^{-0.203} \times (0.742 \text{ ha nő})$$

Megtörtént az anamnézis felvétele, vérnyomásmérés, és a résztvevők kitöltötték az Epworth Sleepiness Scale (ESS) kérdőívet. A bentfekvés során a poliszomnográfias és poligráfias vizsgálat Somnoscreen Plus Tele PSG (Somnomedics GMBH, Germany) eszközzel történt. A poligráfia során a testhelyzet, a mellkasi és hasi légzési kitérés, a légzéshangok, a nazális nyomás, EKG és O₂-szaturáció került rögzítésre, míg poliszomnográfia során electroencephalogram, electro-oculogram és electromyogram is készült. Az alvásfázisok, mozgások és cardiopulmonalis események manuálisan lettek rögzítve az American Academy of Sleep Medicine ajánlása alapján (183). A teljes alvásidő (TST), periódusidő (SPT), a teljes alvásidő 90% szaturáció alatt töltött aránya (TST90%), legalacsonyabb O₂-szaturáció (minSatO₂) került rögzítésre; valamint

kiszámolásra került az apnoe-hypopnoe index (AHI), az O₂-deszaturációs index (ODI) és az ébredési index (AI). Az obstruktív alvási apnoe diagnózisa 5/h-nál nagyobb AHI értékben volt definiálva.

A vizsgálatok a szükséges kutatás-etikai engedély birtokában (TUKEB 30/2014), az 1964. évi Helsinki Deklaráció és annak módosításai szellemében kerültek elvégzésre. Minden páciens tájékozott beleegyezését adta írásban a vizsgálatban való részvételhez.

3.4.2. Statisztikai analízis

GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) szoftvert használtunk az adatok statisztikai elemzésére. Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. A OSA-s és kontrollcsoport értékeit parametrikus esetben t-próbával, nem normál eloszlás esetén Mann–Whitney U teszttel hasonlítottuk össze. Kategorikus változók közötti kapcsolatot nagyobb esetszám esetén chi-négyzet próbával, kisebb esetszám esetén Fisher-egzakt teszttel elemeztük. A plazmaklotho-koncentrációkat a klinikai paraméterekkel és az alvási markerekkel az esetleges korreláció megállapítása érdekében Spearman-teszttel hasonlítottuk össze. Az elemzéseket elvégeztük a 8 elhízott (BMI >30 kg/m²) alany kizárását követően is (n = 5 OSA és n = 3 kontroll). 0,05 alatti p értéket tekintettünk szignifikánsnak.

A plazmaklotho-szint és az éjszakai hipoxémia markereinek (ODI és TST90%) összehasonlításához szükséges minimális elemszámot 0,35 hatásmérettel, 80% erővel (power) és 0,05 α értékkel becsültük meg. Ezeket az értékeket a plazmaklotho-koncentráció korábbi vizsgálatainkban kapott eloszlása alapján határoztuk meg.

4.Eredmények

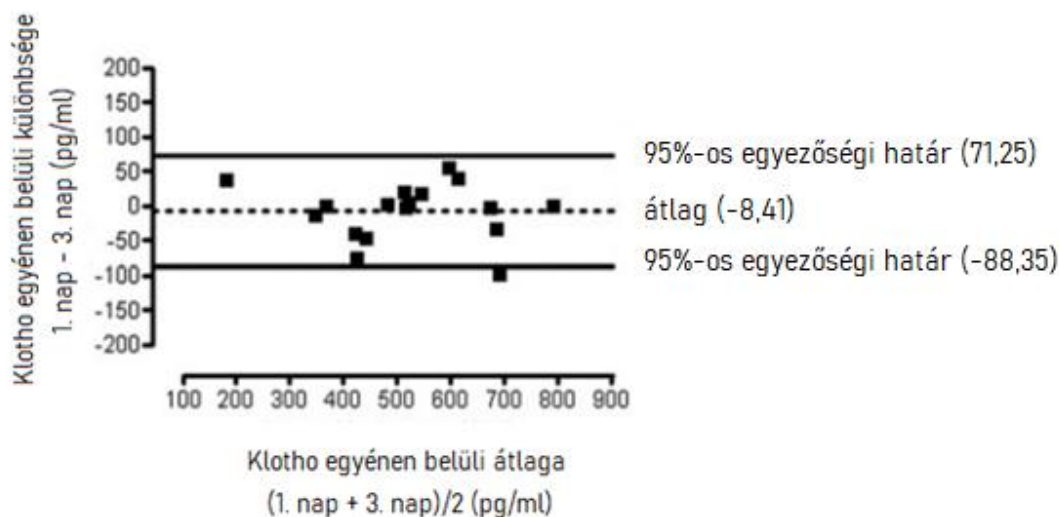
4.1. Plazma klotho vizsgálatának módszertani kérdései

4.1.1. A plazmaklotho-szint meghatározásának megbízhatósága

A plazmaklotho-szint mérése az intra-assay megismételhetőség elemzése alapján a fenti módszerrel és ELISA kittel megbízhatóan mérhető, méréseink alapján az intra-assay variációs koefficiens 3,4%.

4.1.2. A plazma klotho-koncentráció napok közötti variabilitása COPD-s betegekben

A klothoszint napok közötti variabilitását (between-day variability) a stabil COPD-s páciensek légzésrehabilitációs kezelésének 1. és 3. napján vett vérmintáiból határoztuk meg. A variációs koefficiens 4,5%. Az egyezőség határai (95% limits of agreement) - 88,35 pg/ml és 71,25 pg/ml (4. ábra).

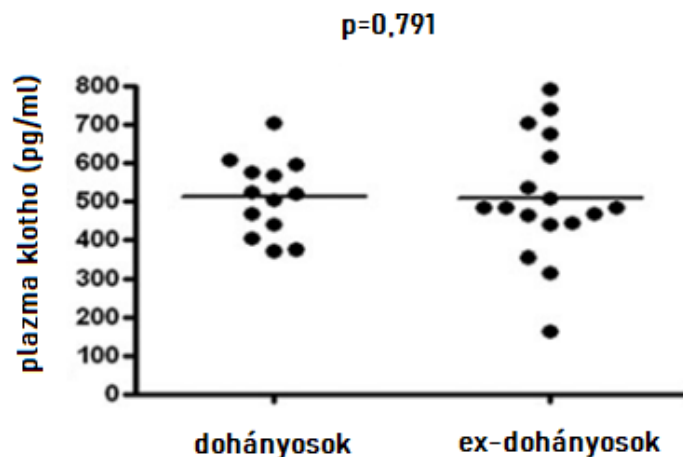


3. ábra: Intra-subject variabilitás. A plazma klotho-koncentráció napok közötti variabilitása Bland-Altman görbén, összehasonlítva az egyén klotho koncentrációinak átlagát a klotho koncentrációk különbségével.

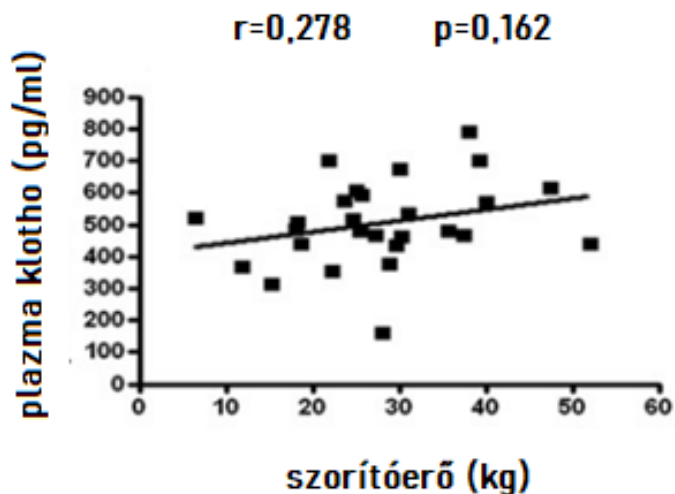
4.2. Plazma klotho-szint stabil COPD-ben

4.2.1. A plazma klotho koncentrációjának kapcsolata a stabil COPD-s páciensek klinikai paramétereivel

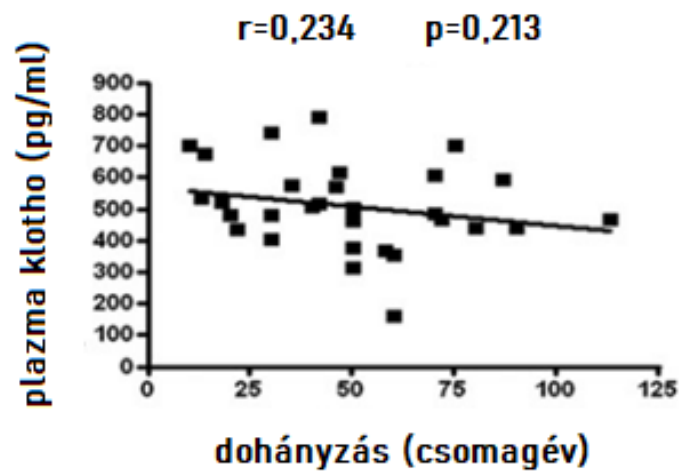
A dohányos és ex-dohányos COPD-s csoport plazmaklotho-szintje között nincs szignifikáns különbség ($508,4 \pm 95,2$ vs. $510,2 \pm 164,4$ pg/ml, $p > 0,05$; átlag \pm SD) (5. ábra). A fehérje koncentrációja nem korrelál sem az életkorral, sem a testtömeg-indexszel, sem a FEV1%-kal, ahogy a szorítóerővel sem ($r = 0,278$; $p = 0,162$) (6. ábra); a csomagévben kifejezett dohányzási anamnézissel sem ($r = -0,234$; $p = 0,213$) (7. ábra), valamint a 6 perces sétatávolsággal ($r = -0,235$; $p = 0,238$) (8. ábra) sem.



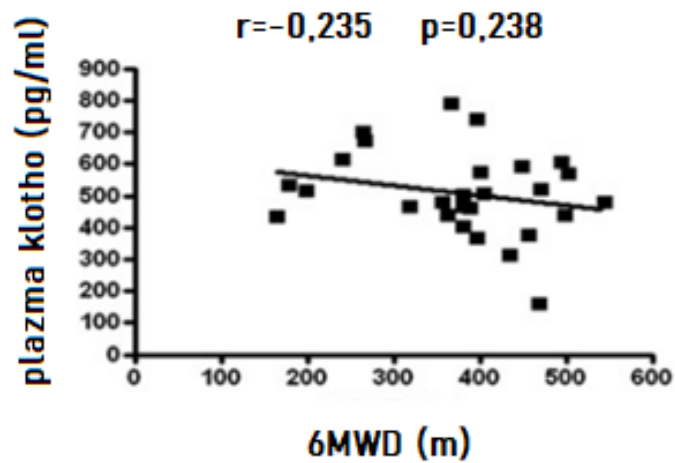
5.ábra. Plazmaklotho-koncentráció a dohányos és ex-dohányos csoportban



6.ábra. Plazmaklotho-koncentráció a szorítóerő függvényében



7.ábra. Plazmaklotio-koncentráció a csomagévben kifejezett dohányzással összefüggésben



8.ábra. Plazmaklotio-koncentráció a 6 perces járástávolság függvényében

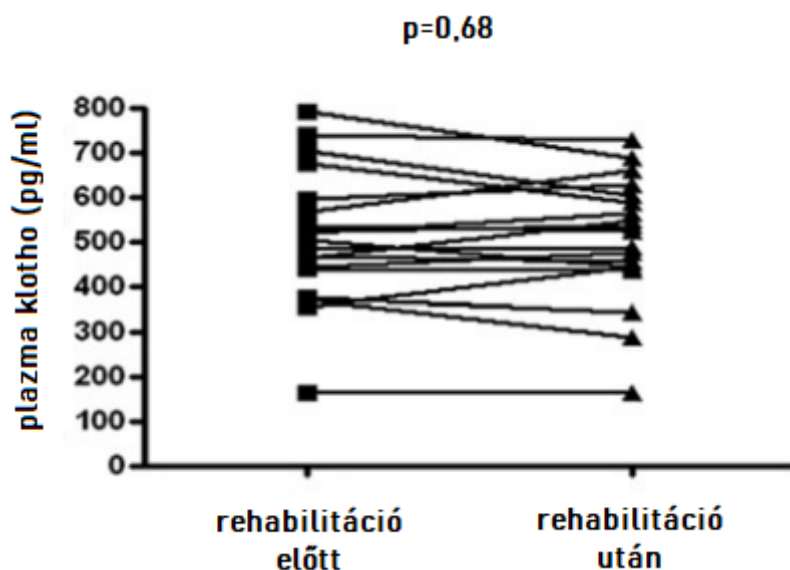
4.2.2. Légzőszervi rehabilitáció hatása a stabil COPD-s páciensek klotho-szintjére

A 3 hetes légzőszervi rehabilitációs program hatására szignifikánsan javult a páciensek 6 perces sétatávolsága ($373,7 \pm 123,5$ vs. $414,5 \pm 118,6$ m; $p=0,0017$), szorítóereje ($27 \pm 10,9$ vs. $30,2 \pm 9,1$ kg; $p=0,0013$), mellkastágulása ($3,59 \pm 0,7$ vs. $4,89 \pm 1,3$ cm; $p=0,0054$) és CAT pontszáma ($14,9 \pm 7,3$ vs. $10,7 \pm 6,5$; $p=0,0042$), azonban nem minden páciens mutatott javulást a vizsgált paraméterekben. A FEV1%, akaratlagos apnoe idő és az mMRC pontszám nem változott szignifikánsan a kezelés során. A páciensek rehabilitációt megelőző és azt követő klinikai paramétereit az 3. táblázat mutatja be. Az adatok átlag \pm SD formátumban vannak megadva.

A plazma klotho koncentrációjában nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a 3 hetes kórházi légzőszervi rehabilitációs program hatására (9. ábra). A rehabilitáció előtt a plazma klotho koncentrációja $510,1 \pm 149,8$ pg/ml (átlag \pm SD) volt, míg a rehabilitáció utolsó napján $504,2 \pm 134,9$ pg/ml.

3.táblázat. COPD-s páciensek klinikai paramétereit rehabilitáció előtt és után

	Rehabilitációt megelőzően	Rehabilitáció végén	p	rehab. után-rehab. előtt
FEV1 (%)	$35,7 \pm 10,7$	$34,4 \pm 11,6$	n.s.	$-0,8 \pm 5,5$
pO ₂ (kPa)	$8,16 \pm 1$	$8,15 \pm 0,83$	n.s.	$-0,46 \pm 2,2$
6MWD (m)	$373,7 \pm 123,5$	$414,5 \pm 118,6$	<0,01	$40,9 \pm 40,9$
mMRC	$1,8 \pm 1$	$1,5 \pm 1,3$	n.s.	$-0,3 \pm 1$
CAT	$14,9 \pm 7,3$	$10,7 \pm 6,5$	<0,01	$-4,3 \pm 5,9$
Szorítóerő	$27 \pm 10,9$	$30,2 \pm 9,1$	<0,01	$3,2 \pm 3,1$
Akaratlagos apnoe idő (s)	$19,2 \pm 7,3$	$23,9 \pm 6,5$	n.s.	$4,8 \pm 9,7$
Mellkastágulás (cm)	$3,59 \pm 0,7$	$4,89 \pm 1,3$	<0,01	$1,3 \pm 1,2$



9. ábra. COPD-s betegek plazmaklotho-koncentrációja a légzőszervi rehabilitációt megelőzően és azt követően

4.2.3. Rehabilitációs válaszkészség előrejelzése

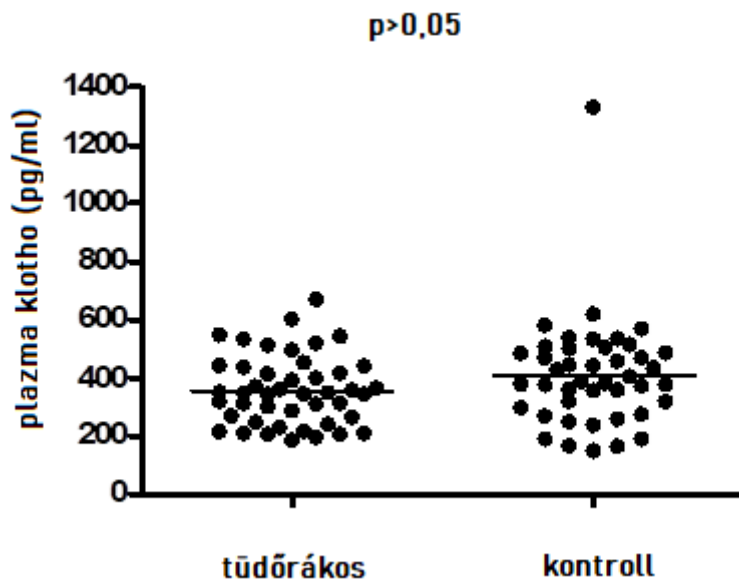
Alcsoport-analízis során megállapítottuk, hogy azon páciensek kezdeti klothokonzentrációja, akik klinikai javulást mutattak a rehabilitáció során, nem tért el szignifikánsan azoktól, akik esetében nem történt javulás. A kezdeti plazmaklotho-koncentráció tehát nem alkalmas a válaszkészség, a rehabilitáció hatékonyságának előrejelzésére. Megjegyzendő azonban, hogy a vizsgálat statisztikai ereje az alcsoportanalízisre nem volt megfelelő, ezért ebből nem vonható le bizonyossággal következtetés.

4.3. Plazmaklotho-szint tüdőrákban

4.3.1. Egészségesek és tüdőrákosok klothoszintjének összehasonlítása

A tüdőrákos és a kontrollcsoport pácienseinek plazma klothokonzentrációja között nem mutattunk ki szignifikáns különbséget (medián (IQR): 366,3 (257,9-486,8) vs. 383,5 (304,6-489,7) pg/ml, $p>0,05$) (10. ábra). Egy kiugró érték volt megfigyelhető az egészséges csoportban, mely sem az anamnézis, sem a rendelkezésünkre álló klinikai adatok alapján nem volt magyarázható, ezért úgy döntöttünk, nem zárjuk ki az értéket a további vizsgálatokból. Elvégeztük azonban a számításokat a kiugró érték kizárásával is, és így sem bizonyult szignifikánsnak a különbség. A kiugró értékre való tekintettel

azonban ebben a vizsgálatban medián és interkvartilis tartomány formájában adjuk meg az eredményeket.

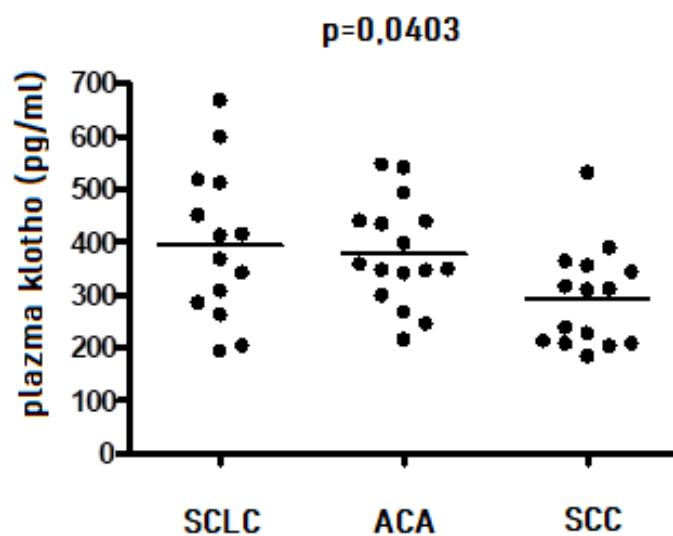


10.ábra. Tüdőrákos páciensek és a kontrollcsoport plazmaklotinho-koncentrációja

4.3.2. Alcsoport-analízisek

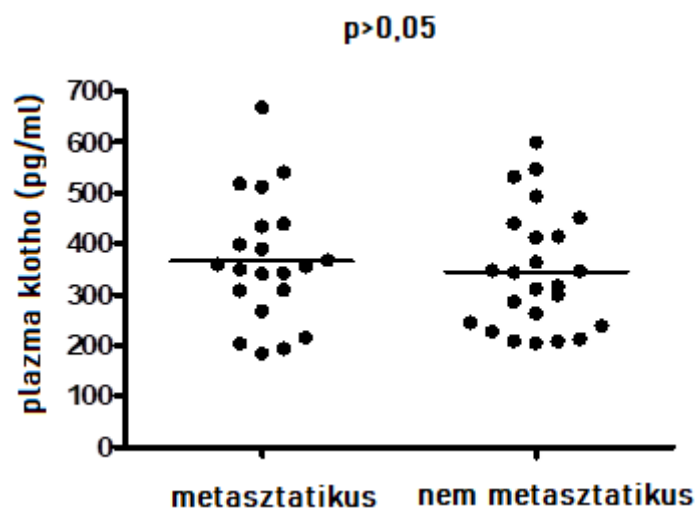
Egyszempontos ANOVA-val vizsgálva szignifikáns különbséget ($p=0,04$) találtunk a három szövettani típus között: adenokarcinóma (353 (329,4-438,5) pg/ml), laphámsejtes karcinóma (308 (209,6-348,1) pg/ml) kissejtes tüdőrák (388,8 (289,9-495,4) pg/ml) (11. ábra). A Tukey-féle poszt-hoc teszt azonban nem mutatott szignifikáns különbséget egyik párosítás esetében sem a szövettani típusok között. Szintén nem volt szignifikáns különbség az egyes szövettani csoportok és az egészségesek között, mint ahogy a kissejtes-nem kissejtes csoportok között sem.

Nem volt különbség a COPD-ben is szenvedő tüdőrákos páciensek és a légúti obstrukciót nem mutató páciensek között, sem a dohányos és ex-dohányos páciensek között.



11.ábra. Különböző szövettani típusokba tartozó tüdőrákos páciensek plazmaklotho-szintje

A betegség súlyosságát tekintve, a IV-es stádiumú páciensek plazmaklotho-szintje (354,2 (306,9-433,3 pg/ml) nem különbözött szignifikánsan azoktól a páciensektől, akiknél távoli metasztázis nem volt jelen (stage I-III) (328,5 (242,5-419,7) pg/ml) (12. ábra).



12.ábra. Páciensek plazmaklotho-koncentrációja metasztatizált és távoli áttétet nem adó tüdőrák esetén

4.4. Plazmaklotho-szint obstruktív alvási apnoe-ben

4.4.1. OSA páciensek klinikai paraméterei

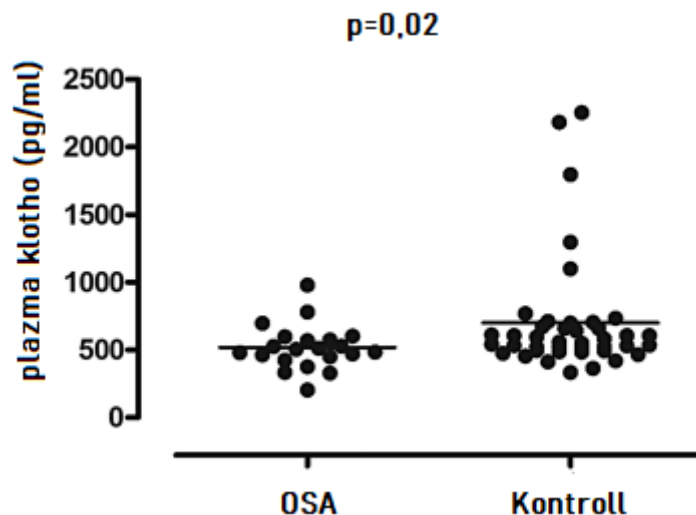
A 62 vizsgált személy közül 21 esetben igazolódott OSA: 12 enyhe (AHI 5 és 14,9/h között), 6 középsúlyos (AHI 15 and 29,9/h között) és 3 súlyos (AHI 30/h fölött) betegség. A betegcsoportban nagyobb volt a férfiak aránya és a hipertóniások, illetve diszlipidémiasok aránya. Az OSA-soknak magasabb volt a BMI-je, szérumszintje, AHI-ja, TST90%-a és ODI-ja, míg a minimális O₂-szaturációjuk szignifikánsan alacsonyabb volt (mindegyik esetben $p < 0,05$). A páciensek és a kontrollcsoport klinikai paramétereit a 4. táblázat mutatja be.

4.táblázat. OSA-s páciensek és a kontrollcsoport klinikai jellemzői

Klinikai jellemzők	OSA (n=21)	Kontroll (n=41)	p
Életkor	55,6±13,2	48±16	n.s.
Nem (ffi/nő)	12/9	8/33	0,004
BMI	27,5±4,8	24,9±4,7	0,045
Dohányzó/Ex-/Nem-dohányzó	5/0/16	2/1/38	n.s.
AHI (1/h)	16,1±10,1	1,9±1,2	<0,001
TST90%	6,2±16,2	0,3±1,4	<0,001
TST (min)	389,8±81,3	383,2±56,9	n.s.
ODI (1/h)	12,5±8,8	1,1±0,9	<0,001
ESS	7,6±4,2	6,5±3,7	n.s.
SPT (min)	422,1±86,6	426,8±48,4	n.s.
AI (1/h)	49,6±24,3	45,3±21	n.s.
MinSat O ₂	85,4±3,7	90,9±2,9	<0,001
OSA súlyosság (n)		n.a.	n.a.
Enyhe (AHI 5-14)	12		
Közepes (AHI 15-29)	6		
Súlyos (AHI >30)	3		
Glükóz (mmol/l)	4,9±0,9	4,8±0,7	n.s.
Koleszterin (mmol/l)	5,4±1,5	5,5±1	n.s.
HDL-C (mmol/l)	1,6±1,2	1,8±0,5	n.s.
LDL-C (mmol/l)	3,2±1,4	3,2±1	n.s.
Triglicerid (mmol/l)	1,6±0,8	1,2±0,6	0,038
CRP (mg/ml)	10,3±22,7	4,5±12,1	n.s.
GFR (ml/min per 1,73 m ²)	90,0±14,5	83,7±16,5	n.s.
Szisztolés vérnyomás reggel (Hgmm)	129,1±10,7	124,3±17,7	n.s.
Diasztolés vérnyomás reggel (Hgmm)	75,7±9,4	78,7±7,8	n.s.
Társbetegségek (igen/nem)			
Hipertónia	13/8	12/29	0,013
Diabétesz	4/17	2/39	n.s.
Diszlipidémia	12/9	12/29	0,033
Cerebro-/kardiovaszkuláris kórkép	4/17	3/38	n.s.
Kardiális aritmia	5/16	4/37	n.s.
COPD	3/18	2/39	n.s.

4.4.2. Egészséges és OSA-s páciensek klothoszintje

A plazma klothokonzentrációja alacsonyabb volt OSA-ban ($519,1 \pm 164,9$ pg/ml) (átlag \pm SD), mint a kontrollcsoportban ($700,8 \pm 431,4$ pg/ml, $p = 0,02$) (13. ábra).



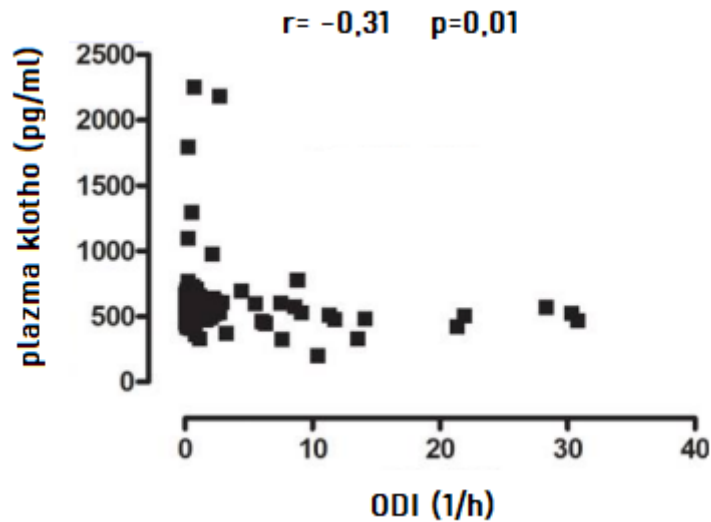
13.ábra. OSA páciensek és a kontrollcsoport plazmaklotho-konzentrációja, a medián érték feltüntetésével.

A kontrollcsoportban 5 kiugró értéket találtunk. Ezek a személyek nem különböztek semmilyen klinikai tulajdonságukban, gyógyszerhasználatban vagy társbetegségben a többiektől. Ezen klothoértékek (>1000 pg/ml) kizárásával csak tendencia volt megfigyelhető az OSA-ban alacsonyabb plazmaklotho-értékre ($519,1 \pm 164,9$ vs. $558,3 \pm 103,4$ pg/ml; $p = 0,10$). Továbbá kizárólag a nem elhízott alanyok vizsgálatakor szintén csak tendencia volt megfigyelhető a klothoszintek között (OSA: $529,1 \pm 186,7$ pg/ml) (kontroll: $712,8 \pm 446,2$ pg/ml; $p = 0,08$).

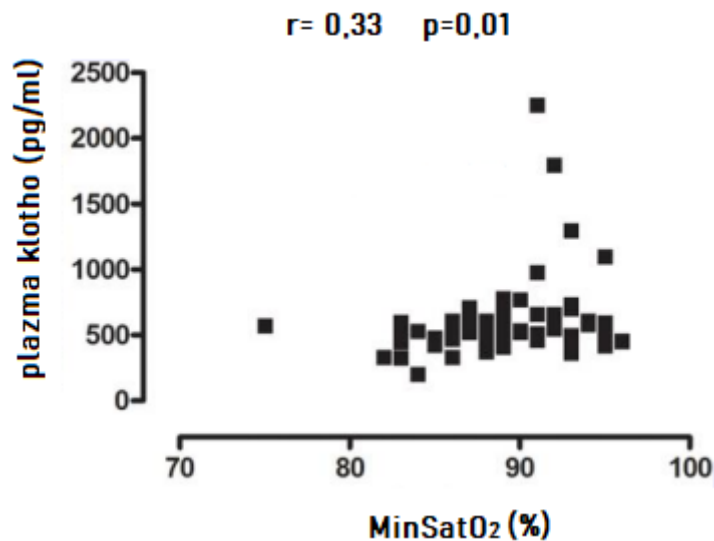
4.4.3. A plazma klothoszintje és az alvásparaméterek közötti kapcsolat

A plazma klothokonzentrációja szignifikáns korrelációt mutatott az éjszakai hipoxémia jellemzőivel, mint az ODI ($r = -0,31$; $p = 0,01$) (14. ábra), TST90% ($r = -0,46$; $p = 0,03$) és minSatO₂ ($r = 0,33$; $p = 0,01$) (15. ábra). Nem volt korreláció az ESS, TST, SPT, AHI és AI értékekkel (mind $p > 0,05$). Az elhízott páciensek kizárását követően a plazma

klothoszintje és az ODI ($r = -0,27$; $p=0,04$), TST90% ($r = -0,45$; $p<0,01$), és minSatO₂ ($r = 0,33$; $p = 0,01$) közötti korreláció továbbra is szignifikáns maradt.



14.ábra. O₂-deszaturációs index és plazma klotho közötti korreláció



15.ábra. Minimális O₂-szaturáció és plazmaklotho-koncentráció közötti korreláció

Kizárólag a betegcsoportot vizsgálva csak a plazma klotho és a TST90% közötti kapcsolat maradt szignifikáns ($r = -0,46$; $p = 0,04$). Ez az összefüggés az elhízott páciensek kizárását követően is fennállt ($r = -0,57$; $p = 0,01$).

4.4.4. A plazma klothoszintje és a klinikai paraméterek közötti kapcsolat

Az összes résztvevőt vizsgálva, a hipertóniás páciensek plazmaklotho-koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb a normotenzíveknél ($504,7 \pm 120,3$ vs. $730,2 \pm 444,9$ pg/ml, $p = 0,02$). COPD-s páciensek esetében az alacsonyabb klothokoncentráció tendenciája volt megfigyelhető ($439,0 \pm 135,3$ vs. $656,8 \pm 381,6$ pg/ml, $p = 0,06$). Szignifikáns negatív korreláció volt a plazma klothokoncentrációja és a szérum trigliceridszintje között ($p = 0,01$, $r = -0,31$). A klothoszint nem korrelált az életkorral, BMI-vel, dohányzási anamnézissel, CRP-vel, teljes koleszterinnel, HDL-C és LDL-C szintekkel vagy a glükózkoncentrációval ($p > 0,05$ minden esetben). Kiemelendő, hogy a számított GFR értékkel sem mutatott korrelációt ($p = 0,19$; $r = -0,17$). Férfiak és nők plazmaklotho-koncentrációja sem tért el egymástól.

Kizárólag a betegcsoportot vizsgálva, a plazma klothoszintje tendenciaszerűen alacsonyabb volt a diabéteszesek körében ($378,7 \pm 140,0$ vs. $552,1 \pm 155,7$ pg/ml; $p = 0,06$). Szignifikáns kapcsolat volt a szolubilis klotho és a szérum HDL-C koncentrációja között ($p = 0,04$; $r = 0,48$) és tendencia negatív korrelációra a trigliceridszint között ($p = 0,058$; $r = -0,43$). A GFR-érték és a klothokoncentrációk között OSA-s páciensek esetén sem volt korreláció ($p > 0,05$).

5. Megbeszélés

Metodikai vizsgálatok

A választott ELISA-kittel megbízhatóan, alacsony intra-assay variabilitással (3,4%) tudtuk mérni a plazma klothokoncentrációját.

A fehérjeszint napok közötti variabilitását stabil COPD-s páciensek körében határoztuk meg, 4,5%-nak adódott. Az alatt a 48 óra alatt, ami a két vérvétel között eltelt, a páciensek a korábbtól eltérő életmódot folytattak. Ez a körülmény befolyásolhatta az eredményeket, ám mivel mindkét mintavétel reggel, legalább 10 óra nyugalmat követően történt, a torzítás minimális lehet. Továbbá, a rehabilitációs program bármely hatása ennyire rövid idő alatt valószínűtlen, hogy kifejeződjön.

A napok közötti variabilitás ismerete segítséget nyújthat a korábbi vizsgálatok értelmezésében, illetve a jövőbeli vizsgálatok tervezésekor. Például, ha azt tapasztaljuk, hogy egy beavatkozás hatására több hónap elteltével statisztikailag szignifikánsan megváltozik a klotho koncentrációja, de ez a változás kisebb, mint a napi variabilitás kétszerese, akkor előfordulhat, hogy a statisztikailag szignifikáns különbség valójában klinikailag nem releváns.

Plazmaklotho-koncentráció elemzése stabil COPD-ben

A légzőszervi rehabilitáció általában a tápláltsági állapot, fizikai kondíció és pszichés státusz javulását eredményezi. Számos pozitív hatása van a COPD-re: javítja a BODE-indexet, életminőséget, fizikai teljesítőképességet és a terhelésre adott kardiovaszkuláris választ, míg csökkenti a nehézlégzést és a terhelés-indukálta oxidatív stresszt (186).

Ez esetünkben sem volt másképp: a 3 hetes kórházi légzőszervi rehabilitációs program számos komponenst tartalmazott, melyek együttesen vezettek az észlelt változásokhoz a teljesítőképességben, betegség-specifikus életminőségben, szorítóerőben és mellkastágulásban. Feltételeztük, hogy ezek a hatások kifejeződnek a klothokoncentráció megváltozásában is. A rendszeres állóképességi tréning mellett a páciensek napi légzőizomtréningen vettek részt, dietetikus ajánlásai alapján összeállított egyéni étrendet kaptak, szükség esetén optimalizálva lett a gyógyszerelés és pszichoszociális támogatásban is részesülhettek.

Gyarapodó evidencia van arra, hogy nemcsak a fizikai aktivitás befolyásolja a klothokoncentrációt, hanem fordítva, a fehérje koncentrációja is befolyásolja az izmok teljesítőképességét.

Annak ellenére, hogy korábbi publikációk mind a szorítóerő, a fizikai teljesítőképesség, a krónikus stressz és a tápláltsági állapot kapcsán leírták, hogy hatással vannak a klothokoncentrációra, a fenti komplex program nem eredményezte a plazmaklothokoncentráció szignifikáns változását COPD-s páciensek esetében.

Egérben a keringő klotho szintjének szignifikáns emelkedését figyelték meg közvetlenül fizikai terhelés után, bár ez a válasz kevésbé volt kifejezett idős egerekben (46). Emberek körében végzett vizsgálatban az akut fizikai terhelés nem változtatott a szolubilis klotho koncentrációján. Ellenben, amikor ugyanezek a páciensek egy hosszú tréningprogramot követően végezték el ugyanazt az akut fizikai terhelést, az már szignifikáns klothoemelkedéshez vezetett. Ez az emelkedés még kifejezettebb volt fiatalok esetében (azonban azt nem vizsgálták, hogy mennyi idő múlva állt vissza az eredeti klothoszint).

Így az egyik lehetséges magyarázat a megfigyelésünkre, hogy mivel az életkorral és a fizikai állóképességről kimutatták, hogy befolyásolja a klotho-választ (46, 55), elképzelhető, hogy az egészséges és beteg személyek is másképpen reagálnak.

Felmerül az is, hogy a 3 hetes periódus túl rövid a nyugalmi plazmaklothokoncentrációban megjelenő változásokhoz. Az a tény, hogy a számos, potenciálisan befolyásoló tényező nem volt hatással a nyugalmi plazmaklotho-koncentrációra, azt is sugallhatja, hogy stabil COPD-ben a fehérje szintje relatíve állandó a keringésben. Ez a magyarázat nem mond ellent azoknak a korábbi eredményeknek, melyek a plazma koncentráció növekedését mutatták ki egészséges poszt-menopauzális nőkben 12 hetes közepesen intenzív aerob mozgásprogramot követően (56). A növekedés aránya, bár statisztikailag szignifikáns volt, az általunk mért napok közötti variabilitásnak kevesebb mint a kétszerese volt.

Plazmaklotho-koncentráció elemzése tüdőrákban

Korábbi ismereteink azt sugallták, hogy különbség lehet az egészséges és tüdőrákos páciensek klothokoncentrációja között. A tüdőrákban észlelt génexpressziócsökkenés (42) alapján alacsonyabb plazmaklotho-koncentrációt vártunk, bár a tüdőrákban

megemelkedett helyi és szisztémás IGF-1 szintek (187) magasabb klothokonzentrációt vetítenének előre. Harmadrészt, a klotho elősegíti az ischemia-indukált angiogenezist (188) és a klotho-hiány az angiogenezis felborulásához vezet (189). A számos ellentmondásos hatásra való tekintettel nehéz megjósolni, hogy emelkedés vagy csökkenés várható-e a klothokonzentrációban, azonban a túlsúlyban lévő protektív mechanizmusok alapján feltételezhetjük, hogy tüdőrákban alacsonyabb a fehérje koncentrációja. Meglepetésre nem találtunk eltérést az egészséges és tüdőrákos alanyok vérmintáiban. Nem világos, hogy ez a jelenség a fenti mechanizmusok egymást kiegyenlítő hatásának eredménye-e, vagy pedig az in vivo mikrokörnyezet stabil koncentrációt tart fenn, esetleg jelenleg még nem ismert kompenzációs mechanizmusokkal kell számolnunk, netán a keringő klotho koncentrációja nem követi a helyi expressziómódosulásokat. Mindent egybevetve, a keringő klotho nem bizonyult ígéretes biomarkernek a tüdőrák szűrésére, korai felismerésére.

A tüdőrákos páciensek és az egészséges kontrollok különböztek dohányzási szokásaikban, ami befolyásolhatta volna az eredményeinket. Azonban korábban méréseinkben ezekről a paraméterekről kiderült, hogy nem befolyásolják a klothoszintet (181). A keringő klotho koncentrációját nem befolyásolja az éppen aktuális dohányzás, és nincs összefüggésben a csomagévben kifejezett dohányzási anamnézissel sem. A COPD fennállása sem befolyásolja a szérum/plazma klotho koncentrációját, és a klotho nem korrelál a FEV1%-el sem. Ezzel összhangban, nem találtunk különbséget a jelenlegi és ex-dohányosok között, sem a COPD-ben is szenvedő és nem COPD-s tüdőrákosok között.

Szintén eltérő klothokonzentrációkat vártunk a daganat szövettani típusának függvényében. Korlátozott kiterjedésű kissejtes tüdőrákban az esetek 60%-ában kimutattak szöveti klotho expressziót (163), míg nagysejtes neuroendokrin carcinomában csak a minták harmadában (164). A mi vizsgálatunkban, bár az ANOVA szignifikáns különbséget mutatott a kissejtes tüdőrákban, adenokarcinomában és laphámrákban mért klotho értékek között, a poszt-hoc teszt nem fedett fel különbséget semelyik két csoport között. Nem volt különbség semelyik szövettani csoport és az egészségesek között sem, így nem értékelhetjük a különbséget klinikailag relevánsnak. Hozzá kell ugyanakkor tenni, hogy a vizsgálatunk statisztikai ereje csak a tüdőrákos és a kontrolles csoport összehasonlítására volt megfelelő, az alsó csoportok összehasonlítására nem.

Usuda és mtsai eredményei, miszerint a klotho expresszió limitált kiterjedésű kissejtes tüdőrákban és nagysejtes neuroendokrin carcinomában is a kedvezőbb kimenetel prediktora (163, 164), mint ahogy az is, hogy a miR-10b mikroRNS (mely fordítottan arányos a túléléssel) negatívan korrelál a klothoval nemkissejtes tüdőrákban (190), azt vetítette előre, hogy metasztatikus tüdőrákban alacsonyabb klothokonzentrációt találunk, mint kevésbé előrehaladott betegségben. Pácienseink esetében nem tudtunk kimutatni semmilyen különbséget a keringő klotho koncentrációjában a tüdőrák I-III, illetve IV stádiumában.

A klothoról feltételezhető volt, hogy tüdőrákban terápiás célpontként szolgálhat, hiszen a génextpresszió mértéke összefüggésben volt a daganatsejtek ciszplatinrezisztenciájával in vitro és egérmodellben, illetve a klotho kiütése növelte a ciszplatinrezisztenciát (162, 123). Továbbá, az IGF1R gátlása szerepet játszhat a tüdőráksejtek reszenzitizációjában egyes gyógyszerekre (191), így a klotho, mint IGF1R-gátló terápiás érdeklődésre tarthat számot. Második lépésben folytatni kívántuk vizsgálatunkat annak elemzésével, hogy a kezdeti klothokonzentráció előrevetíti-e a későbbi platinaérzékenységet, de az első lépésünk negatív eredményeit látva nem tartottuk érdemesnek ezirányban továbbhaladni. Jövőbeli kutatás tárgyát képezheti azonban a szöveti klotho és a szolubilis klotho koncentrációja közötti összefüggés vizsgálata. Bár eredményeink azt sugallják, hogy kevésbé valószínű a szoros összefüggés, ezt szükséges lenne erre a hipotézisre tervezett vizsgálattal tisztázni.

Plazmaklotho-konzentráció elemzése obstruktív alvási apnoe esetén

A klotho szerepének az alvási apnoe-ban való jobb megértéséhez összevetettük a klotho koncentrációkat az alvásszerkezettel, az éjszakai hipoxémia markereivel és az OSA-hoz kapcsolódó társbetegségekkel.

Obstruktív alvási apnoe esetén alacsonyabb plazmaklotho-konzentrációt mértünk. Az alacsonyabb klothoszintek kapcsolatban álltak az éjszakai hipoxémia mértékével és hipertónia jelenlétével. Eredményeink azt jelzik, hogy a klotho szerepet játszhat az OSA patomechanizmusában.

Klothot korábban már tanulmányozták OSA-ban, de a publikációban nem szerepelt a diagnosztikus teszt leírása, sem az, hogy részesültek-e a páciensek bármilyen OSA-

kezelésben (192). A klothoszinteket nem vetették össze klinikai- vagy alvásparaméterekkel. Mindezekkel együtt, a mi eredményeinkkel összhangban ez a tanulmány is szignifikánsan alacsonyabb klothoértékeket mért OSA-ban. A krónikus intermittáló hipoxémia vélhetően szerepet játszik a csökkent klotho-szintézisben, mivel fordított korreláció állt fenn a klothoszintek és az éjszakai hipoxémia markerei között, de nem az apnoe-hipopnoe index között. Megjegyzendő, hogy az OSA-s páciensek legtöbbször közepes súlyos betegsége volt, és elképzelhető, hogy ha több súlyos állapotú páciens került volna bevonásra, szignifikáns lett volna az összefüggés az AHI-val. A hipoxémia a gyulladásos citokinek megnövekedett szintéziséhez vezethet és azok a komponensek, melyek a gyulladás kialakításában szerepet játszanak, mint komplement faktorok, TNF- α vagy interferon- γ , csökkenthetik a vese klothotermelését. A hipoxémia, mint a klothoszintézis esetleges inhibitora, megmagyarázhatja a COPD-ben jelzett eltéréseket, mivel a hipoxémia mértéke a két vizsgálatban részt vevő COPD-seknél eltérő lehetett. A jelenlegi vizsgálatban alacsonyabb plazmaklotho-szinteket találtunk COPD-ben. Azonban ezt óvatosan kell értékelni, hiszen nagyon alacsony volt a betegszám (n=5). Másik lehetséges magyarázat az alacsonyabb klothokoncentrációra a D₃-vitaminhiány lehet OSA-ban, hiszen tudvalevő, hogy a D₃-vitamin serkenti a vese klotho szintézisét. Az azonban nem valószínű, hogy a megzavart alvás, egy másik fontos jelenség OSA-ban, erőteljesen asszociált a klotho expresszióval, hiszen nem találtunk korrelációt a klothoszintek és az alvásszerkezet markerei (TST, AI) vagy a nappali álmoság (ESS) között.

Az alacsonyabb klothoszintek hozzájárulhatnak az OSA patomechanizmusához. A klotho csökkenti a gyulladásos molekulák expresszióját és szekrécióját, mint az intercelluláris adhéziós molekula-1 (193), az IL-6 (194) vagy IL-8 (195), melyek OSA-ban mind emelkedtek (196). A klotho az oxidatív stresszt is képes csökkenteni (22). Így a klotho expresszió csökkenése hozzájárulhat a megemelkedett szisztémás gyulladáshoz és oxidatív stresszhez. Annak ellenére, hogy mi nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a CRP és klotho értékek között, azoknak a gyulladásos mediátoroknak az elemzése, melyek összefüggésben vannak a klothoval, segíthet a klotho OSA-ban betöltött esetleges gyulladáscsökkentő szerepének megértésében.

Korábbi vizsgálattal összhangban (197), hipertóniás pácienseknél is alacsonyabb klothokoncentrációkat mértünk. A klotho gátlása megnövekedett aldosterontermeléssel

és következményes hipertóniával jár egérben (198). OSA-ban hiperaldoszteronizmus figyelhető meg, és ez szerepet játszik az OSA-hoz kapcsolt hipertóniában (199). A klotho szintén indukálja az eNOS szintézisét (35). Így a csökkent klothokonzentráció OSA-ban hozzájárulhat az OSA-ban gyakran előforduló endothel diszfunkcióhoz (200). A klotho-hiány a vese szerkezetének károsodásához vezet (glomerulusok kollapszusa, tubulus fibrózis) és funkciócsökkenéshez (198). OSA-ban a veseelégtelenség előfordulása gyakoribb (201), ami szintén hozzájárulhat a hipertónia kialakulásához. Megjegyzendő, hogy vizsgálatunkban kizártuk a veseelégtelen pácienseket, mert a vesefunkció önmagában is befolyásolhatja a klothotermelést. Nem volt szignifikáns különbség a két csoport GFR értékei között, ez magyarázhatja a GFR és klothoérték közötti korreláció hiányát.

Az OSA-s páciensek kb. 70%-a elhízott (202). A kórosan elhízott páciensek klothoszintjét korábbi vizsgálat alacsonyabbnak találta, bár a szerzők nem vették figyelembe az OSA-t, mint kovariánst (57). Az elhízás önmagában is szisztémás gyulladást idézhet elő (203), mely alacsonyabb klothoszintekhez vezethet. Bár az OSA csoport BMI-je szignifikánsan magasabb volt, nem figyelhető meg korreláció a BMI és a klothoértékek között, mely összhangban áll a COPD-s vizsgálatunk eredményeivel (181), de megjegyzendő, hogy vizsgálatunkban a legtöbb személy BMI-je a normál tartományon belül volt.

Az elhízás jelentette esetleges torzítás vizsgálatára alsó csoport analízist végeztünk nem elhízott résztvevők körében. Kiemelendő, hogy a plazmaklotho-szintek és az éjszakai hipoxémia markerei közötti kapcsolat szignifikáns maradt a nem elhízott populációban is. Bár ahhoz, hogy az elhízás hatását vizsgáljuk OSA-ban, további vizsgálatokra van szükség, melyek OSA-s és nem OSA-s elhízott személyeket hasonlítanak össze. Tudvalevő, hogy a derék-csípő arány jobb prediktora a metabolikus szindrómának, mint a BMI (204), azonban ezt nem rögzítettük a vizsgálatunk során. A vizsgálat statisztikai ereje (power) az éjszakai hipoxémia markerei és a plazmaklotho-szintek közötti szignifikáns korreláció megtalálására volt kiszámítva. Bár minden páciens OSA gyanújával utaltak be, részben biztosan a viszonylag szigorú beválogatási kritériumok miatt, de a vizsgált populáció a páciensek és kontrollok arányában nem egyforma. Ez egy valószínű limitáció, melyet további vizsgálatok esetén kezelni kell. Továbbá, vizsgálatunk pácienseinek kórképe relatíve enyhe, így az éjszakai hipoxémia erőssége

sem kifejezetten magas. A limitáció ellenére szignifikáns fordított kapcsolatot találtunk az éjszakai hipoxémia és a plazma klothokoncentrációja között még enyhe megbetegedés esetén is, ami felveti, hogy ez a kapcsolat még robosztusabb lehet súlyosabb páciensek vizsgálatakor. Tehát, annak érdekében, hogy megértsük a klotho szerepét a betegség patomechanizmusában és a kapcsolódó társbetegségekben, súlyosabb állapotú páciensek bevonása is szükséges. Megjegyzendő, hogy a súlyosabb OSA nagyobb valószínűséggel társul elhízással, illetve szív- és érrendszeri megbetegedéssel, melyek alacsonyabb klotho szinttel járnak (57, 74). Ezek a társbetegségek torzíthatják a klothoértékek értékelését súlyos OSA-ban. Továbbá, az elhízott OSA-betegek súlyosabb éjszakai hipoxémiával jobban kitettek az éjszakai hipoventilációnak és a következményes éjszakai és nappali hiperkapniának. A hiperkapnia önmagában is befolyásolhatja a szisztémás gyulladást. Például tompíthatja a TNF- α választ (205), ezáltal elméletileg magasabb klothoszinteket eredményezve. Ebből kifolyólag, értékes lenne súlyosabb OSA-sokat vizsgálni magasabb éjszakai hipoxémiával (TST90%>10%) hiperkapniával vagy anélkül.

Az elhízás és önmagában az OSA klothoszintet befolyásoló hatását célszerű lenne jövőbeli vizsgálatok során elkülöníteni. Erre kézenfekvő lehetőséget jelenthet az OSA rövidtávú (néhány hónapos) CPAP-kezelése, mely a hipoxémiával kapcsolatos paramétereket jelentősen javítja, a testsúly azonban nem változik vagy minimálisan emelkedik. Jelen vizsgálatunk résztvevői közül egyik páciens sem részesült korábban OSA-kezelésben.

A vizsgálatunk alapul szolgálhat a későbbi vizsgálatok szükséges esetszámának megbecsüléséhez. Hasznos lenne továbbá felderíteni, hogy a klotho szolgálhat-e biomarkerként a társbetegségek nagyobb előfordulási valószínűségére, vagy hogy van-e bármilyen terápiás potenciálja a komplikációk megelőzésében.

Általános észrevételek

Figyelemreméltó a különbség a tüdőrákos vizsgálatban mért klothokoncentrációk és a további vizsgálataink közel azonos tartományba eső klothoértékei között (5. táblázat).

5.táblázat. Plazmaklotho-értékek az egyes vizsgálatainkban

	COPD	Tüdőrák		OSA	
	beteg	kontroll	beteg	kontroll	beteg
Klotho (medián (IQR)) (pg/ml)	483 (438 - 597)	383,5 (304,6 - 489,7)	366,3 (257,9- 486,8)	559 (496,3 - 672,9)	506 (449,6 - 575,5)
Életkor (átlag±SD) (év)	63,9±7,9	62,3±6,8	65,1±7,9	48±16	55,6±13,2

Az egyes vizsgálatok mintavételi és mintafeldolgozási protokollja megegyezett, egy eltéréssel: a COPD-s és tüdőrákos betegek vizsgálata során EDTA-s vérvételi csövet használtunk, alvási apnoés betegek esetén pedig citrátos csövet.

A COPD-s betegcsoportban csak reggel történt vérvétel, a többi csoportban napszakra való tekintet nélkül. Azonban nem gondoljuk, hogy ezek a faktorok hatással lehetnének a mért értékekre. Az életkor szintén nem tehető önmagában felelőssé a különbségekért. Elhízás előfordult a COPD-s csoportban, illetve gyakori volt az OSA-s csoportban, de a BMI több elemzésünk alapján egyöntetűen nem korrelált a klotho koncentrációkkal. A tüdőrákos vizsgálat során utólagos elemzéssel sem találtunk olyan szisztematikus torzító tényezőt, mely a kontroll és a betegcsoportban egyaránt alacsonyabb értékeket eredményezett volna. Szerepet játszhatott esetleg az, hogy a négy különböző vizsgálat négy különböző időpontban zajlott, és mindig csak az adott vizsgálathoz vásároltuk meg az ELISA kiteket. Nincs informáciánk arra vonatkozóan, hogy a gyártási tétel bármilyen befolyással lenne a mért értékekre, de a fentiek alapján, az eredmények összehasonlíthatósága szempontjából talán felhívhatjuk a figyelmet az egyidejűleg történő mérés esetleges jelentőségére.

Egyes páciensek esetében kiugróan magas plazmaklotho-koncentrációt mértünk. Ezek a páciensek nem különböztek sem demográfiai vagy klinikai jellemzőikben, sem társbetegségeiket illetően, sem gyógyszereszedésben. A magas klothoszint okát nem tudtuk felderíteni. A bevezetésben részletezettek szerint akromegáliában ismertek a kiugró, akár tízszeres klothoszint-emelkedések, azonban az általunk mért 1500-2000 pg/ml körüli értékekre nem találtunk az irodalomban megnyugtató magyarázatot. Annak

érdekében, hogy a jövőben kezelni tudjuk ezeket a kiugró értékeket, megalapozottan dönthessünk a páciensek kizárásáról vagy vizsgálatban való benntartásáról, további ismereteket kell szereznünk a kiugró értékek lehetséges okairól.

6. Következtetés

A plazma klotho koncentrációja megbízhatóan mérhető az általunk használt ELISA kittel.

A plazma klotho koncentrációjának napi variabilitása stabil COPD-ben nem éri el az intra-assay variabilitás kétszeresét.

Stabil COPD-s páciensek esetében a fehérje nem mutat összefüggést a klinikai paraméterekkel. A rehabilitációs program hatására bekövetkező klinikai állapotjavulás ellenére a plazma klotho szint stabil marad. Jelen vizsgálataink alapján a plazma klotho koncentrációja nem tekinthető a COPD ígéretes biomarkerének.

Azon hipotézisünk tehát, miszerint COPD-s páciensek plazmaklotho-koncentrációja komplex tüdőgyógyászati rehabilitációs program hatására megemelkedik, nem bizonyult helytállóknak, eredményeink szerint értéke nem változik.

Tüdődrákos páciensek körében végzett vizsgálatunk eredményei, miszerint a plazma klothokonzentrációja nem különbözik az egészségesekétől, és nem mutat összefüggést a daganat stádiumával és típusával, azt sugallja, hogy a keringő klotho nem tekinthető a betegség potenciális biomarkerének.

Azon hipotézisünk tehát, miszerint a csökkent klotho mRNS-szintekhez hasonlóan a plazma klothofehérje-koncentrációja is csökken tüdőrákban, és változhat a szövettani típusnak és a betegség stádiumának függvényében, nem bizonyult helytállóknak, eredményeink szerint értéke nem változik. Negatív eredményeink ismeretében kutatásunkat nem folytattuk a proliferatív és metasztázisképző potenciál, a túlélés és a platinaérzékenység előrejelzésének feltárása irányában.

Kimutattuk, hogy a szolubilis klotho koncentrációja csökkent OSA-ban. Az alacsonyabb klotho koncentrációk a krónikus intermittáló hipoxémia következményei lehetnek, és szerepet játszhatnak a szisztémás gyulladás, az endothel diszfunkció és a társbetegségek kialakulásának felgyorsításában.

Azon hipotézisünk tehát, miszerint obstruktív alvási apnoe alacsonyabb plazmaklotho-koncentrációkkal jár, és utóbbi összefüggésben áll a betegség klinikai paramétereivel, helytállóknak bizonyult.

Az, hogy COPD-s és tüdőrákos páciensek plazmaklotho-koncentrációja nem különbözött az egészségesekétől, természetesen nem zárja ki a klotho lehetséges szerepét a kórképek patomechanizmusában. Egyfelől az egyes társbetegségek befolyásoló szerepét nem vizsgáltuk, másfelől pedig további vizsgálatok szükségesek a szöveti klothoexpresszió és a keringő klotho kapcsolatának értékeléséhez, illetve a tüdőben zajló helyi folyamatok szisztémás klothoszintre kifejtett hatásának megismeréséhez. Tekintettel arra, hogy a klothokoncentrációt a D₃-vitamin szintje is befolyásolja, javasolható lenne a jövőben D₃-vitamin-szintet is mérni, esetleg D₃-vitamin-szintre normalizálni a klothoértékeket, illetve tájékozódni a páciensek vitaminpótlási szokásairól.

Szintén jövőbeli kutatások tárgyát képezheti az FGF23-klotho arány vizsgálata, ugyanis az FGF23 hatása módosulhat változatlan klotho koncentráció mellett, felborult FGF23-klotho egyensúly mellett is.

A klothokoncentráció időbeli változásainak megítéléséhez is további vizsgálatok szükségesek, melyek a klothoszint-változások dinamikájára fókuszálnak akut beavatkozások hatására. A vázizomaktivitás és a klothokoncentráció közötti kapcsolat értelmezését megkönnyítendő, a klinikailag releváns változás meghatározása döntő jelentőséggel bír.

7. Összefoglalás

A klotho gén kiütése egérmodellben öregedésre jellemző tünetegyüttest eredményez. Az érintett állatok visszamaradnak a növekedésben, érlemeszedés és lágyszöveti kalcifikáció, bőratrófia, gonadális diszplázia, terméketlenség, csontritkulás, emfizéma, illetve súlyos hiperfoszfátémia alakul ki, valamint az élethossz is lerövidül. Klotho-overexpresszáló egerek élethossza ezzel szemben megnövekedett.

A klotho fehérje elsődlegesen a vesében termelődik. Hatásmechanizmusa rendkívül szerteágazó, parakrin és endokrin folyamatokból áll. Kiemelendő, hogy az FGF23 koreceptoraként csökkenti a keringő foszfát- és kalciumszintet; a D₃-vitamin szintjét, illetve az inzulin/IGF-1 jelátvitel blokkolásával gátolja a sejtöregedést.

Ígéretes diagnosztikus és terápiás célpontként tekintünk rá krónikus veseelégtelenségben, de felmerült a potenciális biomarker-, illetve terápiás szerepe légzőszervi megbetegedésekben is, kiemelten az idős korra jellemző kórképek, mint a COPD, tüdőrák és OSA esetén. COPD-ben elsősorban az autofágia szabályozása, tüdőrákban a Wnt-jelátvitel gátlása, OSA-ban az emelkedett oxidatív stressz irányította rá a figyelmet.

Kutatásaink során vizsgáltuk a plazmaklotho-koncentráció napok közötti variabilitását; stabil COPD-ben az esetleges összefüggést a klothoszint és a klinikai állapot között, illetve, hogy változik-e a klothoszint légzőszervi rehabilitáció és következményes állapotjavulás hatására. Tüdőrák esetén változik-e a klothoszint, összefüggésben áll-e a daganat típusával és súlyosságával; valamint, hogy obstruktív alvási apnoe fennállása befolyásolja-e a klothokoncentrációt, és összefügg-e a betegség klinikai paramétereivel.

Megállapítottuk, hogy a plazma klotho koncentrációjának napok közötti variabilitása alacsony (4,5%). Stabil COPD-s páciensek és egészséges személyek klothoszintje nem különbözik, és nincs összefüggés a betegség klinikai paramétereivel és a klothoszintek között, ahogy az állapotjavulással járó légzőszervi rehabilitációs program hatására sem változik a klothoszint. Tüdőrákos páciensek klothoszintje sem tér el szignifikánsan az egészségesekétől, ahogy nincs összefüggésben a fehérje koncentrációja a betegség típusával és stádiumával sem. OSA-s páciensek keringő klotho szintje szignifikánsan alacsonyabb az egészségesekénél, és korrelációt mutat az éjszakai hipoxémia paramétereivel.

8. Summary

In rodent models, knockout of the klotho gene results in a set of symptoms characteristic of aging. Affected animals are retarded in growth, suffer from atherosclerosis and soft tissue calcification, skin atrophy, gonadal dysplasia, infertility, osteoporosis, emphysema, develop severe hyperphosphatemia, and their lifespan is shortened. Klotho-overexpressing mice, on the other hand, have an increased lifespan.

Klotho protein is primarily produced in the kidneys. Its mechanism of action is extremely diverse, consisting of paracrine and endocrine processes. As a co-receptor of FGF23, it reduces circulating phosphate and calcium levels, as well as vitamin D₃ levels, and inhibits aging of cells by blocking the insulin/IGF-1 signaling.

It is a promising therapeutic target in chronic kidney failure, but it is suggested to have potential biomarker and therapeutic role in respiratory diseases, especially in the case of diseases characteristic of old age, such as COPD, lung cancer and OSA. In COPD, attention was mainly focused on the regulation of autophagy; in lung cancer, the inhibition of Wnt signaling, and increased oxidative stress in OSA.

We investigated the between-day variability of plasma klotho concentration. In stable COPD patients, we assessed if there is a correlation between klotho level and the clinical condition, and whether the concentration changes after respiratory rehabilitation and general improvement. In lung cancer, we assessed whether klotho level changes, and if it is related to the type and severity of the disease. We investigated if obstructive sleep apnea affects the klotho concentration and if it correlates with clinical parameters of the disease.

We found that between-day variability of plasma klotho concentration is 4.5%. The plasma klotho levels of stable COPD patients and healthy individuals do not differ from each other, and there is no correlation between the clinical parameters of the disease and the klotho levels, just as the klotho level does not change as a result of a respiratory rehabilitation program that improves patients' condition. The circulating klotho level of lung cancer patients does not differ significantly from that of healthy ones, just as the concentration of the protein is not related to the type and stage of the disease. The circulating klotho level of OSA patients is significantly lower than that of healthy subjects, and it showed a correlation with parameters of nocturnal hypoxia.

9. Irodalomjegyzék

1. Arcanum Digitális Tudománytár. Ki kicsoda az antik mítoszokban? [Internet] 2022 (cited 2022. Nov 22.) Available from: <https://www.arcanum.com/hu/online-kiadvanyok/Lexikonok-ki-kicsoda-az-antik-mitoszokban-F869D/m-F8ADD/moirak-F8B48/>
2. Szépművészeti Múzeum. Lexikon. [Internet] 2022 (cited 2022. Nov 22.) Available from: <http://www2.szepmuveszeti.hu/hyperion/lexikon.php?s=fatum>
3. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997; 390:45-51
4. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science*. 2005; 309:1829-1833
5. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M. Tissue-specific Expression of β Klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem*. 2007; 282:26687-26695
6. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Kuro-o M. β Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *PNAS*. 2007; 104:7432-7437
7. <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=14498&showAllSites=true>
8. Xu Y, Sun Z. Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. *Endocr Rev*. 2015; 36:174–193
9. Phospho Site Plus. [Internet] 2022. (cited: 2022. Nov 22.) Available from: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=19460&showAllSites=true>
10. Hori S, Miyake M, Tatsumi Y, Morizawa Y, Nakai Y, Onishi S, Onishi K, Iida K, Gotoh D, Tanaka N, Fujimoto K. Gamma-Klotho exhibits multiple roles in tumor growth of human bladder cancer. *Oncotarget*. 2018; 9:19508-19524

11. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 242:626-630
12. Loon EPM, Pulskens WP, Hagen EAE, Lavrijsen M, Vervloet MG, Goor H, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. Shedding of klotho by ADAMs in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015; 309:359–368
13. Mencke R, Harms G, Moser J, Meurs M, Diepstra A, Leuvenink HG, Hillebrands J. Human alternative Klotho mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease. *JCI Insight.* 2017; 2:e94375
14. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010; 24:3438-50
15. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 2004; 565:143–147
16. Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, James S, Wilkinson IB, Ting S, Hsiao L, Hiemstra TF, Zehnder D. α Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100:1308 -1318
17. The human protein atlas. [Internet] 2022 (cited 2022. Nov 22.) Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133116-KL/tissue>
18. Dalton GD, Xie J, An SW, Huang CL. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol.* 2017; 8:323
19. Kim JH, Hwang KH, Park KS, Kong ID, Cha SK. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. *J Lifestyle Med.* 2015; 5:1-6.
20. Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, Sonomura K, Adachi Y, Shibuya M, Shirayama T, Tanda S, Hatta T, Sasaki S, Mori Y, Matsubara H. Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca^{2+} channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:19308-19313
21. Bian A, Neyra JA, Zhan M, Hu MC. Klotho, stem cells, and aging. *Clin Interv Aging.* 2015; 10:1233-1243

22. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem.* 2005; 280:38029-38034
23. Kuro-o M. Klotho and the Aging Process. *Korean J Intern Med.* 2011; 26: 113-122
24. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004; 19:429-435
25. Medici D, Razzaque MS, Deluca S, Rector TL, Hou B, Kang K, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-O M, Olsen BR, Lanske B. FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2008; 182:459-465
26. Kanai G, Kakuta T, Cozzolino M, Fukagawa M. PTH Regulation by the Klotho/FGF23 Axis in CKD. In Covic A, Goldsmith D, Urena TP. *Parathyroid Glands in Chronic Kidney Disease.* Springer, Cham 2020; 21-34
27. Hu MC, Shi M, Moe OW. Role of α Klotho and FGF23 in regulation of type II Na-dependent phosphate co-transporters. *Pflugers Arch.* 2019; 471:99-108.
28. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 2005; 310:490-493.
29. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science.* 2007; 317:803-806
30. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, Chihara Y, Kida I, Ogihara T. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339:827-32
31. Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, Yang J, Imai M, Ikushima M, Maekawa Y, Kida I, Miyazaki J, Ogihara T. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine.* 2007; 31:82-87
32. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-O M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem.* 2011; 286:8655-8665

33. Martin H, de Borst, Marc G, Vervloet, Piet M, ter Wee and Gerjan Navis. Cross Talk Between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Vitamin D-FGF-23-klotho in Chronic Kidney Disease. *JASN*. 2011; 22:1603-1609
34. Typiak M, Piwkowska A. Antiinflammatory Actions of Klotho: Implications for Therapy of Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2021; 22:956.
35. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Matsumura Y, Masuda H, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 248: 324-329
36. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine*. 2009; 35:341-346.
37. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:254-62.
38. Martín-Núñez E, Donate-Correa J, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Implications of Klotho in vascular health and disease. *World J Cardiol*. 2014; 6:1262-1269
39. Zhou X, Chen K, Wang Y, Schuman M, Lei H, Sun Z. Antiaging Gene Klotho Regulates Adrenal CYP11B2 Expression and Aldosterone Synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27:1765-1776
40. Zhu Y, Xu L, Zhang J, Xu W, Liu Y, Yin H, Lv T, An H, Liu L, He H, Zhang H, Liu J, Xu J, Lin Z. Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3 β /Snail signaling in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2013; 104:663-671
41. Dai D, Wang Q, Li X, Liu J, Ma X, Xu W. Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1. *Oncol Rep*. 2016; 35:552-8
42. Chen B, Ma X, Liu S, Zhao W, Wu J. Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. *Cancer Biol Ther*. 2012; 13:1221-8

43. Brown RB, Razzaque MS. Phosphate toxicity and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018; 1869: 303-309
44. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 398:513-518
45. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L. Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011; 66:794-800
46. Avin KG, Coen PM, Huang W, Stolz DB, Sowa GA, Dube JJ, Goodpaster BH, O'Doherty RM, Ambrosio F. Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, klotho. *Front Physiol*. 2014; 5:189
47. Amaro-Gahete FJ, de-la-O A, Jurado-Fasoli L, Gutiérrez Á, Ruiz JR, Castillo MJ. Association of physical activity and fitness with S-Klotho plasma levels in middle-aged sedentary adults: The FIT-AGEING study. *Maturitas*. 2019; 123:25-31
48. Metter EJ, Talbot LA, Schrager M, Conwit R. Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality among healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002; 57:B359–B365.
49. Kim J. Handgrip Strength to Predict the Risk of All-Cause and Premature Mortality in Korean Adults: A 10-Year Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 19:39.
50. Cai, Y., Liu, L., Wang, J. et al. Linear association between grip strength and all-cause mortality among the elderly: results from the SHARE study. *Aging Clin Exp Res*. 2021; 33:933–941
51. Baldan A, Giusti A, Bosi C, Malaventura C, Musso M, Forni GL, et al. Klotho, a new marker for osteoporosis and muscle strength in β thalassemia major. *Blood Cells, Mol Dis*. 2015; 55:396–401.
52. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Simonsick E, Turner R, Miljkovic I, Harris T, Schwartz AV, Asao K, Kritchevsky S, Newman AB; Health ABC Study. Low Plasma

- Klotho Concentrations and Decline of Knee Strength in Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016; 71:103-108
53. Patel MS, Donaldson AV, Lewis A, Natanek SA, Lee JY, Andersson YM, Haji G, Jackson G, Bolognese BJ, Foley JP, Podolin PL, Bruijnzeel PLB, Hart N, Hopkinson NS, Man W, Kemp PR, Polkey MI. Klotho and smoking—an interplay influencing the skeletal muscle function deficits that occur in COPD. *Respir Med*. 2016; 113:50–56
54. Mostafidi E, Moeen A, Nasri H, Ghorbani Hagjo A, Ardalan M. Serum Klotho Levels in Trained Athletes. *Nephrourol Mon*. 2016; 8: e30245
55. Phelps M, Pettan-Brewer C, Ladiges W, Yablonka-Reuveni Z. Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice. *Biogerontology*. 2013; 14:729-739
56. Matsubara T, Miyaki A, Akazawa N, Choi Y, Ra SG, Tanahashi K, et al. Aerobic exercise training increases plasma klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 306:H348–H345
57. Amitani M, Asakawa H, Amitani H, Kaimoto K, Sameshima N, Koyama KI, et al. Plasma klotho levels decrease in both anorexia nervosa and obesity. *Nutrition*. 2013; 29:1106-1109
58. Prather AA, Epel ES, Arenander J, Broestl L, Garay BI, Wang D, Dubal DB. Longevity factor klotho and chronic psychological stress. *Transl Psychiatry*. 2015; 5:e585
59. Zubkiewicz-Kucharska A, Wikiera B, Noczyńska A. Soluble Klotho Is Decreased in Children With Type 1 Diabetes and Correlated With Metabolic Control. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12:709564
60. Sze L, Bernays RL, Zwimpfer C, Wiesli P, Brändle M, Schmid C. Excessively high soluble Klotho in patients with acromegaly. *J Intern Med*. 2012; 272:93-97.
61. Neidert MC, Sze L, Zwimpfer C, Sarnthein J, Seifert B, Frei K, Leske H, Rushing EJ, Schmid C, Bernays R. Soluble alphaKlotho: a novel serum biomarker for the activity of GH-producing pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2013; 168: 575-83.
62. Kohler S, Tschopp O, Sze L, Neidert M, Bernays RL, Spanaus KS, Wiesli P, Schmid C. Monitoring for potential residual disease activity by serum insulin-like growth factor 1 and soluble Klotho in patients with acromegaly after pituitary surgery: is there

- an impact of the genomic deletion of exon 3 in the growth hormone receptor (d3-GHR) gene on "safe" GH cut-off values? *Gen Comp Endocrinol.* 2013; 188:282-287
63. Lu L, Katsaros D, Wiley A, de la Longrais IA, Puopolo M, Yu H. Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression. *Cancer Invest.* 2008; 26:185-92
64. Yan Y, Wang Y, Xiong Y, Lin X, Zhou P, Chen Z. Reduced Klotho expression contributes to poor survival rates in human patients with ovarian cancer, and overexpression of Klotho inhibits the progression of ovarian cancer partly via the inhibition of systemic inflammation in nude mice. *Mol Med Rep.* 2017; 15:1777-1785
65. Huang S, Wang W, Cheng Y, Lin J, Wang M. Clinicopathological and Prognostic Significance of Klotho and Estrogen Receptors Expression in Human Hepatocellular Carcinoma. *Turk J Gastroenterol.* 2021; 32:828-836
66. Peshes-Yeloz N, Ungar L, Wohl A, Jacoby E, Fisher T, Leitner M, Nass D, Rubinek T, Wolf I, Cohen ZR. Role of Klotho Protein in Tumor Genesis, Cancer Progression, and Prognosis in Patients with High-Grade Glioma. *World Neurosurgery.* 2009; 130:e324-e332
67. Navarro-García JA, Rueda A, Romero-García T, Aceves-Ripoll J, Rodríguez-Sánchez E, González-Lafuente L, Zaragoza C, Fernández-Velasco M, Kuro-O M, Ruilope LM, Ruiz-Hurtado G. Enhanced Klotho availability protects against cardiac dysfunction induced by uraemic cardiomyopathy by regulating Ca²⁺ handling. *Br J Pharmacol.* 2020; 177:4701-4719
68. Heng-chih P, Kuei-Mei C, Chin-Chan L, Ning-I Y, Chiao-Yin S. Circulating Klotho levels can predict long-term macrovascular outcomes in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2018; 276:83-90
69. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW: Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22:124–136.
70. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol.* 2013; 180:47-63
71. Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, Numata A, Yamazaki T, Takeshima E, Iwazu K, Komada T, Otani N, Morishita Y, Ito C, Shiizaki K, Ando Y, Muto S, Kuro-o M,

- Kusano E. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2012; 13:155
72. Qian J, Zhong J, Yan M, Cheng P, Shi H, Hao C, Gu Y, Lai L. Circulating α -Klotho is Related to Plasma Aldosterone and Its Follow-Up Change Predicts CKD Progression. *Kidney Blood Press Res.* 2018; 43:836-846
73. Kanbay M, Demiray A, Afsar B, Covic A, Tapoi L, Ureche C, Ortiz A. Role of Klotho in the Development of Essential Hypertension. *Hypertension.* 2021; 77:740-750
74. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatr Soc.* 2011; 59: 1596-1601
75. Navarro-González JF, Donate-Correa J, Muros de Fuentes M, Pérez-Hernández H, Martínez-Sanz R, Mora-Fernández C. Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Heart.* 2014; 100:34-40
76. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.* 2005; 96: 412-418
77. Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation.* 2004; 110:1148-55
78. John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis.* 2011; 58: 127-34
79. Razzaque MS. FGF23, klotho and vitamin D interactions: What have we learned from in vivo mouse genetics studies? *Adv Exp Med Biol.* 2012; 728: 84-91
80. Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest.* 1999; 104:229-37
81. Kim JH, Hwang KH, Lkhagvadorj S, Jung JH, Chung HC, Park KS, Kong ID, Eom M, Cha SK. Klotho plays a critical role in clear cell renal cell carcinoma progression and clinical outcome. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2016; 20: 297-304
82. Tang X, Wang Y, Fan Z, Ji G, Wang M, Lin J, Huang S, Meltzer SJ. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2016; 96: 197-205

83. Gigante M, Lucarelli G, Divella C, Netti GS, Pontrelli P, Cafiero C, Grandaliano G, Castellano G, Rutigliano M, Stallone G, Bettocchi C, Ditunno P, Gesualdo L, Battaglia M, Ranieri E. Soluble serum α klotho is a potential predictive marker of disease progression in clear cell renal cell carcinoma. *Medicine*. 2015; 94: e1917
84. Rubinek T, Modan-Moses D. Klotho and the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor 1 Axis: Novel Insights into Complex Interactions. *Vitamins&Hormones*. 2016; 101: 85-118
85. Izquierdo MC, Perez-Gomez MV, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, Poveda J, Moreno JA, Egido J, Ortiz A. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27 Suppl 4:iv6-10
86. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol*. 2005;101(2):e67-74
87. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153: 1194-217
88. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361:1475–1485
89. Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol*. 1996; 31:443–448
90. Campisi J, di Fagagna FA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:729–740
91. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*. 2012; 4:166–175
92. Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1206: 67-83
93. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010; 328:321-326
94. Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell*. 2009; 5:279–289

95. Barbieri M, Bonafé M, Franceschi C, Paolisso G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285:E1064-1071
96. de Oliveira RM. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* 2006; 580:5753-5758
97. Tang X, Wang Y, Fan Z, Ji G, Wang M, Lin J, Huang S, Meltzer SJ. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2016; 96:197-205
98. Rasmussen ML, Ortolano NA, Romero-Morales AI, Gama V. Wnt Signaling and Its Impact on Mitochondrial and Cell Cycle Dynamics in Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel).* 2018; 9:109
99. Shiraki-Iida T, Iida A, Nabeshima Y, Anazawa H, Nishikawa S, Noda M, Kuro-o M, Nabeshima Y. Improvement of multiple pathophysiological phenotypes of klotho (kl/kl) mice by adenovirus-mediated expression of the klotho gene. *J Gene Med.* 2000; 2:233-242
100. Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro-O M, Moe OW. Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int.* 2017; 91:1104-1114
101. Davidsohn N, Pezone M, Vernet A, Graveline A, Oliver D, Slomovic S, Punthambaker S, Sun X, Liao R, Bonventre JV, Church GM. A single combination gene therapy treats multiple age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019; 116:23505-23511
102. Abraham C.R., Chen C., Cuny G.D., Glicksman M.A., Zeldich E. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Futur Med Chem.* 2012; 4:1671–1679
103. Farinelli P, Arango-Gonzalez B, Völkl J, Alesutan I, Lang F, Zrenner E, Paquet-Durand F, Ekström PA. Retinitis Pigmentosa: over-expression of anti-ageing protein Klotho in degenerating photoreceptors. *J Neurochem.* 2013; 127:868-879
104. Brownstein CA, Adler F, Nelson-Williams C, Iijima J, Li P, Imura A, Nabeshima Y, Reyes-Mugica M, Carpenter TO, Lifton RP. A translocation causing increased

- alpha-klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:3455-3460
105. Arroyo E, Troutman AD, Moorthi RN, Avin KG, Coggan AR, Lim K. Klotho: An Emerging Factor With Ergogenic Potential. *Front Rehabil Sci*. 2022; 2:807123
 106. Pedersen, L.; Pedersen, S.M.; Brasen, C.L.; Rasmussen, L.M. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clin Biochem*. 2013, 46:1079–1083
 107. Grabner, A.; Faul, C. The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho in uremic cardiomyopathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016; 25:314–324
 108. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int*. 2010; 78:1240–1251.
 109. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:124-36
 110. Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro-O M, Moe OW. Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int*. 2017; 91:1104-1114
 111. Zhou L, Mo H, Miao J, Zhou D, Tan RJ, Hou FF, Liu Y. Klotho Ameliorates Kidney Injury and Fibrosis and Normalizes Blood Pressure by Targeting the Renin-Angiotensin System. *Am J Pathol*. 2015; 185:3211-23
 112. Takenaka T, Kobori H, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Yamashita M, Hayashi M. Klotho protein supplementation reduces blood pressure and renal hypertrophy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Acta Physiol (Oxf)*. 2019; 225:e13190
 113. Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, James S, Wilkinson IB, Ting S, Hsiao L, Hiemstra TF, Zehnder D. α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100: E1308–E1318
 114. Leon J, Moreno AJ, Garay BI, Chalkley RJ, Burlingame AL, Wang D, Dubal DB. Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and α -Synuclein Transgenic Mice. *Cell Rep*. 2017; 20:1360-1371

115. Unity Biotechnology [Internet] 2022 (cited at 2022. Nov 22.) Available from: <https://unitybiotechnology.com/the-science/>
116. Xie J, Cha SK, An SW, Kuro-o M, Birnbaumer L, Huang CL. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun.* 2012; 3:1238
117. Navarro-García JA, Rueda A, Romero-García T, Aceves-Ripoll J, Rodríguez-Sánchez E, González-Lafuente L, Zaragoza C, Fernández-Velasco M, Kuro-O M, Ruilope LM, Ruiz-Hurtado G. Enhanced Klotho availability protects against cardiac dysfunction induced by uraemic cardiomyopathy by regulating Ca²⁺ handling. *Br J Pharmacol.* 2020; 177:4701-4719
118. Olejnik A, Krzywonos-Zawadzka A, Banaszkiwicz M, Bil-Lula I. Klotho protein contributes to cardioprotection during ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med.* 2020; 24:6448-6458
119. Neyra JA, Hu MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone.* 2017; 100:41-49
120. Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension.* 2009; 54:810-817
121. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 276:767-772
122. Chen B, Liang Y, Chen L, Wei Y, Li Y, Zhao W, Wu J. Overexpression of Klotho inhibits HELF fibroblasts SASP-related protumoral effects on non-small cell lung cancer cells. *J Cancer.* 2018; 9:1248-1258
123. Wang Y, Chen L, Huang G, He D, He J, Xu W, Zou C, Zong F, Li Y, Chen B, Wu S, Zhao W, Wu J. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PLoS One* 2013; 8:e57391
124. Ligumsky H, Rubinek T, Merenbakh-Lamin K, Yeheskel A, Sertchook R, Shahmoon S, Aviel-Ronen S, Wolf I. Tumor Suppressor Activity of Klotho in Breast Cancer Is Revealed by Structure-Function Analysis. *Mol Cancer Res.* 2015; 13:1398-407

125. Li Q, Li Y, Liang L, Li J, Luo D, Liu Q, Cai S, Li X. Klotho negatively regulated aerobic glycolysis in colorectal cancer via ERK/HIF1alpha axis. *Cell Commun Signal*. 2018; 16:26–26
126. Aviel-Ronen S, Rubinek T, Zadok O, Vituri A, Avivi C, Wolf I, Barshack I. Klotho expression in cervical cancer: differential expression in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2016; 69:53–57
127. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-O M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem*. 2011; 286:8655-8665
128. Lowery EM, Brubaker AL, Kuhlmann E, Kovacs EJ. The aging lung. *Clin Interv Aging*. 2013; 8:1489-1496
129. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*. 1999; 13: 197–205
130. Calvi CL, Podowski M, D'Alessio FR, Metzger SL, Misono K, Poonyagariyagorn H, Lopez-Mercado A, Ku T, Lauer T, Cheadle C, Talbot CC Jr, Jie C, McGrath-Morrow S, King LS, Walston J, Neptune ER. Critical transition in tissue homeostasis accompanies murine lung senescence. *PLoS One*. 2011; 6:e20712
131. Sharma G, Goodwin J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clin Interv Aging*. 2006; 1:253-260
132. Rossiello F, Jurk D, Passos JF, di Fagagna FA. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol*. 2022; 24:135–147
133. Schneider JL, Rowe JH, Garcia-de-Alba C, Kim CF, Sharpe AH, Haigis MC. The aging lung: Physiology, disease, and immunity. *Cell*. 2021; 184:1990-2019
134. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17:7-20
135. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5:253-295
136. Yuan YM, Luo L, Guo Z, Yang M, Lin YF, Luo C. Smoking, aging and expression of proteins related to the FOXO3 signaling pathway in lung tissues. *Genet Mol Res*. 2015; 14:8547-8554

137. Meiners S, Eickelberg O, Königshoff M. Hallmarks of the ageing lung. *Eur Respir J*. 2015; 45:807-827
138. Krick S, Grabner A, Baumlin N, Yanucil C, Helton S, Grosche A, Sailland J, Geraghty P, Viera L, Russell DW, Wells JM, Xu X, Gaggar A, Barnes J, King GD, Campos M, Faul C, Salathe M. Fibroblast growth factor 23 and Klotho contribute to airway inflammation. *Eur Respir J*. 2018; 52:1800236
139. Suga T, Kurabayashi M, Sando Y, Ohyama Y, Maeno T, Maeno Y, Aizawa H, Matsumura Y, Kuwaki T, Kuro-O M, Nabeshima Yi, Nagai R. Disruption of the klotho gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22:26-33
140. Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and marlboro mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22:4-7
141. Sato A, Hirai T, Imura A, Kita N, Iwano A, Muro S, Nabeshima Y, Suki B, Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:2361-5
142. C. Vogelmeier, Chair, A. Agusti, A. Anzueto, P. Barnes, J. Bourbeau, G. Criner, D. Halpin, M. Han, F. Martinez, M. Montes de Oca, A. Papi, I. Pavord, N. Roche, D. Sin, D. Singh, R. Stockley, M. Victorina Lopez Varela, J. Wedzicha. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2022 report) [Internet] (cited at 2022. Nov 22.) available from: <https://goldcopd.org/2022-gold-reports/>
143. Adeloye D, Song P, Zhu Y, Campbell H, Sheikh A, Rudan I; NIHR RESPIRE Global Respiratory Health Unit. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Respir Med*. 2022; 10:447-458
144. Rutten E, Gopal P, Wouters E, Franssen F, Hageman G, Vanfleteren L, Spruit MA, Reynaert NL. Various mechanistic pathways representing the aging process are altered in COPD. *Chest*. 2016; 149:53–61.
145. Gao W, Yuan C, Zhang J, Li L, Yu L, Wiegman C, Barnes PJ, Adock IM, Huang M, Yao X. Klotho expression is reduced in COPD airway epithelial cells: effect on inflammation and oxidant injury. *Clin Sci*. 2015; 129:1011–1023

146. Patel MS, Donaldson AV, Lewis A, Natanek SA, Lee JY, Andersson YM, Haji G, Jackson SG, Bolognese BJ, Foley JP, Podolin PL, Bruijnzeel PL, Hart N, Hopkinson NS, Man WD, Kemp PR, Polkey MI. Klotho and smoking--An interplay influencing the skeletal muscle function deficits that occur in COPD. *Respir Med.* 2016; 113:50-56
147. Verde Z, Gonzalez-Moro JMR, Chicharro LM, Reinoso-Barbero L, Bandres F, Gomez-Gallego F, Santiago C. A paradox: α -Klotho levels and smoking intensity. *Lung.* 2017; 195:53-57
148. Kamizono Y, Shiga Y, Suematsu Y, Imaizumi S, Tsukahara H, Noda K, Kuwano T, Fujimi K, Saku K, Miura SI. Impact of cigarette smoking cessation on plasma α -klotho levels. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97:e11947
149. Zhou H, Pu S, Zhou H, Guo Y. Klotho as Potential Autophagy Regulator and Therapeutic Target. *Front Pharmacol.* 2021; 12:755366
150. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249
151. Centers for Disease Control and Prevention US Cancer Statistics Lung Cancer [Internet] 2022 (cited at 2022. Nov 22.) Available from: <https://www.cdc.gov/cancer/uscs/about/stat-bites/stat-bite-lung.htm>
152. Velcheti V, Ramaswamy G. Insulin-like growth factor and lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006; 1:607–610
153. He B, Barg RN, You L, Xu Z, Reguart N, Mikami I, Batra S, Rosell R, Jablons DM. Wnt signaling in stem cells and non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2005; 7:54–60
154. Spitz MR, Barnett MJ, Goodman GE, Thornquist MD, Wu X, Pollak M. Serum insulin-like growth factor (IGF) and IGFbinding protein levels and risk of lung cancer: a case-control study nested in the beta-carotene and retinol efficacy trial cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11:1413–1418
155. Zhang M, Li X, Zhang X, Yang Y, Feng Z, Liu X. Association of serum hemoglobin A1c, C-peptide and insulin-like growth factor-1 levels with the occurrence and development of lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014; 4:506–508

156. Tas F, Bilgin E, Tastekin D, Erturk K, Duranyildiz D. Serum IGF-1 and IGFBP-3 levels as clinical markers for patients with lung cancer. *Biomed Rep.* 2016; 4:609–614
157. Minuto F, Del Monte P, Barreca A, Alama A, Cariola G, Giordano G Evidence for autocrine mitogenic stimulation by somatomedin- C/insuline-like growth factor I on an established human lung cancer cell line. *Cancer Res.* 1988; 48:3716–3719
158. Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundelevich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133:649–657
159. Xie B, Zhou J, Yuan L, Ren F, Liu DC, Li Q, Shu G. Epigenetic silencing of klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol.* 2013; 44:795–801
160. Chang B, Kim J, Jeong D, Jeong Y, Jeon S, Jung SI, Yang Y, Kim KI, Lim J, Kim C, Lee M. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer. *Oncol Rep.* 2012; 28:1022–1028
161. Chen B, Ma X, Liu S, Zhao W, Wu J. Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist in a dose-dependent manner. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13:1221–1228
162. Chen T, Ren H, Thakur A, Yang T, Li Y, Zhang S, Wang T, Chen M. Decreased level of klotho contributes to drug resistance in lung cancer cells: involving in klotho-mediated cell autophagy. *DNA Cell Biol.* 2016; 35:751–757
163. Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Uchida O, Nomura M, Ohira T, Ikeda N. Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer.* 2011; 74:332–337
164. Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Uchida O, Nomura M, Tsutsui H, Ohira T, Ikeda N. Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2011; 72:355–359
165. Hua H, Kong Q, Yin J, Zhang J, Jiang Y. Insulin-like growth factor receptor signaling in tumorigenesis and drug resistance: a challenge for cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2020; 13:64

166. Phospho Sit Plus [Internet] 2022 (cited at 2022. Nov 22.) Available from: <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=24693&showAllSites=true>
167. Chen B, Wang X, Zhao W, Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29:99
168. Chen B, Liang Y, Chen L, Wei Y, Li Y, Zhao W, Wu J. Overexpression of Klotho Inhibits HELF Fibroblasts SASP-related Protumoral Effects on Non-small Cell Lung Cancer Cells. *J Cancer.* 2018; 9:1248-1258
169. Brominska B, Gabryel P, Jarmołowska-Jurczyszyn D, Janicka-Jedyńska M, Kluk A, Trojanowski M, Brajer-Luftmann B, Woliński K, Czepczyński R, Gut P, Bromiński G, Majewski P, Dyszkiewicz W, Ruchała M. Klotho expression and nodal involvement as predictive factors for large cell lung carcinoma. *Arch Med Sci.* 2019; 15:1010-1016
170. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation.* 2005; 112:2660-2667.
171. Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2005; 127:1674-1679.
172. Lavie L. Oxidative stress--a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009; 51:303-312.
173. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramirez R, Selgas R, RuizOrtega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFkappaB. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22:1315-1325
174. Castellano G, Intini A, Stasi A, Divella C, Gigante M, Pontrelli P, Franzin R, Accetturo M, Zito A, Fiorentino M, Montinaro V, Lucarelli G, Ditunno P, Battaglia M, Crovace A, Staffieri F, Oortwijn B, van Amersfoort E, Pertosa G, Grandaliano G, Gesualdo L. Complement modulation of antiaging factor klotho in ischemia/reperfusion injury and delayed graft function. *Am J Transplant.* 2016; 16:325-333
175. Komaba H, Fukagawa M. Vitamin D and secreted Klotho: a long-awaited panacea for vascular calcification? *Kidney Int.* 2012; 82:1248-1250

176. Liguori C, Romigi A, Izzi F, Mercuri NB, Cordella A, Tarquini E, Giambrone M P, Marciani MG, Placidi F. Continuous Positive Airway Pressure Treatment Increases Serum Vitamin D Levels in Male Patients with Obstructive Sleep Apnea. *J Clin Sleep Med*. 2015; 11:603-607
177. Ekman S, Wynes MW, Hirsch FR. The mTOR pathway in lung cancer and implications for therapy and biomarker analysis. *J Thorac Oncol*. 2012; 7:947-953
178. Simpson A, Petnga W, Macaulay VM, Weyer-Czernilofsky U, Bogenrieder T. Insulin-Like Growth Factor (IGF) Pathway Targeting in Cancer: Role of the IGF Axis and Opportunities for Future Combination Studies. *Target Oncol*. 2017; 12:571-597
179. DeVito NC, Sturdivant M, Thievanthiran B, Xiao C, Plebanek MP, Salama AKS, Beasley GM, Holtzhausen A, Novotny-Diermayr V, Strickler JH, Hanks BA. Pharmacological Wnt ligand inhibition overcomes key tumor-mediated resistance pathways to anti-PD-1 immunotherapy. *Cell Rep*. 2021; 35:109071
180. IBL International Soluble alpha-klotho ELISA kit [Internet] 2023 (cited at 2023. Sep 03.) Available from <https://ibl-international.com/en/alpha-klotho-elisa>
181. Pako J, Barta I, Balogh Z, Kerti M, Drozdovszky O, Bikov A, Antus B, Horvath I, Varga J. Assessment of the Anti-Aging Klotho Protein in Patients with COPD Undergoing Pulmonary Rehabilitation. *COPD*. 2017; 14:176-180.
182. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS Statement: Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166:111–117.
183. Pako J, Bikov A, Barta I, Matsueda H, Puskas R, Galffy G, Kerpel-Fronius A, Antus B, Horvath I. Assessment of the circulating klotho protein in lung cancer patients. *Pathol Oncol Res*. 2020; 26:233-238.
184. Pákó J, Kunos L, Mészáros M, Tárnoki DL, Tárnoki ÁD, Horváth I, Bikov A. Decreased Levels of Anti-Aging Klotho in Obstructive Sleep Apnea. *Rejuvenation Res*. 2020; 23:256-261
185. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, Redline S, Strohl KP, Davidson Ward SL, Tangredi MM. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. *Deliberations of the Sleep Apn*

- ea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2012; 8:597-619.
186. Corhay JL, Dang DN, Van Cauwenberge H, Louis R. Pulmonary rehabilitation and COPD: providing patients a good environment for optimizing therapy. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014; 9:27-39
187. Wang Z, Wang Z, Liang Z, Liu J, Shi W, Bai P, Lin X, Magaye R, Zhao J. Expression and clinical significance of IGF-1, IGFBP-3, and IGFBP-7 in serum and lung cancer tissues from patients with non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2013; 6:1437-1444
188. Toshifumi S, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation*. 2004; 110:1148–1155
189. Fukino K, Suzuki T, Saito Y, Shindo T, Amaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293:332–337
190. Pan JY, Sun CC, Li SJ, Huang J, Li DJ. Role of miR-10b in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by targeting klotho. *Cancer Cell Microenviron*. 2015; 2:e936
191. Qi HW, Shen Z, Fan LH (2011) Combined inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor enhances the effects of gefitinib in a human non-small cell lung cancer resistant cell line. *Exp Ther Med*. 2: 1091e1095
192. Saghiv M, Manisha S, Lark W, BenSira D, Goldhammer E, Sagiv M. Sixteen weeks of aerobic training influence spirometry, s-klotho, and hemodynamic responses to sub-maximal exercise testing in obese men with severe obstructive sleep apnea. *Sleep Med Dis Int J*. 2018; 2:76-91.
193. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocrine*. 2009; 35:341-346.
194. Xia W, Zhang A, Jia Z, Gu J, Chen H. Klotho Contributes to Pravastatin Effect on Suppressing IL-6 production in endothelial cells. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016:2193210

195. Krick S, Baumlin N, Aller SP, Aguiar C, Grabner A, Sailland J, Mendes E, Schmid A, Qi L, David NV, Geraghty P, King G, Birket SE, Rowe SM, Faul C, Salathe M. Klotho Inhibits Interleukin-8 secretion from cystic fibrosis airway epithelia. *Sci Rep.* 2017; 7:14388.
196. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, Nida M, Aggarwal S, Sajid H, Naseem J, Loomba R. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med.* 2013; 9:1003-1012
197. Su X, Yang W. Klotho protein lowered in elderly hypertension. *Int J Clin Exp.* 2014; 7:2347-2350
198. Xiaoli Z, Han L, Zhongjie S. GW25-e0435 Klotho Deficiency Causes Hypertension and Renal Damage and Its Mechanism. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64:C14
199. Gonzaga CC, Gaddam KK, Ahmed MI, Pimenta E, Thomas SJ, Harding SM, Oparil S, Cofield SS, Calhoun DA. Severity of obstructive sleep apnea is related to aldosterone status in subjects with resistant hypertension. *J Clin Sleep Med.* 2010; 6:363-368
200. Atkeson A, Jelic S. Mechanisms of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4:1327-1335
201. Marrone O, Battaglia S, Steiropoulos P, Basoglu OK, Kvamme JA, Ryan S, Pepin JL, Verbraecken J, Grote L, Hedner J, Bonsignore MR. Chronic kidney disease in European patients with obstructive sleep apnea: the ESADA cohort study. *J Sleep Res.* 2016; 25:739-745
202. Romero-Corral A, Caples SM, Lopez-Jimenez F, Somers VK. Interactions between obesity and obstructive sleep apnea: implications for treatment. *Chest.* 2010; 137:711-719
203. Unnikrishnan D, Jun J, Polotsky V. Inflammation in sleep apnea: an update. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015; 16:25-34
204. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama.* 2002; 287:356-359

205. Gao W, Liu DD, Li D, Cui GX. Effect of therapeutic hypercapnia on inflammatory responses to one-lung ventilation in lobectomy patients. *Anesthesiology*. 2015; 122:1235-1252

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Pako J, Barta I, Balogh Zs, Kerti M, Drozdovszky O, Bikov A, Antus B, Horvath I, Varga J: Assessment of the Anti-Aging Klotho Protein in Patients with COPD Undergoing Pulmonary Rehabilitation. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2017; 14: 176-180.

Pako J, Bikov A, Barta I, Matsueda H, Puskas R, Galffy G, Kerpel-Fronius A, Antus B, Horvath I: Assessment of the circulating klotho protein in lung cancer patients. *Pathol Oncol Res*, 2020; 26: 233-238.

Pako J, Kunos L, Meszaros M, Tarnoki DL, Tarnoki AD, Horvath I, Bikov A: Decreased Levels of Anti-Aging Klotho in Obstructive Sleep Apnea. *Rejuvenation Res*. 2020; 23: 256-261.

10.2. Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Pako J, Bikov A, Karlocai K, Csosza Gy, Kunos L, Losonczy G, Horvath I: Plasma VEGF levels and their relation to right ventricular function in pulmonary hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 2015; 37:340-344

Pako J, Bikov A, Horvath I: Asztma-COPD overlap szindróma; Diagnosztikai és terápiás kihívások. *Medicina Thoracalis*, 2016; 69:26-34

Pako J, Veres D, Tisza J, Horvath I: A COPD a multimorbiditás tükrében. *Orvostovábbképző Szemle*, 2015; 22. évf. 11. szám

Bikov A, Pako J, Montvai D, Kovacs D, Koller Z, Losonczy G, Horvath I: Exhaled breath condensate pH decreases following oral glucose tolerance test. *Journal of Breath Research*, 2015; 9:047112

Bikov A, Pako J, Kovacs D, Tamasi L, Lazar Z, Losonczy G, Horvath I: Exhaled breath volatile alterations in pregnancy assessed with electronic nose. *Biomarkers*, 2011; 16:476-484

Pako J, Hegedus Zs, Kalmar I, Toth J, Gal A, Bodnar A: A szülészeti- és újszülöttellátás fejlesztési lehetőségei a páciensek visszajelzései alapján. *IME*, 2022; 21: 22-28.

Fekete M, Fazekas-Pongor V, Balazs P, Tarantini S, Szollosi G, Pako J, Nemeth AN, Varga JT: Effect of malnutrition and body composition on the quality of life of COPD patients. *Physiol Int*, 2021; 108:238-250

Fekete M, Pako J, Nemeth AN, Tarantini S, Varga JT: Prevalence of influenza and pneumococcal vaccination in chronic obstructive pulmonary disease patients in association with the occurrence of acute exacerbations. *J Thorac Dis*, 2020; 12:4233-4242

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Horváth Ildikó Professzor Asszonynak, aki negyedéves tdk-hallgató koromban lett témavezetőm, és az azóta eltelt közel másfél évtizedben mindenben számíthattam rá, legyen szó tudományról vagy egészen másról. Nem tudok elég hálás lenni azért a rengeteg munkáért és támogatásért, iránymutatásért, amit tőle kaptam.

Szeretnék köszönetet mondani annak a két egészen kiváló fiatal pulmonológusnak és nagyszerű embernek, akikhez szintén tdk-hallgatóként vezetett a sors, és akik hosszú éveken át egyengették a tudományos utamat. Dr. Bikov András és Dr. Lázár Zsófia még maguk is PhD-hallgatók voltak, mikor már zavarba ejtő profizmussal segítettek a kutatásaimban, és nem utolsósorban morális iránytűként utat mutattak a tudomány útvesztőjében.

Köszönöm az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Kóréletteni Osztálya munkatársainak: Dr. Antus Balázsnak, Dr. Barta Imrének, Dr. Páska Csillának és Mikoss Máriaának a PhD-s éveim alatt nyújtott segítségét. Vizsgálataimat az ő laboratóriumukban végeztem és mindennapi kapcsolatban álltunk, bármilyen problémával fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm a Korányi Intézet korábbi és jelenlegi vezetőségének, orvosainak, nővéreinek és minden munkatársának a segítségét. Kivétel nélkül mindenki nyitottan és segítőkészen fogadta a megkereséseimet, legyen szó vizsgálatok engedélyezéséről, betegbevonásról, mintavételekről, patológiai mintaelemzésről vagy a pénzügyi forrásokkal kapcsolatos munkáról.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikája munkatársainak a tdk-s éveim alatt nyújtott segítséget.

Végezetül pedig köszönöm családomnak: édesanyámnak, férjemnek és lányomnak, illetve barátaimnak a végtelen és feltétlen támogatást és türelmet, hogy mindvégig biztos hátteret teremtettek a kutatással töltött évek alatt és a disszertáció megírása során.

A disszertációmot néhai édesapámnak ajánlom, aki mindig ösztönzött a kérésre, a kételkedésre, a kutatásra, de már nem érte meg a Doktori Iskolába történő felvételem hírére.