

Biomarkerek jelentősége a szepsziszhez társuló szervelégtelenségek diagnosztikájában és kimenetelében

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Ragán Dániel

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető:

Prof. Dr. Mühl Diána, egyetemi tanár, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

PÉCS

2022

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	I
Ábrajegyzék.....	III
Táblázatjegyzék.....	IV
Rövidítések jegyzéke	V
I. Bevezetés.....	1
I.1. Szepszis	1
I.1.1. A szepszis epidemiológiája, szepszis definíciók, etiológia	1
I.1.2. A szepszis immunológiája, patomechanizmusa	6
I.1.3. A szepszis diagnosztikája és kezelése	9
I.1.4. Szepszis biomarkerek	14
I.2. Akut vesekárosodás szepszisben	16
I.2.1. Az akut vesekárosodás etiológiája, patomechanizmusa.....	16
I.2.2. Az akut vesekárosodás diagnosztikája	16
I.2.3. A szepszis-indukálta akut vesekárosodás biomarkerei	17
I.3. Aktin	19
I.3.1. Az aktin szerkezete, tulajdonságai, élettani jellemzői	19
I.3.2. Az aktin scavenger rendszer (gelsolin, Gc-globulin)	21
I.3.3. Az aktin-toxicitás patomechanizmusa	22
I.4. Presepsin.....	24
I.4.1. A Presepsin keletkezése, klinikai jelentősége	24
I.4.1. Presepsin szintek változása szepszis-indukálta akut vesekárosodásban	25
I.4.2. Gyulladásos markerek és scavenger fehérjék kapcsolata patológias állapotokban	26
II. Célkitűzések.....	27
II.1. Vizelet-aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban.....	27
II.2. Presepsin:gelsolin arány szepszisben és szepszis indukálta szervi elégtelenségekben	27
III. Anyag és módszer	29
III.1. Vizsgált betegcsoportok, használt klinikai definíciók	29
III.1.1. Vizelet-aktin mérések során vizsgált betegcsoportok	29
III.1.2. Presepsin:gelsolin arány mérések során vizsgált betegcsoportok	30
III.2. Vér- és vizelet mintavétel	32
III.3. Rutin laboratóriumi vizsgálatok	32

III.4. Vizeletvizsgálatok	34
III.5. Vizelet-aktin meghatározása Western blot technikával.....	34
III.6. Presepsin:gelsolin arány meghatározása.....	39
III.7. Statisztikai analízisek	41
IV. Eredmények	42
IV.1. Vizelet-aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban	42
IV.1.1. Klinikai és laboratóriumi paraméterek	42
IV.1.2. A vizelet-aktin kontroll, szeptikus és szepszis-indukálta vesekárosodott betegekben....	45
IV.1.3. A vizelet-aktin prognosztikai és korrelációs vizsgálatokban	47
IV.2. Presepsin:gelsolin arány szepszisben és szepszissel társuló szervi elégtelenségekben	48
IV.2.1. Klinikai és laboratóriumi paraméterek	48
IV.2.2. A presepsin:gelsolin arány kontroll, nem szeptikus, szeptikus és szepszis-indukálta vesekárosodott betegekben.....	52
IV.2.3. A presepsin:gelsolin arány változása szepszissel társuló szervi elégtelenségekben	56
V. Megbeszélés.....	61
V.1. Vizelet aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban	61
V.2. Presepsin:gelsolin arány szepszissel társult szervi elégtelenségekben	64
V.3. Vizsgálataink korlátai.....	66
VI. Összefoglalás	68
VII. Köszönetnyilvánítás	70
VIII. Irodalomjegyzék	71
IX. Publikációs lista	85

Ábrajegyzék

1. ábra. Az infekciók, a szepszis és a SIRS kapcsolata.....	2
2. ábra. A korábban használatos Szepszis-2 definíciók.....	3
3. ábra. A jelenleg érvényben lévő Szepszis-3 definíciók.....	5
4. ábra. A szepszis komplex patomechanizmusa.....	9
5. ábra. Az aktin szerepe fiziológias folyamatokban.....	20
6. ábra. A G-aktin szerkezete (balra) és az aktin filamentumok polimerizációja (jobbra).....	21
7. ábra. Az aktin sorsa a szervezetben a fiziológias sejt-turnover során.....	22
8. ábra. Az aktin scavenger rendszer kimerülése patológias állapotokban.....	23
9. ábra. A presepsin feltételezett szekrécója.....	25
10. ábra. A Western blot lépései, illetve az immunreakció elve.....	37
11. ábra. A PATHFAST™ presepsin kazetták (balra) és az automata készülék (jobbra).....	40
12. ábra. A rutin laboratóriumi mérésekhez és a gelsolin detektálásához használt Cobas 8000/c502 automata analizátor.....	40
13. ábra. Vizelet-aktin szepszisben.....	46
14. ábra. Vizelet-aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban.....	46
15. ábra. Vizelet-aktin a szepszis prognosztikájában.....	47
16. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszisben.....	53
17. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta vesekárosodásban.....	54
18. ábra. Presepsin:gelsolin arány a szepszis prognosztikájában.....	55
19. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta hemodinamikai elégtelenségben.....	57
20. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta légzési elégtelenségben.....	58

Táblázatjegyzék

1. táblázat. A sepszis diagnosztikus kritériumai a Sepszis-2 definíciók alapján.....	4
2. táblázat. A SOFA pontrendszer.	5
3. táblázat. Az akut vesekárosodás stádiumai a KDIGO klasszifikációk szerint.....	17
4. táblázat. Az elektroforézis során használt gélek összeállításához szükséges oldatok.	35
5. táblázat. A Western blot módszer során felhasznált oldatok és reagensek listája.	39
6. táblázat. A kontroll és szeptikus betegek demográfiai és felvétel utáni laboradatai.	42
7. táblázat. A szeptikus és sepszis-indukálta AKI betegek klinikai paraméterei.	44
8. táblázat. A kontroll, nem szeptikus és szeptikus betegek demográfiai, valamint felvétel utáni laboratóriumi és klinikai adatai.....	48
9. táblázat. A szeptikus és sepszis-indukálta MODS betegek labor- és klinikai paraméterei.....	50
10. táblázat. A szeptikus betegek terápiás és mikrobiológiai paraméterei.	51
11. táblázat. Az intenzív osztályon kezelt betegek összehasonlítása ROC analízissel.	55
12. táblázat. A szeptikus betegek összehasonlítása ROC analízissel.....	59

Rövidítések jegyzéke

ABP.....	actin binding protein
AKI.....	acute kidney injury
AKS.....	acute kidney stress
AKIN.....	acute kidney injury network
AP.....	ammónium perszulfát
APACHE.....	acute physiology and chronic health evaluation
APTI.....	aktivált parciális tromboplasztin idő
ARDS.....	akut respirációs distressz szindróma
C3, C3b, C4, C5-C9.....	complement component 3, 3b, 4, 5-9
CAM-ICU.....	confusion assessment method for the intensive care unit
CARS.....	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CBB.....	coomassie brilliant blue
CCD.....	charge coupled device
CD4, CD8, CD11b, CD14.....	cluster of differentiation 4, 8, 11b, 14
CRP:albumin.....	C-reaktív protein:albumin arány
CRRT.....	continuous renal replacement therapy
CysC.....	cystatin C
DAMP.....	damage-associated molecular pattern
DIC.....	disseminated intravascular coagulation
ECL.....	enhanced chemiluminescence
ECMO.....	extracorporeal membrane oxygenation

EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FDP	fibrin degradation product
FiO ₂	fracture of inspired oxygen
GCS.....	Glasgow coma scale
GFR.....	glomerulus filtrációs ráta
GSN.....	gelsolin
HRP	horseradish peroxidase
hs-CRP	high sensitivity C-reaktív protein
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7
IHD	intermittáló hemodialízis
IL-1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 18	interleukin 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 18
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP-10.....	interferon induced protein-10
kDa.....	kiloDalton
KDIGO.....	kidney disease: improving global outcomes
KIM-1	kidney injury molecule-1
LBP	lipopolysaccharide binding protein
LPS.....	lipopoliszacharid
LTA.....	lipoteikolsav
MALDI-TOF MS.....	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
MAP	mean arterial pressure

MHC I, II	major histocompatibility complex class 1, 2
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NLR.....	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor
NO.....	nitrogén-monoxid
PAMP.....	pathogen-associated molecular pattern
PaO ₂	parciális artériás oxigéntenzió
PCR.....	polymerase chain reaction
PCT	procalcitonin
PEEP	positive end-expiratory pressure
PiCCO.....	pulse indicator continous cardiac output
PRR.....	pattern recognition receptor
PSEP	presepsin
PSEP:albumin	presepsin:albumin arány
PSEP:GSN arány	presepsin:gelsolin arány
qSOFA	quick sequential (sepsis-related) organ failure assessment
RASS.....	Richmond agitation-sedation score
RES	reticuloendothelial system
RIFLE	risk, injury, failure; loss, end-stage renal disease
ROS.....	reactive oxygen species
RRT.....	renal replacement therapy
S _{cv} O ₂	centrális vénás oxigén szaturáció

SDSsodium dodecyl sulphate
 SAPSsimplified acute physiology score
 SIRSsystemic inflammatory response syndrome
 SOFA sequential (sepsis-related) organ failure assessment
 SSC surviving sepsis campaign
 sTREM-1..... soluble triggering receptor expressed on myleoid cells -1
 suPARsoluble urokinase plasminogen activator receptor
 TBS tris buffered saline
 TEMED..... tetrametil-etilén-diamin
 TGF..... tubuloglomerular feedback
 TGF- βtransforming growth factor- β
 TIMP-2.....tissue inhibitor of metalloproteinases-2
 TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6.....toll-like receptor 1, 2, 4, 6
 TNF- α tumor nekrosis faktor-alfa
 Tris triszhidroximetil-amino-metán
 TSST toxikus sokk szindróma toxin

I. Bevezetés

I.1. Szepszis

I.1.1. A szepszis epidemiológiája, szepszis definíciók, etiológia

A szepszis napjainkban is az intenzív terápia egyik legnagyobb kihívását jelentő, összetett kórképe, ugyanis a modern antibiotikus és szervtámogató kezelési lehetőségek ellenére a szepszis mortalitása jelenleg is eléri a 30%-ot, amely szeptikus sokk kialakulása esetén 50% fölé is emelkedhet. A szepszis kedvezőtlen halálozási adatain kívül a kórkép folyamatosan növekvő incidenciája és jelentős erőforrásigénye miatt áll az érdeklődés középpontjában [1-4].

Már több mint két évtizeddel korábban az USA-ban végzett multicentrikus tanulmányban évente közel 750 ezer beteget kezeltek szepszissel, emellett a hosszú (átlagosan 19,6 napos) kezelési idő és magas (átlagosan 22100 USD) kezelési költségek következtében a kórkép anyagilag is komoly terhet ró a lakosságra. A vizsgálatban a szepszis incidenciája és a mortalitás emelkedett az életkor előrehaladtával, a kórházi összhalálozás pedig elérte a 215 ezer fő/évet. Összehasonlításképp a tanulmány ideje alatt évente közel 180 ezer beteg hunyt el akut miokardiális infarktus miatt, illetve 200 ezer beteg tüdő- vagy emlőrák miatt [5].

Azóta a 2000-es és 2010-es évtizedekben az USA-ban folytatott kutatások szerint a szepszis az összes kórházi felvételek közel 2%-át tette ki. A súlyos szepszis incidenciája 2000 és 2007 között 100 ezer lakosra vonatkoztatva 143-ról 343-ra nőtt. Ezzel szemben viszont biztató adat, hogy a súlyos szepszis átlagos kezelési időtartama 17 napról 15 napra, a mortalitás 39%-ról 27%-ra csökkent. Emellett egy 2008 és 2012 között végzett felmérésben a súlyos szepszis előfordulása 100 ezer lakosból 346-ról 436-ra emelkedett, a kórházi bennfekvés átlagos időtartama 9 napról 7 napra rövidült, a halálozás pedig 22%-ról 17%-ra mérséklődött [6-8].

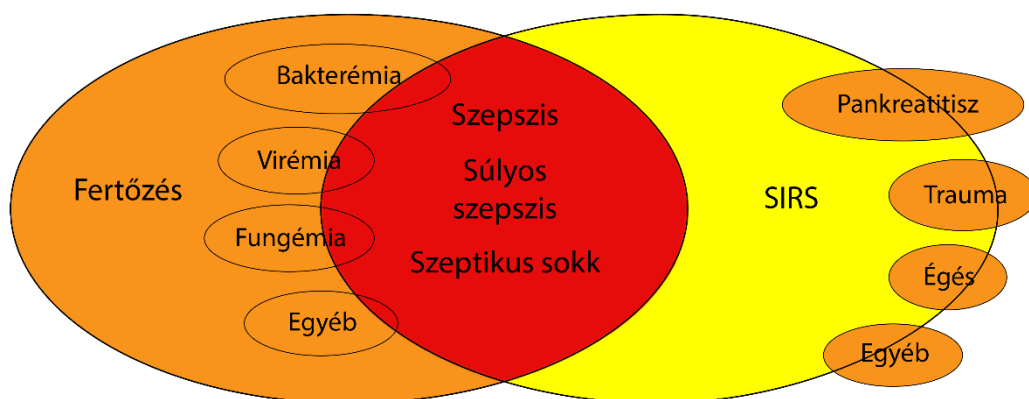
Magyarországi viszonylatban az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Országos Szakfelügyelet 2005-ben, 2010-ben és 2015-ben végzett felmérései során a hazai intenzív osztályokról átlagosan 15,5-15,4-19,9 beteget bocsátottak el, közöttük az infekcióval kezelték aránya 23,8%-ról 35,5%-ra, majd 41,2%-ra növekedett. A tanulmány során eltelt 10 évben a Gram-negatív bakteriális szepszis részaránya emelkedett, míg a Gram-pozitívoké csökkent, a gomba eredetű szepszis aránya nem változott. A felmérés időtartama alatt a közösségben szerzett fertőzések aránya 37%-ról 64%-ra növekedett, miközben csökkent a nozokomiális infekciók aránya. Tíz év alatt a súlyos szepszis

gyakorisága 80%-ról 21%-ra, míg a szeptikus sokké 57%-ról 48%-ra mérséklődött, emellett a mortalitási arányok is jelentősen csökkentek a teljes populációban, az infekciós és a súlyosan szeptikus csoportokban [9].

Hippokratész feljegyzései révén már az ókori görög kultúrából is fellelhetőek írásos bizonyítékok a szepsziszről, viszont egészen az utóbbi néhány évtizedig nem léteztek egyértelmű, nemzetközileg elfogadott irányelvek a szepszisz definícióját illetően.

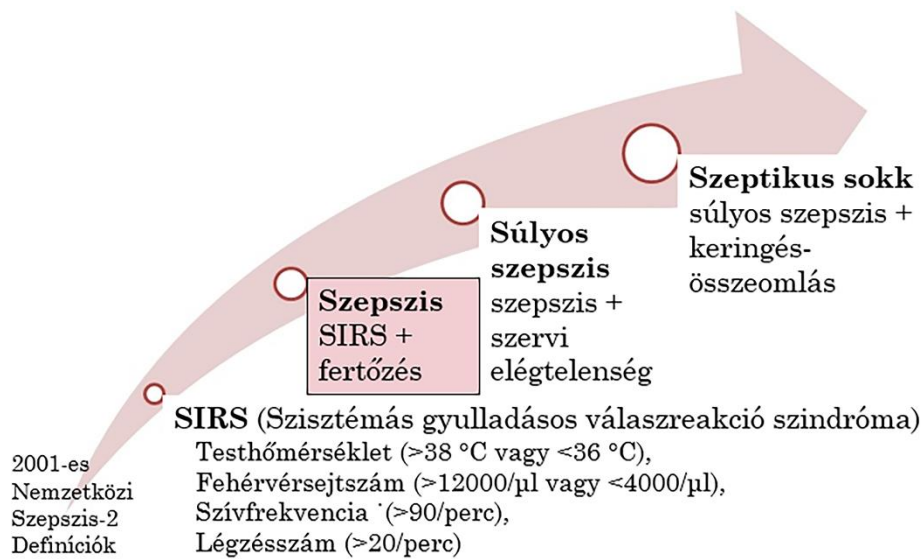
Először 1992-ben az „ACCP/SCCM Consensus Conference” során alkották meg az egységes Szepszisz-1, majd 2001-ben az „SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference” keretein belül születtek meg a Szepszisz-2 definíciók [10, 11].

Bizonyos akutan életet veszélyeztető állapotokban – pl. súlyos baleset, iatrogén ártalom, kiterjedt égési sérülés, pankreatitisz – a szervezet az ún. szisztémás gyulladásos válaszreakció szindróma (SIRS) formájában reagál a szöveti károsodásra (1. ábra). Ennek háttérében az immunrendszer működésében lényeges közvetítő funkciót betöltő gyulladásos mediátorok egyensúlyzavarát feltételezik [11, 12].



1. ábra. Az infekciók, a szepszisz és a SIRS kapcsolata [10, 11].

A fentebb említett szepszisz definíciók alapján akkor mondhatjuk ki a szepszisz diagnózisát, ha a SIRS háttérében szisztémás fertőzés áll. Ha szepsziszben kialakul az ún. szepszisz-indukálta hipotenzió, továbbá a szepszisz – vélhetően hipoxiás és iszkémiás károsodás miatt – legalább egy szervrendszer elégtelenségével társul, akkor súlyos szepsziszről beszélünk. Ha adekvát folyadékterápia mellett is fennáll a szepszisz-indukálta hipotenzió – amely szöveti hipoperfúzióval, valamint több szervrendszer diszfunkciójával társul –, akkor kialakul a szeptikus sokk (2. ábra) [11, 12].



2. ábra. A korábban használatos Sepszis-2 definíciók.

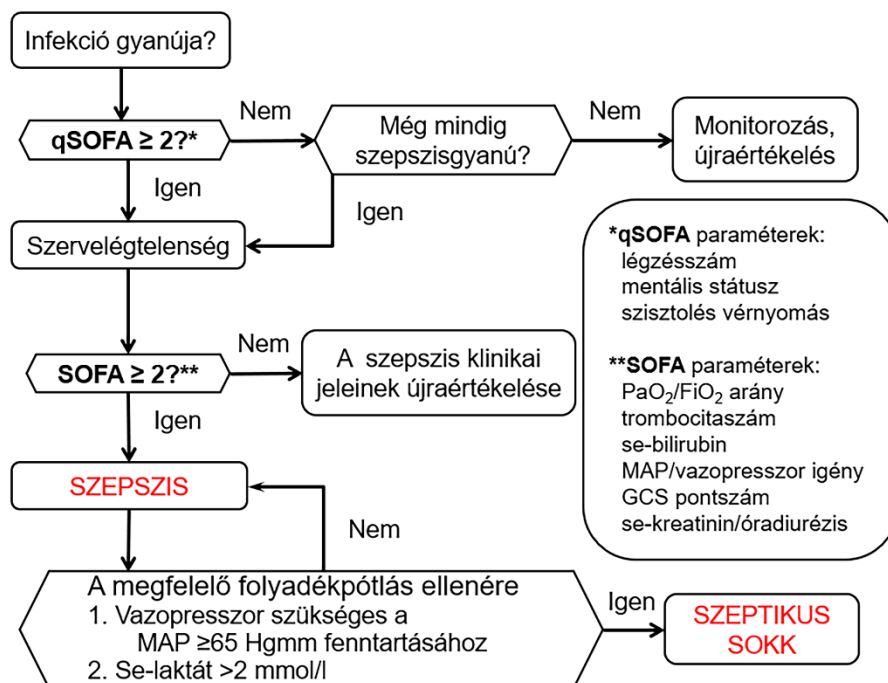
Fertőzés (dokumentált vagy a klinikai kép alapján gyanított), továbbá néhány paraméter teljesülése a következők közül:
Általános jellemzők:
láz (maghőmérséklet $>38,3^{\circ}\text{C}$) hipotermia (maghőmérséklet $<36^{\circ}\text{C}$) szívfrekvencia $>90/\text{perc}$ vagy >2 SD az életkor szerinti normál érték felett légzésszám $>30/\text{perc}$ megváltozott tudatállapot jelentős ödéma vagy pozitív folyadékgyensúly ($>20\text{ ml/kg}$ 24 óra alatt) hiperglikémia (plazma glükóz $>7,7\text{ mmol/l}$) diabétesz nélkül
Gyulladásos jellemzők:
leukocitózis (fehérvérsejtszám $>12\ 000/\mu\text{l}$) leukopénia (fehérvérsejtszám $<4\ 000/\mu\text{l}$) normál fehérvérsejtszám $>10\%$ éretlen alakkal plazma C-reaktív protein >2 SD a normál érték felett plazma procalcitonin >2 SD a normál érték felett
Hemodinamikai jellemzők:

artériás hipotenzió (szisztolés vérnyomás <90 Hgmm vagy MAP <70 Hgmm) kevert vénás oxigén szaturáció >70% szív-index >3,5 l/min/m ²
Szöveti perfúziós jellemzők:
emelkedett laktát szint (>3 mmol/l) csökkent kapilláris újratelődés
Szervi diszfunkciós jellemzők:
artériás hipoxémia (PaO ₂ /FiO ₂ <300) oligúria (vizelet-kiválasztás <0,5 ml/kg/óra vagy 45 mM/l legalább 2 órán át) kreatinin-emelkedés ≥44,2 μmol/l 48 órán belül alvadási rendellenességek (INR >1,5 vagy APTI >60 másodperc) trombocitopénia (vérlemezkeszám <100 000/μl) emelkedett bilirubin szint (plazma összbilirubin >70 μmol/l) íleusz (hiányzó bélhangok)

1. táblázat. A szepszis diagnosztikus kritériumai a Szepszis-2 definíciók alapján.

(SD: standard deviáció; MAP: mean arterial pressure; PaO₂: parciális artériás oxigén tenzió; FiO₂: fraction of inspired O₂; INR: international normalised ratio; APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő)

A napjainkban is használatos Szepszis-3 definíciók frissítése 2016-ban történt meg, melyben a korábban használatos protokoll lényeges átalakításon esett át (3. ábra). Szepszis gyanúja esetén az egyszerűbb és gyorsabb terápiás döntéshozatal érdekében először az ún. quick Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment (qSOFA) score-t használják a betegek állapotfelmérése során. Ezen pontrendszer a légzésszám (≥22/perc), a megváltozott mentális státusz és a szisztolés vérnyomás (≤100 Hgmm) alapján nyújt segítséget a diagnózisban, emellett további előnye, hogy laborparaméterek mérését nem igényli, ezért gyorsan reprodukálható. A qSOFA meghatározása után annak bővített változatával, vagyis a SOFA score segítségével (2. táblázat) már 6 vitális szervrendszer (légzőrendszer, vérárvadás, májfunkció, kardiovaszkuláris rendszer, központi idegrendszer, vesefunkció) paramétereinek osztályozása is lehetséges. Az egyes szervrendszerek értékeiből származtatott pontok összege jól korrelál a szeptikus betegek állapotának súlyosságával, továbbá a kimenetel becslésére is alkalmas. További újítás, hogy a SIRS, illetve a súlyos szepszis fogalma kikerült jelenlegi szepszis definíciókból [13, 14].



3. ábra. A jelenleg érvényben lévő Sepszis-3 definíciók.

SOFA pontszám	0	1	2	3	4
Légzőrendszer PaO ₂ /FiO ₂ , Hgmm	≥400	<400	<300	<200 légzéstámogatással	<100 légzéstámogatással
Alvadási rendszer Vérlemezkek, x10 ³ /μl	≥150	<150	<100	<50	<20
Májfunkció Se-bilirubin, μmol/l	<20	20-32	33-101	102-204	>204
Szív- és érrendszer *Katekolamin dózisok: μg/kg/perc (minimum 1 órán át)	MAP ≥70 Hgmm	MAP <70 Hgmm	Dopamin <5 vagy Dobutamin*	Dopamin 5,1-15 vagy Adrenalin ≤0,1 vagy Noradrenalin ≤0,1*	Dopamin >15 vagy Adrenalin >0,1 vagy Noradrenalin >0,1*
Központi idegrendszer GCS pontszám	15	13-14	10-12	6-9	<6
Vesefunkció Se-kreatinin, μmol/l Diurézis, ml/nap	<110	110-170	171-290	300-440 <500	>440 <200

2. táblázat. A SOFA pontrendszer.

Kórokozókat tekintve az utóbbi egy évtized felmérései alapján a mikrobiológiai tenyésztésekkel igazolt infekciók döntő hányadért már a Gram-negatív baktériumok tehetők felelőssé (62%), míg a Gram-pozitív bakteriális fertőzések korábbi dominanciája csökkenni látszik (48%). A hosszabb intenzív osztályos kezelésre szoruló septicus betegeknél rendszeres és tartós széles spektrumú antibiotikum használat miatt a nozokomiális fertőzések, így a multirezisztens kórokozók, valamint a gombák (leggyakrabban *Candida species*) által kiváltott fertőzés incidenciája is növekszik (17-20%). Az esetek kisebb hányadában kevert fertőzés árnyalja a klinikai képet, emellett pedig ritkán vírusok és paraziták (2-5%) is képesek szepszist okozni. Az infekció behatolási kapuja legtöbbször a felső és alsó légutak, az urogenitális rendszer vagy a gasztrointesztinális traktus, ugyanakkor kisebb valószínűséggel bármely más lokalizációjú gócból is kialakulhat szepszis. Mindazonáltal a szepszis diagnózisa gyakran csak a klinikai képen alapul, mivel a fertőzésforrást – az esetek közel 30%-ában – nem sikerül kimutatni [1, 15, 16].

A szepszis életkor szerinti incidenciája a hatodik évtizedben tetőzik, ugyanakkor a kórkép a csecsemőkori halálzásnak is jelentős hányadát teszi ki (fejlődő országokban akár 60%-ban). Ezenkívül a rizikótényezők közé tartozik a férfi nem, a rassz, az immunhiányos állapot, tumoros megbetegedés, krónikus szervi elégtelenség, illetve iatrogén okok [15, 17].

I.1.2. A szepszis immunológiája, patomechanizmusa

A gazdaszervezet számos védekező mechanizmussal rendelkezik a kórokozók eliminálására, így a légzőrendszer – mint potenciális behatolási kapu – esetében az epitél, a sejtközötti kapcsolatok és a mukociliáris klírens is mechanikai védelmet biztosít. A szurfaktáns, a nyálkahártyákon szekretálódó Immunglobulin A és az alatta elhelyezkedő nyirokszövet (MALT) is fontos szerepet tölt be az immunitásban. A komplement rendszer komponenseinek (pl. C5-C9, C3b) megfelelő működése is alapvető a mikrobák elpusztítása érdekében: a C5-C9 fehérjék által alkotott membrán-attak komplex a kórokozók sejtlyízését idézi elő, emellett a C3b komponens sejt felszíni lerakódása (opszonizáció) megkönnyíti a mikrobák fagociták általi elpusztítását [18, 19].

A kórokozókat először a veleszületett immunitás sejtjei ismerik fel, melynek tagjai a monociták, a granulociták és a természetes ölüsejtek. Ezen sejtek felismerik a mikrobák felszínén expresszáldó patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) mintázat-felismerő receptoraik (PRR) segítségével, melyek közül a legfontosabb sejt felszíni molekulák a Toll-like receptorok (TLR). Napjainkra már meglehetősen sok tagját azonosították a TLR családnak, közülük a TLR-4 a Gram-

negatív, a TLR-2 pedig a Gram-pozitív baktériumok felszínén jelenlévő struktúrák felismerésében elengedhetetlen. Emellett azonosítottak intracelluláris mintázat-felismerő receptorokat is, melyre példák a nukleotid-kötő oligomerizációs domén-szerű receptorok (NLR) [18-20].

A Gram-negatív baktériumok felszínén a lipopoliszacharid (LPS) – más néven endotoxin – felelős az immunreakció előidézéséért. A molekula azonosításához a lipopoliszacharid-kötő fehérje (LPB), a már említett TLR-4, valamint a CD14 nevezetű fehérjék szükségesek. Lipopoliszacharid hiányában a Gram-pozitív baktériumok sejt falában a lipoteikolsav (LTA) és a vastagabb peptidoglikán réteg váltja ki az immunválaszt. Gram-pozitív bakteriális infekciók esetében az egyes kórokozók által termelt exotoxinok, ún. szuperantigének képesek az antigén prezentáló sejtek felszínén megtalálható MHC II molekulához kapcsolódva excesszív mértékű citokin-termelést előidézni, melyre példák a *Staphylococcus aureus* Toxikus Sokk Szindróma Toxinja (TSST), valamint a *Streptococcus pyogenes* pirogén exotoxinja által okozott életveszélyes kórképek [19-22].

Az utóbbi években folytatott kutatások során bebizonyosodott, hogy a már említett PRR-ok segítségével a veleszületett immunitás sejtjei endogén sejt felszíni struktúrákat is képesek felismerni. Masszív sejt károsodás – égés, trauma, iatrogén ártalom vagy kiterjedt iszkémia – esetén a sejteken megjelennek az ún. károsodás-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP), melyek valószínűsíthetően a mitokondriumokból származnak. Irodalmi adatok alapján ezen struktúrák hasonló mértékű stimulációt jelentenek az immunrendszernek, mint a kórokozók felszínén kifejeződő PAMP-ok [21, 22].

Végső soron a kórokozók – vagy károsodott saját sejtek – megkötése után az aktivált receptor-komplexek intracelluláris jelátviteli kaszkádokat indítanak be, melynek legfontosabb állomása a Nukleáris Faktor- κ B fehérje komplex (NF- κ B). A gátlófehérjék degradációja után a komplex a sejtmagba jut, majd a megfelelő DNS-régiókhöz kapcsolódva befolyásolja a transzkripciót. Fokozódik a pro-inflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), kemokinek, interferonok és – az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) által – a nitrogén-monoxid (NO) termelése. A fentiekben alapuló láncreakció további gyulladáshoz vezet, valamint reaktív oxigéngyök-képződést (ROS) von maga után. Ennek következtében kialakul a gyulladás, amely lokálisan vazodilatációval és ödémával társul, az endotélsejtek aktiválódnak, mely elősegíti a fagociták extravazációját. A már említett pro-inflammatorikus citokinek felelősek az akut fázis

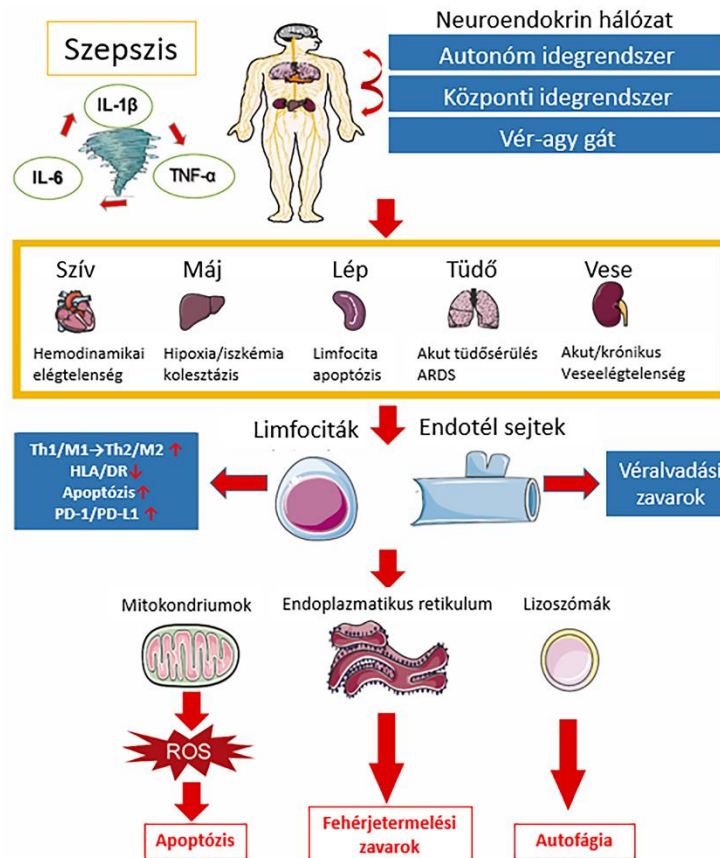
reakció létrejöttéért, melynek során a gazdaszervezet lázzal, emelkedett fehérvérsejtszámmal, kóros lipidanyagcserével, fokozott glükoneogenezissel és fehérje katabolizmussal, továbbá a komplement rendszer és a véralvadási kaszkád aktiválódásával reagál [19, 21, 22].

Az akut fázis reakció felerősödése miatt a kezdeti NO-mediált vazodilatáció és endotél diszfunkció mellett – főleg a neutrofil granulociták ROS-mediált citotoxikus hatása által – hipotenzió alakul ki, majd csökken a szívizom kontraktilitása. A véralvadási kaszkád is fokozottan aktiválódik, ami kedvez a mikrotrombus-képződésnek, így a szöveti iszkémia súlyosbodik, legrosszabb esetben pedig disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC) is kialakulhat [19-22].

Potenciálisan a gazdaszervezet minden maggal rendelkező sejtje, valamint a professzionális antigén prezentáló sejtek (makrofágok, dendritikus sejtek, B-sejtek) képesek aktiválni a szerzett immunitás sejtjeit. Közülük a CD4⁺ (helper) T-sejtek 1-es típusú helper sejtekké (Th1) történő differenciálódása során fontos szerepet játszanak a gyulladáshoz vezető folyamatok és a citokin termelés felerősítésében, a memóriasejt-képződésben, valamint – a CD8⁺ (citotoxikus) T-sejtek aktiválása által – a celluláris immunválasz kialakításában. A CD4⁺ T-sejtek 2-es típusú helper sejtekké (Th2) differenciálódva az antitesttermelés serkentésén keresztül a humorális immunválaszt aktiválják, valamint a regulátoros T-sejtekkel együtt anti-inflammatorikus citokineket (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) is termelnek [19-22].

A pro- és anti-inflammatorikus mediátorok aránya először gyakran a gyulladás irányába tolódik, ezen egyensúlyzavar miatt pedig felerősödik a SIRS, ugyanakkor a szepszis előrehaladtával az ún. kompenzatórikus anti-inflammációs válasz (CARS) inadekvát aktivációja is ronthatja a beteg gyógyulási esélyeit. Irodalmi adatok szerint fiziológiás körülmények között a CARS az excesszív mértékű gyulladást szabályozná, viszont szisztémás gyulladás esetén kezdetben nem képes a kellő immunszuppressziót kifejteni. Ezzel szemben a CARS túlzott aktivációja esetén immunparalízis alakulhat ki, amely a már meglévő szisztémás fertőzés mellett opportunisták fellángolása révén tovább ronthatja a késői halálozást [21, 23].

Végül az eddig említett folyamatok eredményeként septicus sokkban kifejlődhet több szervi elégtelenség (MODS) is, melynek fő kiváltó tényezői a szöveti iszkémia és hipoxia, így az anaerob anyagcsere és energiadeficit miatt a sejtek károsodnak (4. ábra).



4. ábra. A sepszis komplex patomechanizmusa. Huang és mtsai. alapján magyarra fordítva [21].

IL-1 β , IL-6: interleukin-1 β , interleukin-6; TNF- α : tumor nekrozis faktor- α ; ARDS: akut respirációs distressz szindróma; Th1/Th2: 1-es/2-es típusú helper T sejt; HLA/DR: humán leukocita antigén/DR izotípus; PD-1/PD-L1: programozott sejthalál protein 1, programozott sejthalál-ligand 1; ROS: reaktív oxigén gyökök.

I.1.3. A sepszis diagnosztikája és kezelése

A sepszis korai stádiumban történő felismerése és az adekvát terápia megkezdése alapvetően meghatározó a kimenetel szempontjából. A sepszis terápiájának alapelvei között a legfontosabb az infekció szanálása, valamint a gyulladást góccal eltávolítása, emellett kiemelendők a vitális szervfunkciók megőrzése érdekében a különböző szervtámogató és kiegészítő kezelések.

A sepszis diagnosztikájához a szervezetben kialakuló szervi diszfunkció, illetve gyulladás hátterében álló infekció mikrobiológiai vizsgálatokkal történő megerősítése szükséges. Ezen vizsgálatok még az antibiotikus kezelés előtti, minden potenciális gócból (vér, vizelet, liquor, sebváladékok, légúti váladékok) való mintavételt foglalnak magukban. A vérből történő mintavétel során ajánlott

minimum két sorozat – egymást 20 perccel követő friss (1-2 órán belül bevezetett) artériás vagy centrál vénás kanülből illetve perkután szűrással történő – (aerob és anaerob) hemokultúrát venni [13, 14].

Mivel a kórokozók tenyésztése időigényes folyamat, így napjainkban már bizonyos molekuláris biológiai módszerekkel (pl. polimeráz láncreakció (PCR)) több különböző patogén egyidejű identifikálása is lehetséges. A molekuláris biológiai módszereken kívül a tömegspektrometriás azonosítás (MALDI-TOF MS) is elterjedt. Mindemellett az említett modern módszerek magas szenzitivitásuk ellenére meglehetősen költségesek, ugyanis megfelelő infrastruktúra- és személyzeti háttérigényük mellett a kontamináció és a valós infekciót kiváltó ágens differenciálása is komplikált lehet. Emiatt a felsorolt technikák egyelőre még gyorsaságuk és precizitásuk ellenére sem voltak képesek teljes egészében a mikrobiológiai tenyésztéseket kiváltani [24, 25].

A mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek megérkezéséig a hospitalizáció során a klinikai kép, illetve egyéb paraméterek változásának nyomon követése segítheti a szepszis meghatározását. A 2. táblázatban a SOFA score alapján ismertetett jellemzők közül lényeges a vitális szervi diszfunkciók meghatározásában megfigyelt paraméterek (PaO₂/FiO₂ arány, trombocitaszám, se-bilirubin szint, artériás középnyomás (MAP) / vazopresszor igény, Glasgow-kóma skála (GCS) érték, se-kreatinin / óradiurézis), valamint az egyéb elterjedt gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek – fehérvérsejtszám, nagy érzékenységű C-reaktív protein (hs-CRP), procalcitonin (PCT) – monitorozása. Az intenzív osztályon kezelt betegek prognózisbecslésére széleskörben használt klinikai pontrendszerek az Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II, valamint a Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II [13, 14, 26-28].

A kutatásaink kezdetétől érvényes 2016-os Surviving Sepsis Campaign (SSC) irányelvei alapján a szepszis és szepszis sokkos betegeknél – amennyiben tüdő ödéma képe nem áll fenn – úgy fontos a (főként) krisztalloidokkal (30 ml/kg) történő gyors folyadékpótlás azonnali megkezdése. Mérlegelendő azonban a beteg kardiális állapota, és a hipovolémia valós megléte, ezért a folyadék reszuszcitáció mértékének beteg specifikusnak kell lennie. Amennyiben adekvát folyadék töltöttség mellett is fennáll a szepszis-indukálta hipotenzió (MAP <65 Hgmm), úgy vazopresszor adása indikált. Elsőként a noradrenalin javasolt, mely szükség szerint kombinálható vazopresszinnel (0,03 egység/perc) vagy adrenalin adásával, ha a megfelelő MAP noradrenalin önmagában nem érhető el [14]. A frissített 2018-as SSC ajánlások szerint a beteg felvételét követő 1 órában a fent

említett folyadékpótlás és a laktát szintek szoros kontrollja mellett szükség esetén a mielőbbi vazopresszor terápia megindítása javasolt [29]. Az aktuális szepszis terápiás irányelvekben már nem szerepel a dopamin alkalmazása.

Ezzel egyidejűleg ajánlott mihamarabb, de legkésőbb a megfelelő mikrobiológiai minták levételét követő egy órán belül „ex juvantibus” széles spektrumú, az infekt gócra specifikus antimikrobiális (baktérium, gomba, vírus) kezelés megindítása. A mikrobiológiai tenyésztések eredményei alapján a rezisztencia profilnak megfelelő antimikrobiális terápia módosítása (az ún. „deeszkaláció”) megfontolandó a fertőzéses góc hatékony eliminálása szempontjából. Az adekvát, lehetőleg monoterápiában alkalmazott antimikrobiális kezelés megválasztása különösen fontos, ugyanis az elhúzó intenzív osztályos kezelés esetén a tartós széles spektrumú antibiotikum használat miatt a nozokomiális fertőzések, így a multirezisztens kórokozók, valamint a szervezet mikrobiális egyensúlyának felborulása miatt az oportunistá fertőzések fellángolása ronthatja a betegek gyógyulási esélyeit [30, 31].

Az infekcióforrás azonosításában elengedhetetlenek a különböző radiológiai vizsgálatok (pl. ultrahang, Röntgen, CT, MRI), melyek elősegíthetik a szepszist kiváltó góc hatékony felkutatását (pl. tüdőgyulladás, húgyúti/hasi gócok, stb). Műtéti úton eltávolítható szepszisforrás esetén a beavatkozást ajánlott mielőbb elvégezni. Kanül okozta véráram fertőzés esetén szükséges annak eltávolítása, majd egy új centrális vénás kanül más punkciós helyen történő behelyezése (lehetőség szerint a protekt típusú előnyösebb). A septicus, hemodinamikailag instabil betegek kezelése során szükséges az artériás kanül használata, mely a pontos vérnyomásmérésben, a hemodinamikai megingások észlelésében, valamint a gyakori vérgáz analízisek fájdalommentes kivitelezésében is hasznos. A centrális vénás kanülok alkalmazása elengedhetetlen az intenzív osztályon kezelt betegek hatékony intravénás folyadék- és gyógyszeres terápiájában [14]. Felső centrális vénás kanülből (v. jugularis interna, v. subclavia) nyert vérminta oxigén szaturációja ($S_{cv}O_2$) jó információt ad az oxigénszállító kapacitásról. Alacsony $S_{cv}O_2$ értékek esetén – ha szívelégtelenség vagy krónikus tüdőbetegség nem áll fenn – volumenpótlás, vagy transzfúzió adása indokolt. Túl magas $S_{cv}O_2$ értékeknél (80% felett) a septicus sokkban észlelt kapilláris söntkeringés megléte felmerül [32]. Amennyiben a vazopresszor terápia dózisát emelni kell, a betegek invazív hemodinamikai monitorozása javasolt, melynek egyik hatékony technikája a transzpulmonális termodilúció elvén és az artériás nyomáshullám folyamatos pulzuskontúr analíziséen alapuló Pulse

indicator Continuous Cardiac Output (PiCCO) monitorozás. A PiCCO monitor a keringési perctérfogat pontos mérése mellett számos egyéb származtatott hemodinamikai paraméter meghatározására alkalmas, emellett további előnye, hogy egyes korábban elterjedt módszerekhez képest (pl. pulmonális katéter) kevésbé invazív [33, 34].

A hipoxia csökkentése és a gázcsere javítása céljából a légzéstámogatás (invazív vagy noninvazív) megkezdése ajánlott szepszisben. A noninvazív gépi lélegeztetés előnyösebb, mivel a beteg izomereje megtartott marad, emellett mobilizálható, tud kommunikálni, enni, inni, továbbá légzésfizioterápia is végezhető. Ha a noninvazív lélegeztetés mellett a beteg gázcsereje nem rendezhető, akkor gépi lélegeztetés alkalmazása indokolt. A helyes lélegeztetési technika a tüdőprotektív stratégia, melynek lényege a pozitív kilégzésvégi nyomás (PEEP) alkalmazása, valamint megfelelő belégzési térfogat (6 ml/kg) és csúcsnyomás (<30 H₂Ocm) mellett az aspiráció megelőzése érdekében a fejvég 30-45° közé emelése. Szepszis-indukálta akut respirációs distressz szindrómában (ARDS) – mely a kapilláris permeabilitás fokozódásával összefügg – a restriktív folyadékterápia alkalmazása mind a tüdőt, mind a keringést tekintve előnyösebb a kimenetel javítása szempontjából [14]. Amennyiben szepszis-indukálta ARDS-ben a gépi lélegeztetés lehetőségeinek maximális kihasználása ellenére súlyos, refrakter légzési elégtelenség alakul ki, akkor veno-venózus extrakorporális membrán oxigenizáció (ECMO) használata válhat szükségessé. A veno-venózus ECMO során két nagy véna (általában vv. femorales, v. jugularis interna) perkután kanülálása után egy pumparendszer és membránoxigenátor segítségével a testből kivezetett vénás vér szén-dioxid eliminációja és oxigenizációja is biztosítható, így a súlyos hipoxémia és acidózis megszüntetése mellett az ARDS-ben fontos tüdőprotektív lélegeztetési stratégia is könnyebben megvalósítható [35, 36]. Az ARDS Berlinei kritériumrendszerét az anyag és módszer fejezetben ismertetem.

Az esetlegesen szükséges mély szedációt és izomrelaxációt csak indokolt esetben és a lehető legrövidebb ideig javasolt fenntartani. A betegek tudatállapotának, szövődményként kialakuló delíriumának megítélésére mielőbb ajánlott a nappali szedáció csökkentése, reorientáció. Ennek kapcsán a tudatállapot jellemzésére a GCS pontszám, a szedáció mértékének megítélésére a Richmond Agitation-Sedation Score (RASS) rendszer, míg a delírium vizsgálatára a Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU) pontrendszer használatos. Az

analgeszedáció felületessé tételéhez kiválóan alkalmas (de nem mindig elegendő) az intravénás dexmedetomidin [37-39].

Rutinszerű kortikoszteroid terápia alapvetően nem indokolt szepszisben, azonban a szeptikus sokk folyadékra és katekolaminra nem reagáló formájában 200 mg/24 óra hidrokortizon adagolása javasolt. A vazopresszor támogatás leállítását követően mielőbb elhagyandó, maximum 5-7 napig alkalmazandó [14].

A vérkészítményekre vonatkozóan a restriktív transfúziós stratégia ajánlott, ha akut vérzés vagy súlyos hipoxiás állapot nem áll fenn. Friss fagyasztott plazma és trombocita alkalmazása csak rossz alvadási státusz mellett aktív vérzés vagy invazív beavatkozások (trombocita <50 G/l) esetén indokolt. Emellett a trombózis és a stressz fekély gyógyszeres megelőző kezelése is javasolt [14].

A tápláláshoz előnyben részesítjük az enterális utat, szükség esetén nazogasztrikus, ritkán jejunális szondát vezetünk le, míg a teljes parenterális táplálás lehetőleg kerülendő. Szoros glükóz kontroll szükséges főként a szepszis korai időszakában az inzulinrezisztencia miatt, ezért szükség esetén rövidhatású inzulin (vagy inzulin analógok) használata indikált [14].

Az óradiurézis pontos mérésére hólyagkatétert alkalmazunk, ugyanakkor az adekvát folyadék- és diuretikus terápia ellenére súlyosbodó szepszis-indukálta akut vesekárosodásban vesepótló kezelés (RRT) alkalmazása válhat szükségessé. Az intermittáló és folyamatos RRT modalitások közül utóbbiak különösen hemodinamikai instabilitás esetén előnyösek a lassú és egyenletes folyadékeltávolítás miatt [14, 40]. Emellett a folyamatos vesepótló kezelési (CRRT) módszerek citokin adszorpciós technikákkal (pl. Cytosorb) kombinálva hatékonyan csökkenthetik a kritikus állapotú szeptikus betegeknél gyakran jelentős mennyiségben termelődő citokinek keringő frakcióját, de a mortalitást javító hatásuk egyelőre nem egyértelműen bizonyított [41-43]. A szepszis-indukálta akut vesekárosodás megítélésére alkalmazandó kritérium rendszereket a későbbiekben részletezem.

A szepszis kezelésének további részletezése meghaladja a dolgozat kereteit, ezért utalunk az aktuális SSC irányelveire, valamint egyéb releváns ajánlásokra. A vizsgálatainkba bevont szeptikus betegcsoportok esetében alkalmazott kezelést a későbbiekben ismertetjük.

I.1.4. Szepszis biomarkerek

Az eddigiek alapján a széleskörben elterjedt SOFA score könnyen értelmezhető és objektív tájékoztatást ad a szeptikus betegek állapotának súlyosságával kapcsolatban. Ugyanakkor a szepszis heterogenitása miatt ezen pontrendszernek is lehetnek korlátozó tényezői, így a szepszis és a szepszis-indukálta szervi elégtelenségek adekvát meghatározásában az új, ígéretes szepszis biomarkerek monitorozása szükséges [13, 14, 44].

A szepszis korai diagnózisa és az adekvát prognózisbecslés rendkívül fontos. Ezekre a célokra viszont a jelenleg használt paraméterek – 90% alatti szepszisre vonatkoztatott szenzitivitásuk, illetve specificitásuk miatt – nem kielégítőek [45-48].

Az utóbbi években a már említett akut fázis fehérjék közül a nagy érzékenységű C-reaktív protein (hs-CRP), illetve a procalcitonin (PCT) monitorozása terjedt el a gyakorlatban.

A hs-CRP elsősorban kedvező pénzügyi költségeinek köszönheti széleskörű elérhetőségét. A marker szérumszintje az akut fázis reakció aktivitását 24-48 órás látenciával követi, viszont a gyulladásos válasz aspecifikus jellege miatt differenciáldiagnosztikai problémák merülnek fel. A hs-CRP szintek – a szepszis mellett – más gyulladásos kórképek (hasnyálmirigy-, fémregnyúlvány-, epehólyag- és agyhártyagyulladás, autoimmun kórképek), sérülések, műtétek, valamint tumoros megbetegedések során is emelkedhetnek [49-52].

Ugyan a PCT már nincs jelen a Szepszis-3 definícióban, mint diagnosztikus kritérium, a marker meghatározása a szepszis monitorozásának továbbra is fontos és széleskörben használt eleme, emellett a hs-CRP-hez viszonyítva több szempontból is megbízhatóbbnak bizonyult. A PCT szérumszintje már 4-6 órával az akut fázis reakció felerősödése után megemelkedik. A fehérje koncentrációja szepszisben akár 10-szeresen, míg súlyos szepszisben és szeptikus sokkban akár 100-szorosan is meghaladhatja a küszöbértéket, így a súlyossággal is korrelációt mutat. További előnye, hogy bakteriális eredetű szepszisben a PCT negatív prediktív értékét 90% felettinek ítélték. A PCT bakteriális eredetű szepszisben mutatott hatékonysága ellenére viszont virális vagy gomba fertőzés miatti szepszisben negatív is lehet. A PCT esetében is emelkedett koncentrációkat találtak más gyulladással járó folyamatokban (trauma, nagyműtét, tumor, égés, pankreatitisz), azonban az emelkedés elmaradt a szepszisben megfigyelthez képest [53-56].

Irodalmi adatok alapján már közel 200 szepszis biomarkert azonosítottak, melyek kisebb hányadát a vérmérgezés diagnosztizálása, többségét pedig a kórfolyamat prognosztizálása kapcsán vizsgálták. Mindezidáig nem sikerült olyan biomarkert találni, mely minden alkalmazhatósági feltételnek megfelelné, mint például a megfelelő szenzitivitás, specificitás, prediktív érték vagy a fertőzéses góc lokalizációjának, illetve a kórokozó típusának elkülönítése. A szepszis összetettségéből ugyanakkor valószínűsíthető, hogy – különböző súlyossági pontrendszerek használata mellett – több molekula monitorozása is szükséges lehet az effektív diagnózishoz és prognózisbecsléshez [45-48].

A szepszis korai diagnosztikájában 5 markert azonosítottak, amelyek 90% feletti szenzitivitással és specificitással rendelkeztek, közülük újszülöttekben az interleukin 12 (IL-12) és az interferon indukálta protein 10 (IP-10) szintje emelkedett meg, míg felnőttekben a kettes típusú foszfolipáz A2 (PLA2-II), valamint a CD64 és a CD11b szintje mutatott növekedést. A szepszis kizárásában – a PCT mellett – a véralvadási rendszer markerei közül az aktivált parciális tromboplasztin idő (APTI) hullámformájának elemzése és a fibrin degradációs termékek (FDP) rendelkeznek 90% feletti negatív prediktív értékkel. A receptorok közül a szepszis prognózisa (28-napos túlélés) szempontjából ígéretesnek bizonyult a szolúbilis urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor (suPAR) és a szolúbilis myeloid sejteken expresszálandó trigger receptor 1 (sTREM-1) [47, 48, 57].

A vizsgált molekulákra további példák [45, 47, 48]:

- citokinek (TNF- α , MIF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18)
- CD-markerek (CD11b, CD14)
- receptorok (szolúbilis TNF- α , szolúbilis PLA2 TLR-2, TLR-4)
- endotél sejt felszíni molekulák, illetve növekedési faktorok (szolúbilis L- és E-szelektin, szolúbilis ICAM-1, VCAM, PDGF, VEGF)
- akut fázis fehérjék (hs-CRP, PCT, hepcidin, orosomucoid, ferritin)
- alvadási faktorok (APTI, antitrombin III).

A fenti csoportokból említett molekulákat javarészt a szérumból határozzák meg, ugyanakkor ismertek a vizeletben detektálható markerek is, melyek szepszisben, illetve szepszis-indukálta akut vesekárosodásban is informatívak lehetnek. Ez utóbbi kórfolyamatban mért potenciális vizelet biomarkereket a következő fejezetben ismertetem.

I.2. Akut vesekárosodás szepszisben

I.2.1. Az akut vesekárosodás etiológiája, patomechanizmusa

A szepszis súlyosságával egyenes arányban emelkedik az akut vesekárosodás (AKI) incidenciája (22-52%), így az egyik leggyakoribb szepszis-indukálta szervi elégtelenségként tartják számon. Az intenzív osztályon kezelt betegeknek kialakult AKI leggyakoribb kiváltó oka is a szepszis (50%). Az AKI korrelációt mutat a szepszis súlyosságával és a mortalitás független prediktora. Irodalmi adatok alapján az évente növekvő incidenciával jelentkező szepszis-indukálta AKI halálozása is eléri a 30%-ot, míg több szervi elégtelenség esetén meghaladja a 60%-ot [58-60].

A szepszis-indukálta AKI patomechanizmusa még nem teljesen tisztázott, ugyanakkor a korábbi hipotenzió, vazokonstriktió és iszkémián alapuló elméletek mellett jelenleg a kezdeti fokozott renális perfúzió és vazodilatáció került előtérbe. Mivel fiziológiásan a vesékre a keringési perctérfogat 20%-a jut, ezért a szepszis kezdetén fokozottan ki van téve a szisztémás keringésbe kerülő gyulladáshoz vezető mediátorok kártékony hatásának. A felszabaduló DAMP-ok, illetve PAMP-ok a vesetubulusok sejtjeihez, valamint az endotélhez kapcsolódva a mikrocirkuláció zavarát idézik elő. A kialakuló vazodilatáció és ödéma miatt a tubuloglomeruláris feedback (TGF) mechanizmus révén az afferens arteriolák vazokonstriktiója következtében iszkémiás és hipoxiás sejtkárosodás következik be, végül csökken a glomerulus filtrációs ráta (GFR). A helyzetet tovább súlyosbítja az ideáramló pro-inflammatorikus citokinek miatt kifejlődő gyulladás, mely kedvez a leukociták általi oxidatív stressz-mediált sejtpusztításnak és a véralvadási kaskád aktiválásán keresztül a mikrotrombus-képződésnek [60, 61].

I.2.2. Az akut vesekárosodás diagnosztikája

Az akut vesekárosodás diagnosztikájában a klinikai kép mellett különböző ajánlások nyújtanak segítséget, ezek a RIFLE (Risk, Injury, Failure; Loss, End-Stage Renal Disease) és az AKIN (Acute Kidney Injury Network) osztályozási rendszerek. Jelen esetben a 2012 óta érvényes, – az előbbi irányelveken alapuló – szintén elterjedt KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) klasszifikációt szemléltetem [62]. Napjainkban is a vesefunkció megítélésének egyik fontos markere a GFR, amelyre – direkt mérésének nehézségei miatt – a szérum kreatinin (se-kreatinin) szint méréséből következtethetünk. A másik egy könnyen meghatározható paraméter, az óradiurézis. Ezen értékek közül előbbi növekedése, illetve utóbbi csökkenése alapján 3

stádiumot különítettek el, melyek a súlyosság és a kimenetel becslését hivatottak megkönnyíteni, emellett az esetleges vesepótló kezelés szükségességét is megállapítja.

Stádium	Szérum kreatinin szint	Vizelet-kiválasztás
1	1,5-1,9x kiindulási szint VAGY ≥26,5 μmol/l emelkedés	<0,5 ml/kg/h 6-12 órán át
2	2-2,9x kiindulási szint	<0,5 ml/kg/h ≥12 órán át
3	≥3x kiindulási szint VAGY ≥353,6 μmol/l emelkedés VAGY vesepótló kezelés	<0,3 ml/kg/h ≥24 órán át VAGY anúria ≥12 órán át

3. táblázat. Az akut vesekárosodás stádiumai a KDIGO klasszifikációk szerint.

Természetesen az akut vesekárosodás esetében további paraméterek mérése is fontos, mint például a vérkép, az elektrolitok, az akut fázis fehérjék, a sav-bázis értékek, továbbá a nitrogéntartalmú bomlástermékek, valamint a vizeletvizsgálatok. Képzalkotó vizsgálatok, például az ultrahang, illetve szövettani vizsgálatok is segíthetik a vesekárosodás mértékének megállapítását.

I.2.3. A szepszis-indukálta akut vesekárosodás biomarkerei

A szepszis-indukálta AKI meghatározásában a fent említett funkcionális markereket (se-kreatinin, óradiurézis) illetően számos korlátozó tényező felmerül. Ugyan az óradiurézis beszűkülése még a se-kreatinin emelkedése előtt jelezheti a vesekárosodást, viszont ezen paraméter nem csak az AKI kifejlődése miatt csökkenhet. Emellett a se-kreatinin szint nem minden esetben követi megfelelően a GFR változásait, ezért egy csekély mértékű se-kreatinin emelkedés észrevétlen maradhat az AKI kialakulásának kezdetén. Emiatt a jelenleg használatos AKI biomarkerek változása nem jelzi előre és nem korrelál megfelelően a vesekárosodás mértékével, ezért napjainkban is nagy erővel folynak kutatások szenzitívebb és specifikusabb markerek után [60, 63, 64].

A szérumból mért markerek közül a PCT, a sTREM-1, valamint egyes sejtadhéziós markerek (E-szelektin, ICAM-1, VCAM) esetében találtak szignifikáns eltérést a szepszis-indukálta AKI, illetve a szervi diszfunkcióval nem társuló sepsztikus esetek között [60]. Irodalmi adatok alapján jelenleg a vese funkcionális károsodását jelző se-kreatinin emelkedését és az óradiurézis beszűkülését megelőzően a vese szöveti károsodását valószínűsítik az AKI kifejlődésének kezdeti fázisában, így ennek kapcsán számos vizeletben mérhető ígéretes biomarkert vizsgáltak.

A szepszis kezdetén még a vese szöveti károsodását megelőzően feltételeznek egy ún. akut renális stresszfázist (AKS), amikor a kiválasztó szerveket különböző stresszhatások érhetik (pl. oxidatív stressz, hipoperfúzió, proinflammatorikus citokinek, nefrotoxikus gyógyszerek). Emiatt bizonyos sejtciklust szabályozó fehérjék, mint például a szöveti metalloproteináz inhibitor-2 (TIMP-2) vagy az inzulin-szerű növekedési faktor kötő fehérje-7 (IGFBP7) hatására a sejtciklus megállhat a G1 fázisban. Ez utóbbi egy védekező mechanizmus, azonban jelentős veséket érő stresszhatás miatt az említett markerek túlzott termelődése apoptózist indukálhat a vese tubuláris epitelsejtjeiben, mely még a funkcionális károsodás előtt jelezheti az AKI kialakulását. Ennek megfelelően a TIMP-2 és IGFBP7 szinteket már számos tanulmányban vizsgálták, és a két marker együtt hatékonynak bizonyult a korai vesekárosodás diagnosztikájában [65-67].

Tubuláris vesekárosodást jelző biomarkerek

A szepszis-indukálta AKI során a kifejlődő tubuláris károsodás kapcsán az egyik legismertebb biomarker a neutrofil gelatináz-asszociált lipokalin (NGAL), mely elsődlegesen a granulociták felszínén expresszálódik, de kismértékben jelen van a májban és a vesében is. A marker 25 kDa-os molekulatömege miatt a glomerulusokban szabadon filtrálódik, és a proximális tubulusokban visszaszívódik. A vesét érő (főként) iszkémiás vagy toxikus károsodás során viszont az NGAL termelődése rapidan emelkedni kezd a vese tubulusokban. A szérum NGAL szintek ugyan erős korrelációt mutatnak a neutrofil granulocitaszámmal, viszont ez az AKI során emelkedett vizelet NGAL szinteket vélhetően kevésbé befolyásolja [68]. Emellett a marker sziderofór tulajdonsága miatt antimikrobiális hatással is rendelkezik, így a hepcidin szintekkel együtt alkalmas volt a szepszis-indukálta AKI prognózisára [69-72].

Egy másik közismert AKI biomarker a kidney injury molecule-1 (KIM-1), mely egy mucin és immunglobulin doménnel is rendelkező 39 kDa tömegű glikoprotein. A KIM-1 jelentőségét már kísérletes körülmények között (iszkémia-reperfúziós károsodás), valamint nagyműtéten átesett betegeknél is tanulmányozták. Emellett mind az akut, mind a krónikus vesekárosodás esetében a KIM-1 tartósan emelkedett szérum- és vizelet koncentrációja jól korrelál a betegek állapotának súlyosságával [73-76].

A vizeletből mért AKI biomarkerek közül említést érdemel az alfa-1-mikroglobulin, mely a májban termelődő kisméretű molekula (26 kDa), ezáltal a glomerulusokban szabadon filtrálódik,

majd a proximális tubulusokban visszaszívódik, így a vizeletben megjelenő emelkedett koncentrációja tubuluskárosodásra utalhat [60, 77].

Külön kiemelendő biomarker a vizeletben mérhető cystatin C (CysC), amely már elérhető és informatív paramétere a szepszis-indukálta vesekárosodásnak. A molekula minden magvas sejtben termelődik, emellett kis mérete (13 kDa) miatt – az alfa-1-mikroglobulinhoz hasonlóan – a glomerulusokban kiszűrődik, és a proximális tubulusokban szívódik vissza. A molekula egyik fontos előnye, hogy a vizelet koncentrációja – a GFR-től függetlenül – korrelál a tubuláris károsodás mértékével, továbbá amputált és időskorú betegek kardiovaszkuláris kockázat becslésénél jobbnak bizonyult a se-kreatininhez szemben. Ugyan bizonyos kórállapotok (pl. tumor, szisztémás gyulladás, tartós kortikoszteroid terápia, pajzsmirigy betegségek) csökkenthetik a CysC hatékonyságát, viszont a se-kreatininhez képest megbízhatóbb markernek mutatkozott a szepszis-indukálta AKI diagnosztikájában és monitorozásában [78-82].

A szepszis miatt kialakuló masszív sejtkárosodás következtében számos egyéb mérhető molekula juthat ki a keringésbe, illetve – a kórképben gyakori veseérintettség révén – a vizeletbe, mint például a minden sejtben nagy mennyiségben előforduló aktin.

I.3. Aktin

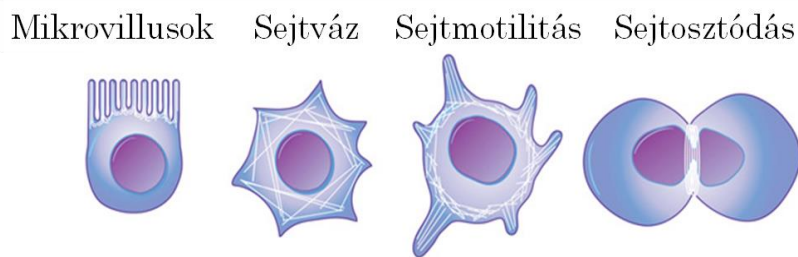
I.3.1. Az aktin szerkezete, tulajdonságai, élettani jellemzői

Az aktin egy meglehetősen sokoldalú fehérje, melynek fő tulajdonsága a szál- illetve rostképzés. Minden eukarióta sejtben megtalálható, továbbá intracellulárisan a sejtek citoszkeletonjának, illetve a mikrofilamentáris rendszernek egyik esszenciális alkotóeleme. A sejtekben az egyik legnagyobb mennyiségben jelenlévő protein, irodalmi adatok szerint az aktin az izomrostok fehérjetömegének közel 20%-át teszi ki, míg a többi sejt esetében megközelíti az 1-5%-ot [83, 84].

Fizikokémiai és strukturális tulajdonságait tekintve az aktin egy 374 aminosavból álló, 43 kDa molekulatömegű, globuláris fehérje, mely meglehetősen konzervált struktúrával bír (6. ábra). Az aktint kódoló géncsalád emberben közel 30 elemből áll, melyekből összesen 6 aktin izoformát különítettek el, majd izoelektromos pontjaik alapján 3 osztályba soroltak: alfa, béta és gamma aktinok. Az alfa izoforma az izomszövetben (vázizom, szívizom, érfalak simaizmai) van jelen, a béta és gamma izoformák ubikviter fehérjék [83, 84].

Fontos kiemelni, hogy az izomszövetben expresszáldó alfa aktin nem a sejtíváz alkotóelemét képezi, hanem az egyes szarkomerekben az ún. vékony filamentumokat alkotja, ami az izomösszehúzóds elengedhetetlen részeként működik. Az aktin további lényeges tulajdonsága, hogy saját ATP-áz aktivitása révén enzimként is funkcionál, emellett alapvetően 2 formában van jelen: a sejtekben globuláris aktin monomerek (G-aktin) szintetizálódnak, amelyek ATP-t vagy ADP-t kötnek (Mg^{2+} -komplexben), míg az aktin filamentumok (F-aktin) a monomerek polimerizációjával jönnek létre (ATP hidrolízise közben) [85, 86].

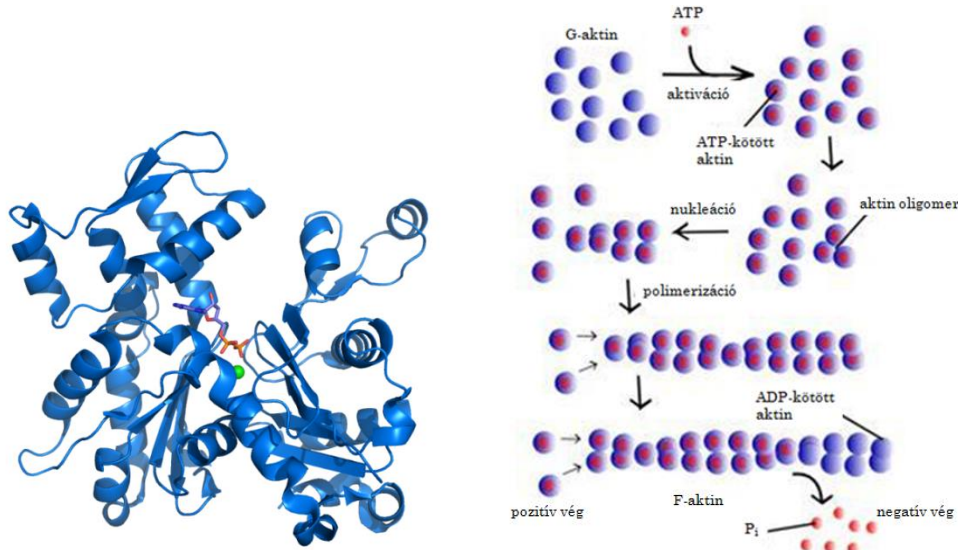
Funkcióját tekintve az aktin a mikrofilamentum rendszer részeként számos celluláris folyamat esszenciális résztvevője: az izomszövetben a kontraktilis apparátus nélkülözhetetlen eleme, a citoszkeleton alkotójaként a sejtek közötti kapcsolatok, illetve a sejtek alakjának fenntartásában vesz részt. Szerepe van a sejtmozgásban, a sejtjezignalizáció, a sejtosztódás és a citokinézis folyamatában is (5. ábra). A filamentáris aktin a citoplazmában kötegeket és hálózatot is létrehozhat attól függően, hogy milyen keresztkötő fehérjékkel (pl. fimbrin, α -aktinin, filamin, spektrin) kapcsolódnak össze az aktin rostok [84, 85, 87].



5. ábra. Az aktin szerepe fiziológias folyamatokban.

Az aktin fő tulajdonsága a szál- illetve rostképzés, amely a fent említett folyamatok alapját képezi. Bizonyos kórfolyamatokban a felszabaduló aktin a patomechanizmus alapja lehet, hogy ezt megértsük, a polimerizáció ismerete alapvető. Fiziológiásan a sejtekben egy kritikus aktin koncentráció esetén az aktin monomerek egyensúlyban vannak az aktin filamentumokkal. Ezen koncentrációk eltérők a filamentum pozitív, illetve negatív végén, így előbbi gyorsabban növekszik. Közepes aktin koncentrációknál figyelhető meg az ún. taposómalom (treadmilling) mechanizmus, amelynek lényege, hogy az aktin egységek gyakorlatilag „átfolyva” a filamentumon először a pozitív véghez kötődnek, majd disszociálnak a negatív végről. Az aktin monomerek ATP-t kötve kapcsolódnak a filamentum pozitív végéhez, ugyanakkor az ATP hidrolízise kedvez

a negatív végen képződő ADP-aktin komplex leválásának (7. ábra). Az energetikai viszonyok mellett bizonyos aktin kötő fehérjék (ABP) is szabályozzák a filamentumok polimerizációját (pl. Actin Related Protein 2, 3 (ARP2, ARP3) kofilin, profilin, timozin béta 4 (TB4)) [88-90].



6. ábra. A G-aktin szerkezete (balra) és az aktin filamentumok polimerizációja (jobbra).

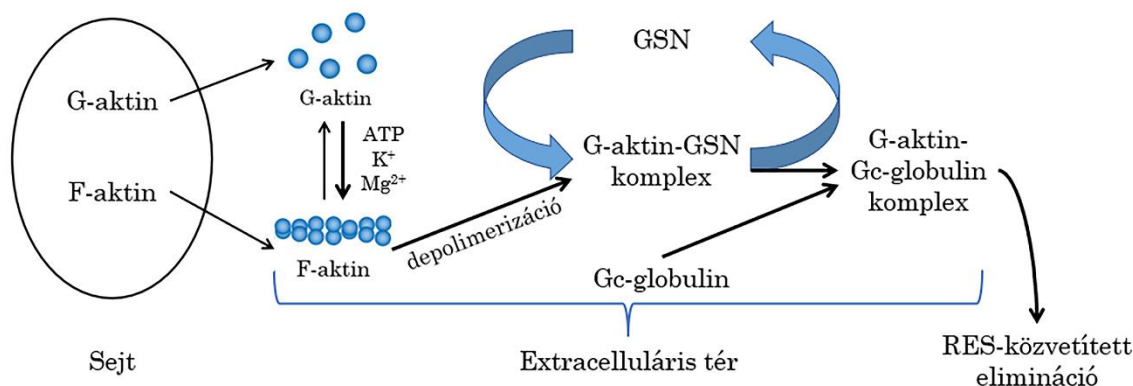
Az extracelluláris aktin spontán polimerizációját egy, a szisztémás keringésben megtalálható speciális scavenger rendszer kötőfehérjéi akadályozzák meg.

I.3.2. Az aktin scavenger rendszer (gelsolin, Gc-globulin)

Az aktin minden eukarióta sejtben jelen van, így a szervezetben fiziológiás körülmények között is zajló sejt turnover miatt az aktin monomer, illetve polimer formában is bekerül a véráramba. A keringésbe jutott aktint egy homeosztatis mechanizmus, az ún. aktin scavenger rendszer fehérjéi kötik meg, melynek két legfontosabb tagja a gelsolin, illetve a Gc-globulin [91, 92].

A gelsolin (GSN) egy 82 kDa molekulatömegű, 6 doménből felépülő (G1-G6), kalcium dependens ABP. Összesen 3 izoformája ismert, közülük kettő citoplazmatikus, egy pedig extracelluláris lokalizációjú, mely utóbbit legnagyobb mennyiségben a vázizomzat termeli. A szekretált GSN fő funkciója az aktin filamentumok aktin monomerekké történő depolimerizációja, majd a monomerek pozitív végéhez kötődve a későbbi polimerizáció gátlása. A GSN félféltideje a keringésben 2-3 nap [90, 93, 94].

A Gc-globulin, más néven D-vitaminkötő fehérje egy 58 kDa molekulatömegű, multifunkcionális ABP. A Gc-globulin egy, a máj által szintetizált plazmaprotein, amely nagyrészt a vérkeringésben fordul elő, viszont sejtmembránokhoz kapcsoltnak is megtalálható. Noha a nevéből adódóan egyik fő funkciója a D-vitamin megkötése és transzportja, a teljes keringő mennyiségnek alig 5%-a van D-vitaminhoz kötött formában, így jelentős mennyiségű Gc-globulin áll rendelkezésre egyéb funkciók betöltésére is. Mivel a Gc-globulinnak a GSN-hez képest nagyobb az affinitása az aktin monomer formájához, ezért felszabadítja a GSN-t a GSN-G-aktin komplexekből, így a GSN további aktin filamentumokkal léphet kölcsönhatásba, ezáltal fokozva a depolimerizációt. A Gc-globulin féléletideje 12-24 óra, mely a G-aktinnal komplexet képezve akár 30 percre is lecsökkenhet. A Gc-globulin-G-aktin komplexeket végül a májban és a lépben található retikuloendoteliális rendszer (RES) makrofágjai eliminálják (9. ábra) [95-98].



7. ábra. Az aktin sorsa a szervezetben a fiziológiás sejt-turnover során.

I.3.3. Az aktin-toxicitás patomechanizmusa

Fiziológiás körülmények között a GSN (2,3-3,6 $\mu\text{mol/l}$) és a Gc-globulin (6,25-9,8 $\mu\text{mol/l}$) plazmakoncentrációja többszörösen meghaladja a keringésbe kerülő aktin szintjét. Bizonyos patológiás állapotokban, pl. szепtikus sokkban viszont a pusztuló sejtekből rövid idő alatt nagy mennyiségű aktin kerül az extracelluláris térbe, így az aktin scavenger rendszer aktin kötő és eliminációs kapacitása először telítődik, majd kimerül. Az aktin scavenger rendszer kimerülését a szérum aktin (se-aktin) szintek emelkedése mellett az extracellulárisan megtalálható ABP-k szintjének csökkenésével magyarázzák (10. ábra) [91, 92, 99-101].

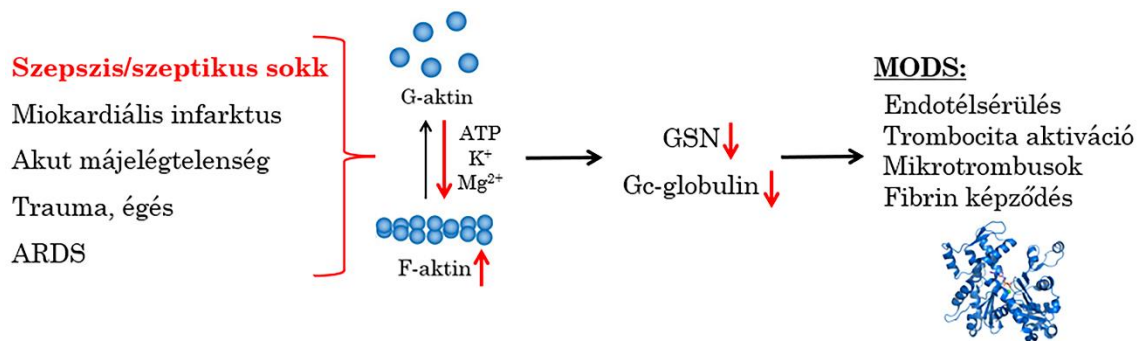
Az említett kötőfehérjék közül a GSN szérumszintjének csökkenését a szépszisen kívül akut respirációs distressz szindrómában, több szervi elégtelenségben, miokardiális infarktusbán,

szisztémás szklerózisban, reumatoid arthritisben, traumás eseteknél, műtéti beavatkozásoknál, illetve végstádiumú vesebetegek követése alatt is észlelték [100, 102, 103].

A Gc-globulin a máj által termelt fehérje, ezért szérumszintjének csökkenése a szeptikus esetek mellett főként májkárosodással járó kórképekben (fulmináns hepatitisz, akut májelégtelenség, májcirrózis) ígéretes prognosztikus markernek bizonyult [95, 104, 105].

Egy korábbi intézetünkben végzett vizsgálatban – más kutatócsoportok eredményeihez hasonlóan – a szérum GSN szintek csökkenését, valamint az aktin/GSN arány növekedését figyeltük meg szepszisben [106].

Az túlzott mennyiségű extracelluláris aktin-felszabadulás számos masszív sejtkárosodással járó kórkép kialakulásában – így a több szervi elégtelenség patomechanizmusában – is szerepet játszhat, ugyanis a keringésbe kikerülő aktin a szervezetre rendkívül káros. Toxikus hatása az aktin spontán mikrofilamentum képzési hajlamából adódik, amely az FVa alvadási faktorhoz kötődve a vér viszkozitásának növekedését, mikrotrombus képződést, a trombociták aktiválását, és a fibrinolízis gátlását idézi elő. Ezenkívül már állatkísérletes körülmények között leírták az extracelluláris aktin direkt endotél károsító hatását is, viszont ezen mechanizmus pontos háttere még nem tisztázott [91, 92, 99-101].



8. ábra. Az aktin scavenger rendszer kimerülése patológiás állapotokban.

A fentiekben említettekből feltételezhető, hogy normálisan a fehérjéhez kötött aktin komplexek méretüknél fogva nem kerülnek bele a vese glomerulusaiban képződő ultrafiltrátumba, így a vizeletben sem jelennek meg.

Ezzel szemben egy 2003-ban közölt tanulmány eredményei szerint sikerült aktint kimutatni vesetranszplantált betegek vizeletében, amelynek hátterében a vese iszkémiás, illetve hipoxiás

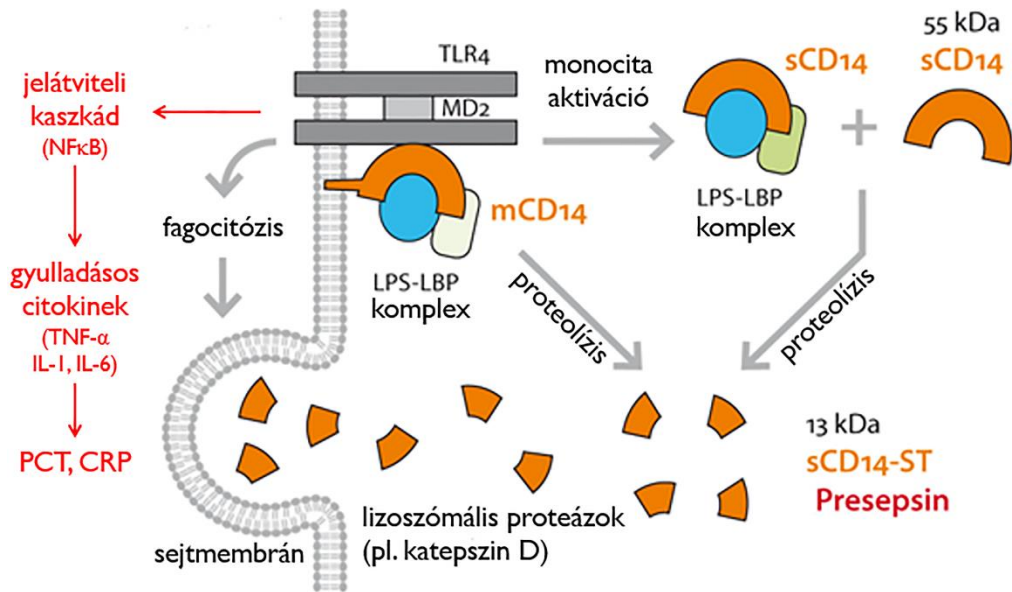
károsodását feltételezték. A kontroll egyének vizeletében nem detektáltak aktint, viszont az akut vesekárosodásban érintett vesetranszplantált betegeknél jelentősen megemelkedett vizelet-aktin (u-aktin) szinteket detektáltak [107].

Az u-aktin méréséről egyelőre igen csekély irodalmi adat áll rendelkezésre, ezért az említett 2003-as kutatás kapcsán merült fel bennünk a kérdés, hogy szeptikus betegeknél detektálható-e aktin a vizeletben.

I.4. Presepsin

I.4.1. A Presepsin keletkezése, klinikai jelentősége

A presepsin (PSEP) – más néven szolúbilis CD14 szubtípus (sCD14-ST) – az 55 kDa molekula-tömegű CD14 molekula membránkötött formájából (mCD14) származó, majd annak szolúbilis formájából (sCD14) keletkező 13 kDa molekula-tömegű N-terminális fragmentje [108, 109]. A membránhoz kötött forma főként a makrofágok, a monociták és a neutrofil granulociták felszínén expresszálódik. A molekula elsősorban a Toll-like receptor 4-es izotípusa (TLR-4) és az MD-2 koreceptor mellett a Gram negatív baktériumok felszínén lévő lipopoliszachariddal (LPS) és a lipopoliszacharid-kötő fehérjéhez (LBP) kötődik, ugyanakkor a Gram pozitív baktériumokon megtalálható peptidoglikán réteget is felismeri. A kórokozó felismerése és megkötése után az mCD14-LPS-LBP komplex leválik a monocita felszínéről, így ezen szolúbilis komplexből az extracelluláris proteolízisnek (lizoszomális katepszinek) köszönhetően keletkezik a PSEP (sCD14-ST). A kórokozók felismerése intracelluláris kaszkádokat is elindít, így az NF κ B komplex aktiválódása révén proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1, IL-6) termelődnek, amely a „klasszikus” gyulladási markerek (hs-CRP, PCT) szekréciójához vezet. A PSEP már a mikrobák felismerésekor aktiválódik, majd a vérkeringésbe kerül, ezért a jelenleg széleskörben elterjedt szépszis biomarkerekhez (hs-CRP, PCT) képest korábban emelkedő PSEP szintek várhatók (7. ábra) [110-112].



9. ábra. A presepsin keletkezési mechanizmusa.

A jelenlegi irodalmi adatok alapján a PSEP szérumszintje már 2 órával a fertőzés kezdete után emelkedik a keringésben, szemben a PCT 6 órás látencia idejével, ugyanakkor a molekula féléletideje 4-5 óra a PCT 25-30 órás felezési idejéhez képest. Az eddigi klinikai tanulmányokban a PSEP optimális küszöbértéke nagyfokú variabilitást mutatott, így a legfrissebb metaanalízisek alapján a molekula szepszisre vonatkoztatott cut-off értékét 400-600 pg/ml közötti plazma koncentrációknál határozták meg, míg a PCT cut-off értéke 0,5 ng/ml [113, 114]. Bár eddig relatíve kevés a PSEP-pel kapcsolatos klinikai vizsgálat, de úgy tűnik, hogy a Gram negatív szepszisre vonatkoztatott specificitása alacsonyabb a PCT-nél, ugyanakkor tartósan emelkedett PSEP szintek esetén kedvezőtlen mortalitási adatokat figyeltek meg súlyos szepszisben [115, 116]. Fontos irodalmi adat, hogy a molekula plazma szintje (egyelőre ismeretlen mechanizmussal) gombaszepszisben is emelkedik [117-120].

I.4.1. Presepsin szintek változása szepszis-indukálta akut vesekárosodásban

A PSEP kicsi molekulatömege miatt a glomerulusokban szabadon filtrálódik, ezért súlyos vesekárosodás esetén a marker plazma koncentrációja a GFR csökkenésével fordítottan arányos változást mutat. Ennek megfelelően számos klinikai tanulmányban találtak a vesekárosodás mértékével arányosan emelkedő PSEP szinteket mind krónikus veseelégtelenségben szenvedő belgyógyászati, mind akut lefolyású vesekárosodásban kritikus állapotú betegeknél [121-123].

A PSEP a vérben nem kötődik plazmafehérjéhez, ezért – más proinflammatorikus markerekhez hasonlóan (pl. IL-6, PCT) – kis mérete miatt különféle vesepótló kezelési technikákkal eltávolítható a keringésből, ezáltal ilyen esetekben hamisan alacsony PSEP szinteket találhatunk súlyos akut vagy krónikus vesekárosodásban szenvedő betegeknél [124-127].

I.4.2. Gyulladásos markerek és scavenger fehérjék kapcsolata patológiás állapotokban

Az albumin fiziológiás körülmények között számos esszenciális feladatot lát el a keringésben (pl. onkotikus nyomás fenntartása, puffereelés, transzport funkció, antioxidáns kapacitás), ezért súlyos katabolikus állapotokban gyakran csökkent szérum albumin koncentrációk várhatók. Ennek megfelelően számos gyulladásos állapotban (pl. iszkémiás szívbetegség, pankreatitisz, szepszis, tumoros megbetegedés) észleltek – a többnyire ellentétesen változó hs-CRP és albumin szintekből kalkulált – emelkedett C-reaktív protein:albumin (CRP:albumin) arányt [128-132].

Ezenkívül a CRP:albumin arány vizsgálata mellett a PCT:albumin arányt is eredményesnek találták a szepszis-indukálta AKI prognosztikájában [133]. Egy friss kutatás keretében a PSEP szinteket elemezve emelkedett PSEP:albumin arányt mértek szeptikus betegeknél [134]. A GSN is – mint aktin scavenger protein – a szervezet fiziológiás működésében fontos szerepet tölt be, így már számos klinikai tanulmányban észleltek csökkenő szérum GSN szinteket kiterjedt gyulladással járó állapotokban (pl. trauma, akut májelégtelenség, miokardiális infarktus, szepszis) [100, 102, 103]. Emellett egy korábbi intézetünkben folytatott vizsgálatban szintén csökkenő GSN koncentrációk mellett növekvő se-aktin szinteket detektáltak szeptikus betegeknél [106].

A fenti vizsgálatok eredményei alapján bennünk is felmerült, hogy a PSEP és a GSN szinteket érdemes lehet megvizsgálni szeptikus betegeknél.

II. Célkitűzések

II.1. Vizelet-aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban

Egy minden eukarióta sejtben jelentős mennyiségben előforduló fehérjét, az aktint vizsgáltuk szepszis biomarkerként. A szérumban aktin (se-aktin) koncentrációkat már számos tanulmányban monitorozták kritikus állapotú betegeknél, azonban a vizelet-aktin (u-aktin) szinteket eddig még csak egy kutatás során vizsgálták vesetranszplantált betegeknél. Emiatt vizsgálatunk egyik céljaként (az anuriás betegeket leszámítva) a könnyen és noninvazív módon hozzáférhető vizeletet választottuk. Mivel nincs elérhető rutin eljárás az u-aktin meghatározásához, így először szükség volt egy megfelelően szenzitív és specifikus mérési technika beállítására.

Első tanulmányunk céljai a következők voltak:

- Egy érzékeny és specifikus kvantitatív Western blot technika kidolgozása az u-aktin meghatározásához.
- Az u-aktin szintek monitorozása egészséges kontroll egyéneknél, valamint intenzív osztályon kezelt sepszis és szepszis-indukálta vesekárosodott betegeknél. Hipotézisünk szerint az u-aktin korai és érzékeny biomarkere lehet a szepszis-indukálta vesekárosodásnak, így ez alapján vizsgáltuk az u-aktin szinteket:
 - a szepszis-indukálta vesekárosodás diagnosztikájában
 - a szepszis és a szepszis-indukálta vesekárosodás súlyosságának megítélésében
 - a szepszis kimenetelének prognosztikájában
 - az egyéb laborparaméterekkel mutatott korrelációkkal

Az u-aktin és a szepszis kapcsolatáról irodalmi adatok alapján még nem rendelkezünk mélyreható ismeretekkel, ezért dolgozatomban előtanulmányként szolgál.

II.2. Presepsin:gelsolin arány szepszisben és szepszis indukálta szervi elégtelenségekben

Jelen vizsgálatunkban feltételeztük, hogy a PSEP és GSN szintek egyidejű mérése értékes információval szolgálhat a szepszissel társult szervi diszfunkciók hatékonyabb meghatározásával kapcsolatban, ezáltal egy új potenciális szepszis markert vizsgáltunk, a PSEP:GSN arányt.

Második tanulmányunk céljai a következők voltak:

- A PSEP:GSN arány monitorozása egészséges kontroll egyéneken, valamint intenzív osztályon kezelt nem szeptikus és szeptikus betegekben.
- Feltételezéseink szerint a PSEP:GSN arány érzékenyen jelezheti az egyes szepszissel társuló szervi diszfunkciókat, így ezek alapján vizsgáltuk:
 - a PSEP:GSN arány emelkedését szepszishez társuló többszervi elégtelenségben (MODS)
 - a PSEP:GSN arány diagnosztikus hatékonyságát szepszisben, szepszis-indukálta vesekárosodásban, alacsony és magas vazopresszor igényű szeptikus betegekben, szeptikus sokkban, valamint noninvazív oxigén terápiát és gépi lélegeztetést igénylő szeptikus betegeknel
 - a PSEP:GSN arány prognosztikus teljesítményét a szeptikus betegek vazopresszor és gépi lélegeztetési igényének időtartamát, valamint a szepszis kimenetelét illetően
 - a PSEP:GSN arány más laboratóriumi paraméterekkel és klinikai prognosztikai pontszámokkal mutatott korrelációját

Valamennyi kutatással kapcsolatos munkafolyamatot magam végeztem témavezetőm irányítása mellett (minta- és adatgyűjtés a vizsgálatba bevont betegektől, minták előkészítése, lemérése, a kapott eredmények statisztikai elemzése, publikációk elkészítése), viszont az intenzív osztályon kezelt szeptikus betegek napi kezelésében aktívan nem vettem részt. Tudományos érdeklődésem javarészt az új potenciális szepszis biomarkerek laboratóriumi vizsgálataira összpontosult.

III. Anyag és módszer

III.1. Vizsgált betegcsoportok, használt klinikai definíciók

Kutatásaink az „Új biomarkerek vizsgálati lehetőségei septicus betegeknél” című klinikai tanulmány keretében zajlottak, melynek elvégzéséhez a PTE KK Regionális és Intézményi Kutatás Etikai Bizottság engedélyével rendelkezünk (engedélyszám: 4327.316-2900/KK15/2011.). A vizsgálatokat az engedélyezett protokoll szerint, a 2013-as Helsinki Deklarációban kifejezett etikai ajánlások betartásával végeztük el, továbbá a tanulmányainkat a ClinicalTrials.gov felületén is regisztráltuk (engedélyszámok: NCT04968262; NCT05060679). A betegektől – akadályoztatás esetén a legközelebbi hozzátartozótól – tájékoztatást követően írásos beleegyező nyilatkozatot kaptunk a vizsgálatban történő önkéntes részvételről.

III.1.1. Vizelet-aktin mérések során vizsgált betegcsoportok

Első prospektív megfigyeléses tanulmányunkban 2016 január és 2019 december között a PTE KK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetben, a szepszis klinikai diagnózisával kezelt betegek (60 fő) vér- és vizeletmintáit elemeztük.

A szepszis, valamint a szepszis-indukálta AKI diagnózisának megállapítására a 2016-os Szepszis-3 definíciókat, valamint a KDIGO klasszifikációs rendszert alkalmaztuk [13, 62]. A septicus betegek bevételi kritériumai a következők voltak: feltételezett vagy mikrobiológiai vizsgálatokkal igazolt fertőzés, legalább egy vitális szervrendszer elégtelensége emelkedett SOFA score (>2) alapján, emelkedett PCT szintek (>2 ng/ml). A szepszis-indukálta AKI diagnózisa az első mintavételi időpontban a se-kreatinin szint (7 napon belül >1,5x emelkedés a kiindulási szinthez képest vagy $\geq 26,5$ $\mu\text{mol/l}$ emelkedés 48 órán belül) és a vizelet-kiválasztás (<0,5 ml/kg/h 6-12 órán át) változásain alapult. A vizsgálatba történő beleegyezés hiánya, illetve a visszavont nyilatkozat, a 18 év alatti életkor, a végstádiumú tumoros megbetegedés, valamint a krónikus dialízis kezelést vagy vesetranszplantációt igénylő végstádiumú veseelégtelenség a betegek tanulmányunkból való kizárását vonta maga után. A mérések végpontjai voltak: a követési idő elérése, illetve a vizsgálat időtartama alatt bekövetkezett halál.

A felvételt követően a szepszis súlyosságát és a mortalitási valószínűséget az APACHE II, a SAPS II és a SOFA pontrendszerek alapján becsültük meg. 30 napos mortalitási adatok alapján a szeptikus betegeket túlélő és nem-túlélő csoportokra osztottuk.

Mindkét tanulmányunk során a szeptikus betegek ellátása (pl. intravénás folyadékpótlás és gyógyszeradagolás, invazív hemodinamikai monitorozás, lélegeztetés, szedálás, antikoaguláns kezelés, szondatáplálás) a 2016-os SSC irányelvek alapján zajlott [14]. A frissített 2018-as SSC irányelveknek szerint a betegek a klinikai kép szerint adekvát folyadékpótlást és „ex juvantibus” széles spektrumú antimikrobiális kezelést kaptak, melyet 24-72 óra múlva a mikrobiológiai vizsgálatok eredményei alapján módosítottak [29].

A szeptikus beteganyaghoz korban illeszkedő, különböző krónikus betegségekkel rendelkező kontrollcsoportot is vizsgáltunk, így a PTE KK Szemészeti Klinikára érkező, műtetre előjegyzett betegektől (24 fő) vettünk mintákat. A kontroll egyéneknél akut gyulladásozó állapot fennállása (klinikai tünetek, emelkedett hs-CRP és fehérvérsejtszám), tumoros megbetegedések és a krónikus veseelégtelenség voltak a kizáró tényezők.

III.1.2. Presepsin:gelsolin arány mérések során vizsgált betegcsoportok

Második prospektív megfigyeléses tanulmányunkban 2018 január és 2020 február között a PTE KK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetben kezelt szeptikus betegek (65 fő) vérmintáit, valamint intenzív osztályos kezelést igénylő, kiterjedt sebészeti beavatkozást (pl. nyelőcső vagy hasnyálmirigy tumor operációját) követően felvett nem szeptikus betegek (38 fő) vérmintáit elemeztük.

A szepszis, valamint a szepszissel tárult szervi elégtelenségek diagnózisának megállapítására ugyanúgy a 2016-os Szepszis-3 definíciókat alkalmaztuk [13]. A szeptikus csoport bevételi kritériumai a következők voltak: feltételezett vagy mikrobiológiai vizsgálatokkal igazolt fertőzés, legalább egy vitális szervrendszer elégtelensége emelkedett SOFA score (>2) alapján. A nem szeptikus betegeknél is lehettek emelkedett SOFA értékei a felvételt követően, viszont itt a klinikai tünetek alapján nem merült fel infekció jelenléte. A betegek kizárási kritériumai, a mérések végpontjai és a szepszis-indukálta AKI diagnosztikus követelményei megegyeztek az első tanulmányunkban leírtakkal (lásd fent) [62].

A szepsziszhez társuló szervi elégtelenségeket tekintve a hemodinamikai zavarok súlyossága alapján a szeptikus betegeket alacsony ($\leq 0,1 \mu\text{g/kg/perc}$) és magas ($> 0,1 \mu\text{g/kg/perc}$) dózisu vazopresszor (többnyire noradrenalin) támogatás, valamint az intenzív osztályos kezelés alatti rövidebb (≤ 5 nap) és hosszabb (> 5 nap) időtartamú vazopresszor igény szerint is szétválasztottuk. Mindemellett a szeptikus betegeket a szeptikus sokk (adekvát folyadékpótlás, vazopresszor igény, emelkedett laktát szint ($> 2 \text{ mmol/l}$)) kialakulása alapján is csoportosítottuk [13, 14].

A szepsziszhez társuló légzési elégtelenség kezelése szempontjából a szeptikus betegeket noninvazív oxigén terápiás igény (pl. arcmaszk ($\geq 50\% \text{ FiO}_2$), high-flow nasal oxigén terápia) és gépi lélegeztetési igény (invazív lélegeztetés endotracheális intubációt követően) szerint is felosztottuk, míg utóbbi csoportot szintén rövidebb (≤ 5 nap) és hosszabb (> 5 nap) időtartamú gépi lélegeztetési igény szerint is elkülönítettük. Ezenkívül a gépi lélegeztetett szeptikus betegcsoportot a (legalább) közepes súlyosságú ARDS (légzési elégtelenség nem kizárólag kardiális ödéma vagy folyadék túltöltés miatt, mellkasröntgenen kétoldali beszűródés, csökkent tüdő compliance, csökkent Horowitz index ($< 200 \text{ Hgmm}$), emelkedett pozitív kilégzésvégi nyomás ($\geq 5 \text{ H}_2\text{Ocm}$)) kialakulása szerint is tovább bontottuk a Berliini definíciók alapján [13, 14, 135].

Mivel a gépi lélegeztetett szeptikus betegek jelentős többsége a felvételt követően propofol vagy dexmedetomidin szedációban részesült, ezért a betegek tudata (a GCS szerint) csak korlátozottan volt vizsgálható.

Az eddigieken felül a szepszisz-indukálta trombocitopéniát és akut májelégtelenséget a kutatásunk során bevont teljes szeptikus betegpopulációhoz (65 fő) képest kevés (11-11 fő) szeptikus érintett miatt nem vizsgáltuk.

Az első mintavétel után a szepszisz súlyosságát és a mortalitási valószínűséget az APACHE II, a SAPS II és a SOFA pontrendszerek alapján becsültük meg. A szeptikus betegeket a többszervi elégtelenség (MODS) kialakulása (2 vagy több vitális szervrendszer diszfunkciója) szerint is felosztottuk [13, 14]. 10-napos mortalitási adatok alapján a szeptikus betegeket túlélő és nem-túlélő csoportokra osztottuk.

A szeptikus beteganyag mellett a második vizsgálatunkban is krónikus betegségekkel rendelkező, a PTE KK Szemészeti Klinikán műtétre előjegyzett kontrollcsoporttól (23 fő) vettünk mintákat. A kontroll egyéneknek ugyanúgy az akut gyulladásos állapot (klinikai tünetek, emelkedett hs-CRP és

fehérvérsejtszám), a tumoros megbetegedések és a krónikus veseelégtelenség voltak a kizáró tényezők.

III.2. Vér- és vizelet mintavétel

Első követéses tanulmányunkban az intenzív osztályon kezelt szeptikus betegektől három időpontban (T1, T2, T3) történt vér- és vizelet mintavétel: T1: a felvételt követő 24 órán belül; T2: a követés 2. napján reggel; T3: a követés 3. napján reggel. A szeptikus betegektől a behelyezett artériás kanülből vettünk vérmintákat és a húgyhólyag katéterből nyertünk egyszeri vizelet mintákat. A vérmintákat zárt rendszerű (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, USA) szérumos (natív) és plazmás (etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó) vérvételi csövekbe gyűjtöttük a napi rutin vérvételek alkalmával, így kutatásunk nem jelentett újabb megterhelést a betegeknek. A vizeletmintákat műanyag mintavételi csövekbe vettük (Sarstedt AG, Nümbrecht, Németország). A kontroll egyénektől csak egyszeri vénás vérvétel és spontán középsugaras vizelet mintavétel történt. A vér- és vizeletmintákat a gyűjtést követő 1 órán belül centrifugáltuk (1500 g, 10 perc), majd aliquoutozás után a minták egy részét Laemmlit mintapufferrel (E-oldat, 5. táblázat) hígítottuk, végül a hígított mintákat 3 percig 100°C-on kezeltük. Az így szétporciózott natív és denaturált vér- és vizeletmintákat Eppendorf-csővekben -70 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

Második követéses vizsgálatunkban az intenzív osztályon kezelt szeptikus betegektől ugyanúgy három időpontban (T1, T2, T3) történt vérmintavétel: T1: a felvételt követő 12 órán belül; T2: a követés 2. napján reggel; T3: a követés 3. napján reggel. Az intenzív osztályokon kezelt nem szeptikus betegcsoporttól két időpontban (T1, T3) történt vérmintavétel: T1: az első posztoperatív napon reggel; T3: a 3. posztoperatív napon reggel. A kontroll egyénektől csak egyszeri vénás vérvétel történt. A vérmintákat ugyanúgy zárt rendszerű szérumos (natív) és plazmás (EDTA-t tartalmazó) vérvételi csövekbe gyűjtöttük a napi rutin vérvételek alkalmával. A szeptikus és nem szeptikus betegektől a behelyezett artériás kanülből vett vérminták gyűjtését követő 1 órán belüli centrifugálást (1500 g, 10 perc) és szétporciózást követően, az egyéb additívumot nem tartalmazó mintákat Eppendorf-csővekben -70 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

III.3. Rutin laboratóriumi vizsgálatok

A napi rutin vérvételek során mért paraméterek (összfehérje, albumin, karbamid, kreatinin, bilirubin, kreatin kináz (CK), hs-CRP, PCT, valamint a vérkép) rögzítése után ezen értékek alapján

az APACHE II, a SAPS II és a SOFA score segítségével valósult meg a betegek besorolása, és a szervelegtelenségek meghatározása. A PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet akkreditált (NAH-9-0008/2021) laboratóriumában történtek a mérések rutin diagnosztikai módszerekkel. A legtöbb szérumszám meghatározását Cobas 8000 automata analizátorral (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) végeztük, míg a PCT mérését Cobas e411 készüléken, a laktát mérését Gem Premier 3500 Point of Care analizátorral (IL Company, Bedford, MA, USA) folytattuk. A vérkép vizsgálatok Sysmex XN-9000 hematológiai automatával (Sysmex Corporation, Kóbe, Japán) történtek. A mérési elvek leírása az alábbiakban olvasható.

Szérumszám: A Biuret módszerrel alapuló kolorimetriás vizsgálat. Alkalikus közegben a szérumban lévő fehérjék rézsókkal lila színű komplexet képeznek, mely 552 nm-en fotometriásan detektálható. Referencia tartomány: 65-82 g/l.

Szérumszám albumin: Kolorimetriás eljárás, melynek során enyhén savas közegben az albumin brómkrezolölddel kékes-zöld színű komplexet képez, mely 583 nm-en mért abszorpcióval fotometrálható. Referencia tartomány: 35-53 g/l.

Szérumszám karbamid: Enzimikus, optimalizált UV teszt, melynek során a mintához adott reagensben található ureáz és glutamát dehidrogenáz enzimek aktivitása révén fotometriásan detektálható termék keletkezik. Referencia tartomány: 2,5-7,5 mmol/l.

Szérumszám kreatinin: A Jaffé módszerrel alapuló, korrigált, kinetikus kolorimetriás vizsgálat. Alkalikus közegben a kreatinin pikrinsavval borostyán színű komplexet képez, mely fotometriásan detektálható. Referencia tartományok: férfiak: 62-106 $\mu\text{mol/l}$; nők: 44-80 $\mu\text{mol/l}$.

Szérumszám összbilirubin: Kolorimetriás diazo-eljárás, melynek alapjait Ehrlich, majd Jendrassik és Gróf dolgozták ki. Erősen savas közegben az összbilirubin összekapcsolódik a 3,5-diklórfenil-diazóniummal, és azobilirubin képződik. A keletkezett vörös azofesték színintenzitása egyenesen arányos a fotometriásan meghatározott összbilirubin koncentrációval. Referencia tartomány: 2,5-21 $\mu\text{mol/l}$.

Szérumszám hs-CRP: Nagy érzékenységű – latex szemcsékkel erősített – immunturbidimetriás C-reaktív protein meghatározás, ahol mikropartikulumok felszínéhez kötött humán CRP elleni antitest agglutinál a minta CRP molekuláival. Az antitest-antigén komplex mennyiségét detektáljuk. Referencia tartomány: <5 mg/l.

Szérum PCT: szendvics elvű elektrokemilumineszcenciás immunkémiai vizsgálat. Referencia tartomány: <0,5 ng/ml.

Vérkép: A fehérvérsejtek, a vörösvértestek, a retikulociták, valamint a trombociták mérése automatizált áramlási citometrián alapuló optikai módszerrel történik K-EDTA véralvadást gátló tartalmú csövekből. Referencia tartományok: Vörösvértest: 3,9-6 T/l; Fehérvérsejtszám: 4-10 G/l; Trombocitaszám: 140-440 G/l; Hemoglobin: 120-175 g/l; Hematokrit: 34,1-51%.

III.4. Vizeletvizsgálatok

Vizeletmintáinkból összfehérjét, albumint és kreatinint mértünk rutin diagnosztikai módszerekkel (Cobas 8000 automata analizátor, Roche).

A vizelet összfehérje mérés elve: EDTA-t tartalmazó alkalikus közegben (NaOH) denaturált fehérjékhez benzotónium kloridot adunk, mely stabil turbiditást eredményez. Turbidimetriás meghatározási mód, Cobas 8000/c502 automatán történt a meghatározás. Referencia tartomány: <150mg/l random vizelet esetén.

A vizelet kreatinin mérés elve: A módszer elve a Jaffé reakció, megegyezik a szérum kreatinin méréssel, a mérés Cobas 8000/c502 modulon történt. Referencia tartomány: reggeli első vizelet esetén: férfiak: 3,45-22,9 mmol/l; nők: 2,47-19,2 mmol/l.

A vizelet albuminmérés egy turbidimetriás immunkémiai vizsgálat. A human albumin elleni poliklonális (birka) antitestek reakcióba lépnek az albuminnal és antigén/antitest komplexek jönnek létre. Az agglutináció után a komplexek mennyisége turbidimetriásan mérhető: Cobas 8000/c502 automatán történt a meghatározás. Referencia tartomány: <20mg/ml (<2,26 mg/mmol kreatininre vonatkoztatva).

Az intézetünkben mért új, potenciális szepszis markerek (vizelet orosomuroid, vizelet CysC) meghatározását az intézetünkben kidolgozott automatizált turbidimetrián alapuló immunkémiai módszerekkel határoztuk meg [136-138].

III.5. Vizelet-aktin meghatározása Western blot technikával

A se-aktin szinteket Lee és mtsai., valamint munkacsoportunk korábbi vizsgálatainak alapján egy erősített kemilumineszcenciás (ECL) Western blot technikával határoztuk meg [100, 106, 139].

Ezen eljárást az alább leírt módon az u-aktin szintek kimutatásához adaptáltuk. A módszer elve az alábbiakban olvasható, a 10. ábra szemlélteti a főbb lépéseket, az eljárás során használt oldatok és reagensek listája a 5. táblázatban található.

Fehérje elektroforézis denaturáló közegben

A korábban centrifugált, hőkezelt és Laemmli mintapufferrel hígított denaturált vizeletminták Western blotlalt történő analiziséhez először egy egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk SDS-t és béta-merkaptó-etanol tartalmazó közegben (SDS PAGE) Laemmli szerint [140]. A denaturáló közegben az SDS-el fedett fehérje molekulák anionként a pozitív pólus (anód) felé vándoroltak molekulatömegük szerint. Az élesebb elkülöníthetőség érdekében az elektroforézishez felső (hordozó) gélt és alsó (szeparáló) gélt tartalmazó, 0,75 mm vastagságú lemezeket használtunk, a gélkiöntéshez Mini Protean II Tube Cell kamrát (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) alkalmaztunk (4. táblázat). Pásztánként azonos fehérjetartalmú vizelet mintákat futtattunk (5 µg), továbbá a betegek mintáival párhuzamosan egy ismert aktin koncentrációjú belső standard (egészséges egyén szérummintája) 3 pontos felező hígítási sorozatát is felvittük minden gélt futtatásakor. Az elektroforézis konstans 190 V feszültséggel 45 percig zajlott, amíg a mintákkal együtt felvitt brómfenolkék jelzőfesték a gélt alsó végére ért.

Oldatok	Alsó gélt (10%)	Felső gélt (5%)
Tridesztillált víz	4,2 ml	2,9 ml
A-oldat (Akrilamid elegy)	3,4 ml	0,83 ml
B-oldat (TRIS puffer az alsó gélthez)	2,5 ml	-
C-oldat (TRIS puffer a felső gélthez)	-	1,25 ml
F-oldat (Ammónium-perszulfát oldat)	30 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl

4. táblázat. Az elektroforézis során használt gélt összeállításához szükséges oldatok.

Transzfer

Az elektroforézis után zajlott a gélt transzferálása 0,2 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), szendvics rendszerben. A transzferálás 20 percig, 0,8 mA/cm²-rel, ún. semi-dry módszerrel zajlott. A transzferálás során használt készülék (GE Healthcare Multiphor II Novablot Electrophoresis Unit, Champaign, IL, USA) grafitlapjainak benedvesítése után, a grafit lemezek között a géltől a membránra történik a vándoroltatás elektromos térben, a vezetést átnedvesített szűrőpapírok biztosítják.

Blokkolás

A nitrocellulóz membrán szabad kötőhelyeinek blokkolását 5%-os tejes tweenes TBS oldattal végeztük, egy éjszakán át +4 °C-on.

Immunreakció

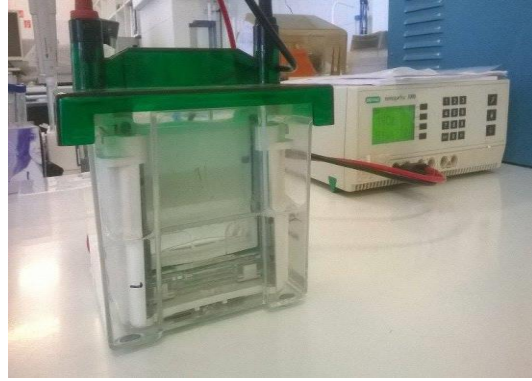
Ezt követően a nitrocellulóz membránt nyúlban előállított poliklonális primer pan-anti-aktin antitestet (1:1000 hígítás; Rabbit Anti-Human Actin, N-terminal, ref. no: A2103, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó 5%-os tejes tweenes TBS oldattal kezeltük 37 °C-on, enyhe rázással 1 órán át. Az el nem reagált primer antitest kimosása 5x 10 percig történt 0,05% tweenes TBS-sel. Másodlagos antitestként torma peroxidázzal (HRP) jelölt anti-nyúl poliklonális antitestet (1:4000 hígítás; Goat Anti-Rabbit IgG, Cat. # 31460, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) használtunk, az inkubáció körülményei megegyeztek a primer antitestnél leírtakkal. Végezetül a fölösleges, illetve nem specifikusan kötődött szekunder antitest kimosását a membránból 5x 10 percig 0,05% tweenes TBS-sel végeztük.

Detektálás, értékelés

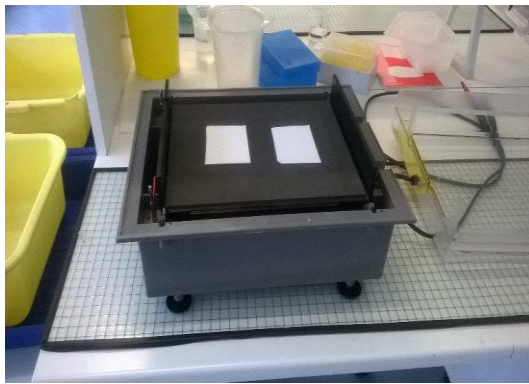
Az előkészített nitrocellulóz membránon utolsó lépésként az immunreakció előhívása a már említett erősített kemilumineszcenciás (ECL) technika segítségével történt. Ehhez egy femto érzékenységű kemilumineszcens reagenssel (Cat. # 34096, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) kezeltük a membránt egy áttetsző műanyag fóliában. A keletkező fényjelek detektálásához a G:BOX Chemi HR1.4 (Syngene, Cambridge, UK) digitális CCD (charge coupled device) kamerát tartalmazó képalkotó rendszerét és a hozzá tartozó értékelő szoftvert használtuk (GeneSys Software, Version 1.5.9.0, Syngene, Cambridge, UK). A vizeletminták denzitometriás értékelése során azok szummációs fényintenzitását az ismert koncentrációjú belső standard hígítási sor fényjeleihez viszonyítottuk, majd a jelintenzitások arányaiból visszszámolva meghatároztuk az egyes minták u-aktin koncentrációját. A koncentráció értékeket ng/ml-ben fejeztük ki. Belső standardként egy egészséges egyén szérum mintájának 3 pontos felező hígítási sorozatát használtuk minden esetben (szétporciózva -70 °C-on tárolva), melynek aktin szintjét korábban egy ismert koncentrációjú, nyúl harántcsíktól izom preparátumból készített standard hígítási sorral határoztuk meg.



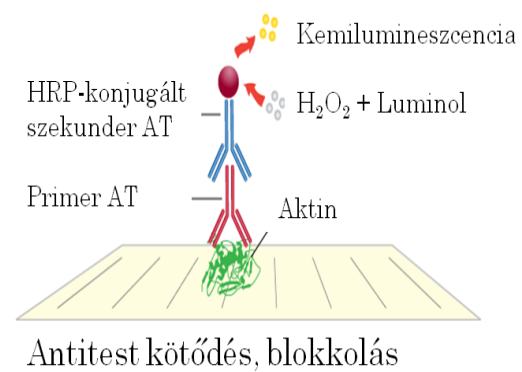
Minta-előkészítés



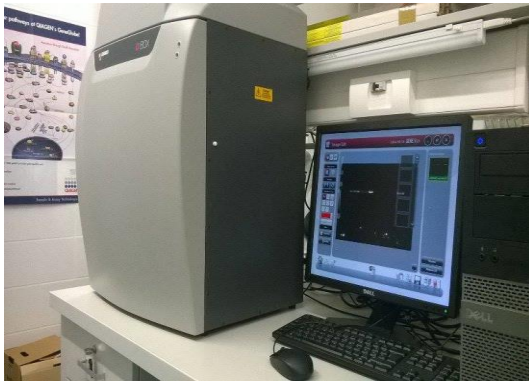
Elektroforézis



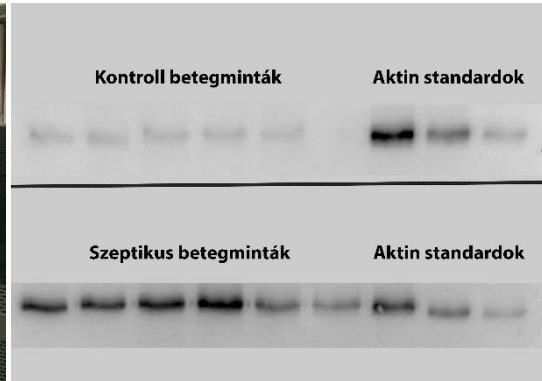
Transzfer



Immunreakció



Előhívás, detektálás



Értékelés

10. ábra. A Western blot lépései, illetve az immunreakció elve.

Elektroforézis:	
A-oldat: Akrilamid elegy	
	30g akrilamid (Reanal) 0,8g N, N'-bisz-akrilamid (SERVA) kimérése után 100ml-re egészítjük ki tridesztillált vízzel.
B-oldat: TRIS puffer az alsó gél elegyhez	
	18,17g TRIS-t (Reanal) vízben oldunk, pH-ját 6N sósavval elektromos pH-mérő kontrollja mellett 8,8-ra állítjuk (kb. 20-25ml sósav szükséges) 4ml 10%-os SDS oldatot keverünk hozzá és 100ml-re egészítjük ki tridesztillált vízzel.
C-oldat: TRIS puffer a felső gél elegyhez	
	6,06g TRIS-t oldás után 6N sósavval 6,8 pH-ra állítjuk 4ml 10%-os SDS-t mérünk hozzá és 100ml-ig hígítjuk fel tridesztillált vízzel.
D-oldat: Puffer oldat az elektroforézishez	
	4-szeres töménységű és 8,3-as pH-jú TRIS-glicin törzsoldat, melyhez 12g TRIS-t 57,6g glicinnel (Reanal) összemérünk, és 1000ml-re egészítjük ki tridesztillált vízzel.
E-oldat: Laemmler minta puffer	
	10ml glicerint 5ml β -merkapto-etanol (Reanal) 30ml 10%-os SDS-t 12,5ml C-oldatot összekeverve 100ml-re felhígítjuk tridesztillált vízzel.
F-oldat: Ammónium-perszulfát oldat (AP)	
	200mg ammónium-perszulfátot (AP, BioRad) 2ml tridesztillált vízben oldunk. Frissen készítjük.
Futtató puffer:	
	125ml D-oldatot és 5ml 10%-os SDS-oldatot 500ml-re egészítettünk ki tridesztillált vízzel.

Transzferálás:
Alternatív puffer: (pH: 8,1-8,3)
48mM Tris 5,8g 39mM Glicin 2,9g Oldás után 1,3mM SDS 3,7ml 10%-os oldata ad 800ml desztillált víz 20% Metanol 200ml Hűtőszekrényben tároljuk, hogy használatkor 4°C-os legyen.

Immunreakció:
TBS (Tris pufferolt sóoldat, pH: 7,5)
50mM Tris 6,05g 150mM NaCl 8,78g pH beállítása 1N HCl-lel 7,5-re és 1000ml-re vízzel kiegészíteni
Tejes-tweenes TBS: blokkoláshoz és a primer, szekunder antitest hígításához
0,1% Tween 20 5% tejpör (non-fat dry milk) 1x hígítású TBS-ben oldva
Tweenes TBS: mosáshoz
0,05% Tween 20 1x hígítású TBS

5. táblázat. A Western blot módszer során felhasznált oldatok és reagensek listája.

III.6. Presepsin:gelsolin arány meghatározása

A plazma PSEP szinteket egy automatizált kemilumineszcenciás immunkémiai módszeren alapuló Point of Care berendezés (PATHFAST™; LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan) segítségével mértük meg, melynek méréstartománya 20 – 20,000 pg/ml [141]. A kalibrációs mérések (alacsony és magas gyári kontroll mintákkal ellenőrizve) és a betegminták PSEP szintjeinek detektálása minden esetben a gyártói előírásoknak megfelelően zajlottak. A mérések során használt reagens kazetták és az automata a 11. ábrán látható.

A szérum GSN szinteket egy, az intézetünkben kidolgozott és a Cobas 8000/c502 moduljának egyik nyitott fejlesztői csatornájára adaptált automatizált turbidimetrián alapuló immunkémiai módszerrel határoztuk meg [142]. A GSN mérések során használt automata analizátor a 12. ábrán látható. A fentebb ismertetett két paraméterből számoltuk ki a második tanulmányunkban vizsgált hányadost, a PSEP:GSN arányt.



11. ábra. A PATHFAST™ presepsin kazetták (balra) és az automata készülék (jobbra).



12. ábra. A rutin laboratóriumi mérésekhez és a gelsolin detektálásához használt Cobas 8000/c502 automata analizátor.

III.7. Statisztikai analízisek

Statisztikai elemzéseket a Windows operációs rendszer alatt futó SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) statisztikai elemző szoftver 22-es verziójával (IBM Corp. NY, USA) végeztünk. Normalitás vizsgálat után (Shapiro-Wilk teszt) nem normál eloszlású változóink miatt nem parametrikus eljárásokat alkalmaztunk. A betegcsoportok közötti különbségek elemzéséhez minőségi változók esetén Khi-négyzet próbát, míg mennyiségi változók esetén Mann-Whitney U tesztet (2 csoport), illetve Kruskal-Wallis tesztet (több csoport) használtunk, a követés alatti változások vizsgálatához pedig Wilcoxon tesztet (2 csoport) és Friedman-próbát (több csoport) alkalmaztunk. A tanulmányainkban analizált biomarkerek diagnosztikus és prognosztikus teljesítményének kiértékelését ROC (Receiver operating characteristics) analízissel abszolváltuk, míg a kapott AUC (görbe alatti terület) értékek összevetését DeLong teszttel végeztük. Mennyiségi változóink korrelációs elemzéseinkhez Spearman-féle korrelációs vizsgálatokat folytattunk. A statisztikai elemzések során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Dolgozatomban minőségi változók esetén a gyakoriságot és annak százalékos arányát (%), míg mennyiségi változók esetén a medián és interkvartilis értékeket (25-75%) szemléltetem.

IV. Eredmények

IV.1. Vizelet-aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban

IV.1.1. Klinikai és laboratóriumi paraméterek

A kontroll, szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegek demográfiai és laboreredményei

Első tanulmányunkba 24 egészséges kontroll egyént, 17 szeptikus és 43 szepszis-indukálta AKI beteget vontunk be. A legfontosabb demográfiai és a felvétel utáni laboradatok az 6. táblázatban találhatóak. A vizsgált betegcsoportok eltértek ($p < 0,05$) a kor, a nem és némely alapbetegségek tekintetében. Jelentős különbségeket találtunk ($p < 0,05$) a kontroll, szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegek között a vérből (összfehérje, albumin, kreatinin, CK, hs-CRP, PCT, fehérvérsejtszám, trombocitaszám) és vizeletből (összfehérje, albumin, orosomucoid, CysC, aktin) mért labor paraméterek többségét tekintve.

6. táblázat. A kontroll és szeptikus betegek demográfiai és felvétel utáni laboradatai.

Betegcsoportok	Kontroll (n=24)	Szepszis (n=17)	Szepszis + AKI (n=43)	p érték
Életkor (évek)	54 (48 - 57)	73 (64 - 78)	64 (53 - 70)	<0,05 ^{a,b,c}
Férfiak, n (%)	10 (41,7)	8 (47,1)	33 (76,7)	<0,05 ^{b,c}
Alapbetegségek, n (%)				
Kardiovaszkuláris megbetegedés	11 (45,8)	15 (88,2)	30 (69,8)	<0,05 ^a
2-es típusú diabétesz	4 (16,7)	3 (17,6)	15 (34,9)	ns
Krónikus vesebetegség	0	3 (17,6)	5 (11,6)	<0,05 ^a
Tüdőbetegség	1 (4,2)	3 (17,6)	11 (25,6)	<0,05 ^b
Immunológiai betegség	2 (8,3)	1 (5,9)	3 (6,9)	ns
Tumor	0	4 (23,5)	12 (27,9)	<0,05 ^{a,b}
Felvételi laboratóriumi paraméterek				
se-összfehérje (g/l)	71,6 (67,4 - 73,7)	40,9 (38,6 - 46,9)	46,9 (42,2 - 50,4)	<0,05 ^{a,b}
se-albumin (g/l)	42,7 (40,1 - 46,3)	21,2 (19,5 - 25,9)	23,1 (19,2 - 26,6)	<0,05 ^{a,b}
se-kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	71 (67 - 76)	91 (67 - 121)	182 (142 - 328)	<0,05 ^{a,b,c}

se-CK (U/l)	40 (54 - 73)	198 (145 - 649)	305 (88 - 1047)	<0,05 ^{a,b}
Fehérvérsejtszám (G/l)	5,9 (4,7 - 6,9)	13,2 (9,8 - 17,5)	16,4 (9,9 - 20,5)	<0,05 ^{a,b}
Trombocitaszám (G/l)	265 (226 - 301)	223 (159 - 265)	162 (95 - 301)	<0,05 ^{a,b}
hs-CRP (mg/l)	1,5 (0,6 - 1,8)	304,2 (188,9 - 372,4)	276,1 (138,6 - 388,7)	<0,05 ^{a,b}
PCT (ng/ml)	-	7,9 (3,1 - 20,6)	23,6 (6,1 - 59,9)	<0,05 ^c
se-aktin (mg/l)	0,75 (0,6 - 0,9)	0,68 (0,4 - 1,1)	0,84 (0,5 - 1,2)	ns
u-összfehérje (mg/L)	60 (40 - 90)	230 (50 - 425)	440 (240 - 1020)	<0,05 ^{a,b,c}
u-albumin (mg/L)	3,5 (2,0 - 12,5)	17,1 (3,4 - 54,4)	61,8 (26,8 - 169,2)	<0,05 ^{a,b,c}
u-orosomucoid (mg/l)	1,2 (0,3 - 3,2)	32,6 (17,8 - 87,5)	72,1 (23,7 - 144,8)	<0,05 ^{a,b}
u-CysC (mg/l)	0,06 (0,03 - 0,08)	0,46 (0,1 - 1,1)	1,04 (0,2 - 3,5)	<0,05 ^{a,b}
u-aktin (µg/l)	0,78 (0,3 - 1,9)	1,27 (0,6 - 2,5)	9,5 (3,2 - 23,7)	<0,05 ^{b,c}
u-aktin/u-kreatinin (µg/mmol)	0,13 (0,1 - 0,2)	0,6 (0,4 - 1,4)	2,59 (0,6 - 10,4)	<0,05 ^{a,b,c}
u-aktin/u-összfehérje (%)	0,17 (0,1 - 0,3)	0,08 (0,04 - 0,26)	0,21 (0,1 - 1,1)	<0,05 ^c

A csoportok összehasonlításához Khi-négyzet próbát, valamint Kruskal-Wallis és Mann-Whitney U és tesztet használtunk. Minőségi változók esetén a gyakoriságot (%), míg mennyiségi változók esetén a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns. A felsőindexben látható betűk jelzik a post-hoc analízisek eredményeit: a: Kontroll vs. Szepszis: $p < 0,05$; b: Kontroll vs. Szepszis + AKI: $p < 0,05$; c: Szepszis vs. Szepszis + AKI: $p < 0,05$.

A szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegek összehasonlítása

A vizsgálatunkba bevont 60 szeptikus beteg fontosabb terápiás szükségletei a következők voltak: 22 ápoltnál noninvazív oxigén terápia, 38 érintettnél gépi lélegeztetés (medián Horowitz index: 221,2 Hgmm), 47 betegnél hidrokortizon támogatás, valamint 51 érintettnél vazopresszor igény merült fel, emellett 30 betegnél találtunk emelkedett laktát szinteket (> 2 mmol/l) a követés során. A szeptikus betegcsoportok fontosabb klinikai paraméterei a 7. táblázatban olvashatók. A szeptikus és szepszis-indukálta AKI csoportok között nem volt számottevő differencia az ITO kezelés hosszát illetően, bár a szeptikus csoportban arányosan gyakoribb volt a sebészeti ok miatti osztályos felvétel a szepszis-indukálta AKI betegekhez képest. Ugyan a két csoport között nem volt szignifikáns különbség a 30-napos mortalitás tekintetében, viszont az AKI-1 (8 beteg, 80%)

és az AKI-2 (10 beteg, 71,4%) stádiumú szeptikus betegeknel magasabb volt a halálozási arány, mint az AKI-3 (10 beteg, 52,6%) súlyosságú és a vesekárosodás nélküli szeptikus (8 beteg, 47,1%) betegeknel. Ezen kívül a szepszis-indukálta AKI csoportban 18 betegnel (41,9%) merült fel valamilyen fajta vesepótló kezelési (RRT) igény. A klinikai prognosztikai score-ok tekintetében a vesekárosodás nélküli szeptikus csoporthoz képest jelentősen emelkedett ($p < 0,05$) pontszámokat figyeltünk meg a szepszis-indukálta AKI betegeknel, valamint a szepszishez társuló többszervi elégtelenség (MODS) is gyakrabban fordult elő az utóbbi csoportban (69,8%) az előbbihez képest (53,0%). A szepszis-indukálta AKI és a vesekárosodás nélküli szeptikus csoportokban az AKI-n kívül a leggyakoribb szepszishez társuló szervi diszfunkciók a következők voltak: szepszis-indukálta hipotenzio (78,1% vs. 76,5%), akut tüdőszérülés (48,7% sv. 52,9%), trombocitopénia (25,6% vs. 11,8%), akut májelégtelenség (25,6% vs. 5,9%).

7. táblázat. A szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegek klinikai paraméterei.

Betegcsoportok	Szepszis (n=17)	Szepszis + AKI (n=43)	p érték
Életkor (évek)	73 (64 - 78)	64 (53 - 70)	<0,05
Férfiak, n (%)	8 (47,1)	33 (76,7)	<0,05
Felvétel típusa			
Belgyógyászati ok, n (%)	3 (17,6)	22 (51,1)	<0,05
Sebészeti ok, n (%)	14 (82,4)	21 (48,9)	<0,05
ITO kezelési napok száma	9 (5 - 17)	6 (3 - 15)	ns
30-napos mortalitás, halál (%)	8 (47,1)	28 (65,1)	ns
Vesepótló kezelést igénylő AKI, n (%)	-	18 (41,9)	-
Klinikai prognosztikai pontszámok			
APACHE II pontszám	15 (11 - 17)	24 (17 - 27)	<0,05
SAPS II pontszám	41 (33 - 46)	55 (41 - 64)	<0,05
SOFA pontszám	8 (7 - 11)	11 (9 - 13)	<0,05
Szepszissel társult szervi diszfunkciók, n (%)			
1	4 (23,5)	5 (11,6)	ns
2	4 (23,5)	7 (16,3)	ns

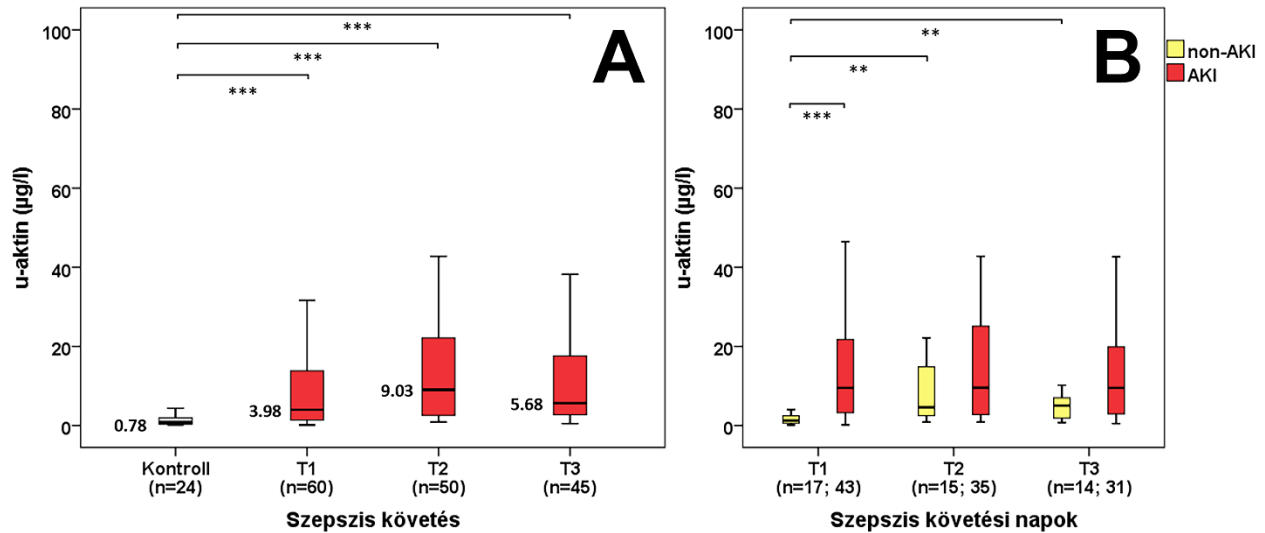
≥3	9 (53,0)	31 (72,1)	ns
Azonosított kórokozók, n (%)			
Ismeretlen	6 (35,3)	11 (25,6)	ns
Gram-pozitív baktérium	1 (5,9)	6 (13,9)	ns
Gram-negatív baktérium	4 (23,5)	10 (23,3)	ns
Gomba	1 (5,9)	4 (9,3)	ns
Kevert	5 (29,4)	12 (27,9)	ns

A csoportok összehasonlításához Khi-négyzet próbát és Mann-Whitney U és tesztet használtunk. Minőségi változók esetén a gyakoriságot (%), míg mennyiségi változók esetén a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns.

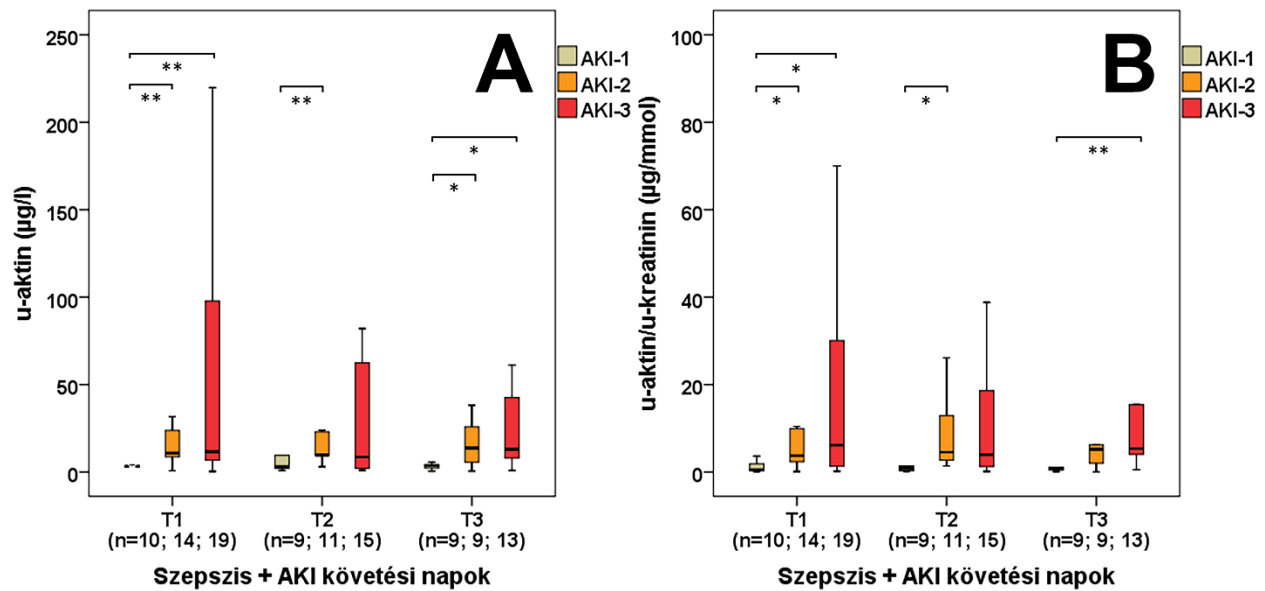
IV.1.2. A vizelet-aktin kontroll, szeptikus és szepszis-indukálta vesekárosodott betegekben

A se-aktin szinteket illetően nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a kontroll és szeptikus betegek között a követés első (medián: 0,75 vs. 0,8 mg/l, $p=0,757$), második (medián: 0,75 vs. 0,78 mg/l, $p=0,584$) és harmadik (medián: 0,75 vs. 0,79 mg/l, $p=0,608$) napján. Ezzel ellentétben számottevően megemelkedett u-aktin koncentrációkat detektáltunk a kontroll és a szeptikus csoportok között a követés első (medián: 0,78 vs. 3,98 $\mu\text{g/l}$, $p<0,001$), második (medián: 0,78 vs. 9,03 $\mu\text{g/l}$, $p<0,001$) és harmadik (medián: 0,78 vs. 5,68 $\mu\text{g/l}$, $p<0,001$) napján (13A. ábra). Emellett a szepszis-indukálta AKI betegeknél is jelentősen magasabb u-aktin szinteket mértünk a vesekárosodás nélküli szeptikus betegekhez képest az első (medián: 1,27 vs. 9,52 $\mu\text{g/l}$, $p<0,001$) napon, viszont ezen különbség már nem volt statisztikailag szignifikáns a követés második (medián: 4,61 vs. 9,55 $\mu\text{g/l}$, $p=0,368$) és harmadik (medián: 5,05 vs. 9,51 $\mu\text{g/l}$, $p=0,220$) napján (13B. ábra). A szepszis-indukálta AKI betegek AKI stádiumok szerinti besorolása a KDIGO klasszifikáció alapján történt az első mintavételi napon. Ezek alapján a követés első napján az AKI-1 és AKI-2 (medián: 3,16 vs. 10,78 $\mu\text{g/l}$, $p<0,01$), valamint az AKI-1 és AKI-3 (medián: 3,16 vs. 11,55 $\mu\text{g/l}$, $p<0,01$) stádiumú szeptikus betegek között is jelentősen emelkedett u-aktin szinteket találtunk, míg ez a különbség a második napon az AKI-1 és AKI-2 (medián: 3,22 vs. 9,68 $\mu\text{g/l}$, $p<0,01$), továbbá a harmadik napon az AKI-1 és AKI-2 (medián: 3,66 vs. 13,76 $\mu\text{g/l}$, $p<0,05$), valamint az AKI-1 és AKI-3 (medián: 3,66 vs. 12,92 $\mu\text{g/l}$, $p<0,05$) súlyosságú szeptikus betegeknél is fennmaradt (14A. ábra). Ezen emelkedő tendencia az u-aktin értékek vizelet-

kreatininre történő vonatkoztatása után is markáns volt az első napon az AKI-1 és AKI-2 (medián: 0,47 vs. 3,74 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $p < 0,05$), valamint az AKI-1 és AKI-3 (medián: 0,47 vs. 6,16 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $p < 0,05$) stádiumú szeptikus betegeknek, a második napon az AKI-1 és AKI-2 (medián: 0,87 vs. 4,53 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $p < 0,05$), továbbá a harmadik napon az AKI-1 és AKI-3 (medián: 0,84 vs. 5,37 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $p < 0,05$) súlyosságú szeptikus betegeknek (14B. ábra).



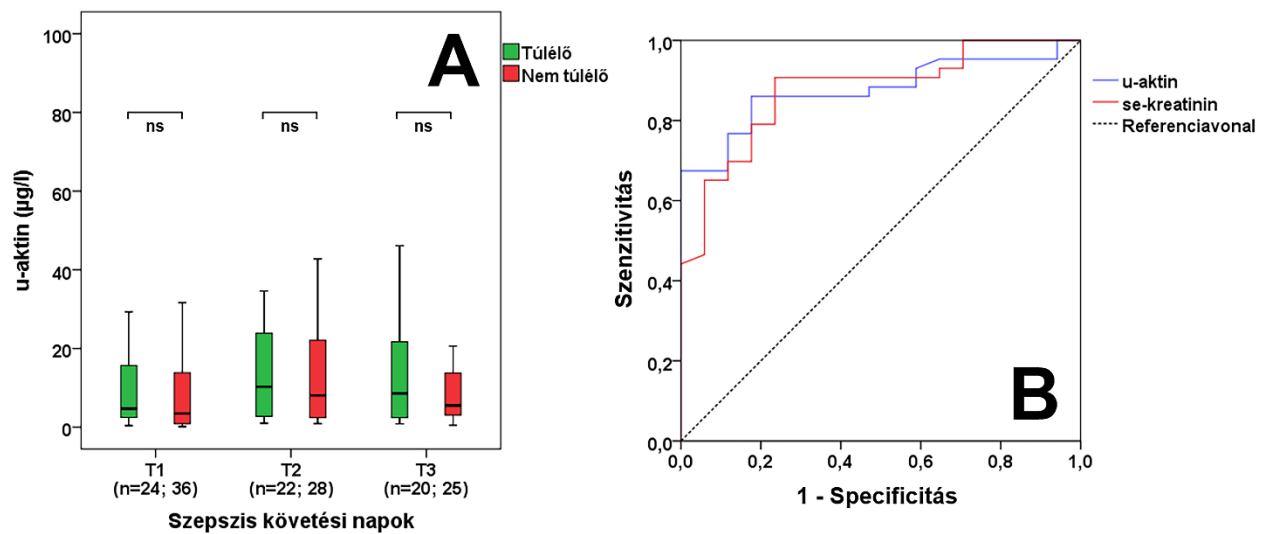
13. ábra. Vizelet-aktin szeptisben. U-aktin szintek kontroll és szeptikus (A), valamint szeptikus és szeptikus-indukálta AKI betegekben. n: mintaszám. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



14. ábra. Vizelet-aktin szeptis-indukálta vesekárosodásban. U-aktin (A) és u-aktin/u-kreatinin (B) szintek az egyes AKI stádiumokban. n: mintaszám. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

IV.1.3. A vizelet-aktin prognosztikai és korrelációs vizsgálatokban

A szeptikus betegek 30 napos mortalitási adatait elemezve nem találtunk jelentős különbséget az u-aktin szintekben a túlélők és nem túlélők között (15A. ábra). Az első napi u-aktin szintek diagnosztikus hatékonyságát ROC analízissel végeztük (15B. ábra). A szepszis-indukálta AKI és a vesekárosodás nélküli szeptikus betegek differenciálása során kiszámolt görbe alatti értékek (AUC) a következők voltak: u-aktin: 0,876 ($p < 0,001$); se-kreatinin: 0,875 ($p < 0,001$). A származtatott cut-off értékek: u-aktin: 2,63 $\mu\text{g/l}$ (szenszitivitás: 86,0%, specificitás: 82,4%); se-kreatinin: 111 $\mu\text{mol/l}$ (szenszitivitás: 90,7%, specificitás: 76,5%).



15. ábra. Vizelet-aktin a szepszis prognosztikájában. U-aktin szintek túlélő és nem túlélő szeptikus betegekben 30-napos mortalitás alapján (A). Szepszis-indukálta AKI és vese-károsodás nélküli szeptikus betegek elkülönítése első napi laborparaméterek alapján ROC analízis használatával (B). n: mintaszám. ns: nem szignifikáns.

Korrelációk

Korrelációs vizsgálatainkban mindhárom mintagyűjtési pont laborértékeit felhasználtuk, emellett az eredményeink bemutatásánál a natív u-aktin értékeket prezentáltuk az u-aktin/u-kreatininnel mutatott erős korrelációja miatt ($\rho = 0,898$; $p < 0,001$). Az u-aktin koncentrációk közepes korrelációt ($p < 0,001$) mutattak a se-kreatininnel ($\rho = 0,371$), valamint a vizelet paraméterek közül az összfehérjével ($\rho = 0,489$), az albuminnal ($\rho = 0,617$), az orosmucoiddal ($\rho = 0,367$), valamint a

CysC-vel ($p=0,434$). Emellett még az u-aktin szintek gyenge korrelációt ($p<0,01$) mutattak a se-aktinnal ($p=0,272$), valamint a fehérvérsejtszámmal ($p=0,223$).

IV.2. Presepsin:gelsolin arány szeptiszben és szeptiszsel társuló szervi elégtelenségekben

IV.2.1. Klinikai és laboratóriumi paraméterek

Második tanulmányunkba 23 egészséges kontroll egyént, 38 intenzív osztályon kezelt nem szeptikus és 65 szeptikus beteget vontunk be. A legfontosabb demográfiai, valamint a felvétel utáni laboratóriumi és klinikai adatok az 8. táblázatban találhatóak. A vizsgált betegcsoportok eltértek ($p<0,05$) az életkor és némely alapbetegségek esetében. Jelentős különbségeket találtunk ($p<0,05$) a kontroll, nem szeptikus és szeptikus betegek között a vérből mért labor paraméterek többségét illetően (szérum összfehérje, albumin, karbamid, kreatinin, hs-CRP, PCT, PSEP, GSN, fehérvérsejtszám, trombocitaszám és PSEP:GSN arány), ráadásul a nem szeptikus és szeptikus betegek között a vizsgált klinikai pontszámokban (APACHE II, SAPS II, SOFA) és az ITO kezelési napok számában is markáns eltéréseket tapasztaltunk.

Az általunk vizsgált 38 nem szeptikus beteg fontosabb terápiás szükségletei a következők voltak: minden érintett adekvát folyadékpótlást kapott a kezelés során, viszont 23 betegnél felmerült rövid időtartamú alacsony dózisú vazopresszor támogatás, továbbá 36 érintett noninvazív oxigén terápiában részesült, azonban 2 betegnél szükséges volt ideiglenesen gépi lélegeztetésre, valamint ebben a betegcsoportban senkinél sem merült fel vesepótló kezelési igény az ITO kezelés során.

8. táblázat. A kontroll, nem szeptikus és szeptikus betegek demográfiai, valamint felvétel utáni laboratóriumi és klinikai adatai.

Betegcsoportok	Kontroll (n=23)	Nem Szeptikus (n=38)	Szeptikus (n=65)	p érték
Életkor (évek)	52 (48 - 56)	64 (56 - 72)	68 (57 - 73)	<0,05 ^{a,b}
Férfiak, n (%)	13 (56,5)	26 (68,4)	43 (66,2)	ns
Alapbetegségek, n (%)				
Kardiovaszkuláris megbetegedés	10 (43,5)	33 (86,8)	51 (78,5)	<0,05 ^{a,b}
2-es típusú diabétesz	5 (21,7)	12 (24,9)	19 (29,2)	ns
Krónikus vesebetegség	0	3 (7,9)	8 (12,3)	ns
Tüdőbetegség	2 (8,7)	11 (28,9)	12 (18,5)	ns

Immunológiai betegség	1 (4,3)	2 (5,2)	2 (3,1)	ns
Tumor	0	10 (26,3)	18 (27,7)	<0,05 ^{a,b}
Felvételi laboratóriumi paraméterek				
se-összfehérje (g/l)	76,1 (72,2 - 77,7)	51,7 (47,3 - 57,4)	47,6 (40,3 - 50,3)	<0,05 ^{a,b,c}
se-albumin (g/l)	49,2 (46,9 - 51,1)	34,3 (29,2 - 38,5)	23,4 (19,5 - 27,7)	<0,05 ^{a,b,c}
se-karbamid (mmol/l)	4,6 (4,0 - 5,5)	4,4 (3,5 - 5,8)	15,1 (9,9 - 24,9)	<0,05 ^{b,c}
se-kreatinin (μmol/l)	76 (70 - 86)	73 (62 - 99)	159 (99 - 285)	<0,05 ^{b,c}
se-bilirubin (μmol/l)	11,2 (6,7 - 15,9)	7,3 (5,4 - 14,1)	9,7 (5,1 - 21,9)	ns
Fehérvérsejtszám (G/l)	7,2 (6,4 - 7,9)	14,1 (12,1 - 16,2)	16,4 (10,6 - 22,7)	<0,05 ^{a,b}
Trombocitaszám (G/l)	262 (249 - 300)	165 (132 - 205)	197 (139 - 301)	<0,05 ^{a,b}
hs-CRP (mg/l)	1,3 (0,6 - 2,5)	102,8 (72,6 - 141,6)	284,2 (172,8 - 382,1)	<0,05 ^{a,b,c}
PCT (ng/ml)	-	0,7 (0,3 - 2,1)	10,9 (4,5 - 48,7)	<0,05 ^c
PSEP (pg/ml)	127 (89,5 - 159)	329 (209,5 - 442,5)	1185 (501 - 3073)	<0,05 ^{a,b,c}
GSN (mg/l)	78,5 (75,1 - 89,1)	34,3 (28,7 - 40,3)	11,2 (6,1 - 20,8)	<0,05 ^{a,b,c}
PSEP:GSN arány (ng/mg)	1,7 (1,1 - 2,1)	9,9 (5,5 - 14,3)	105,9 (41,1 - 322,7)	<0,05 ^{a,b,c}
Felvételi klinikai paraméterek				
APACHE II pontszám	-	7 (6 - 8)	20 (15 - 24)	<0,05 ^c
SAPS II pontszám	-	20 (17 - 26)	46 (36 - 55)	<0,05 ^c
SOFA pontszám	-	5,5 (3 - 7)	10 (8 - 12)	<0,05 ^c
ITO kezelési napok száma	-	2 (1 - 3)	8 (4 - 14)	<0,05 ^c

A csoportok összehasonlításához Khi-négyzet próbát, valamint Kruskal-Wallis és Mann-Whitney U és tesztet használtunk. Minőségi változók esetén a gyakoriságot (%), míg mennyiségi változók esetén a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns. A felsőindexben látható betűk jelzik a post-hoc analízisek eredményeit: a: Kontroll vs. Nem szeptikus: $p < 0,05$; b: Kontroll vs. Szeptikus: $p < 0,05$; c: Nem szeptikus vs. Szeptikus: $p < 0,05$.

A szeptikus és szepszissel társult többszervi szervéltelen betegek összehasonlítása

A vizsgálatunkba bevont 65 szeptikus beteg fontosabb terápiás szükségletei a következők voltak: 17 ápoltnál noninvaszív oxigén terápia, 48 érintettnél gépi lélegeztetés (medián Horowitz index:

184 Hgmm), 53 betegnél hidrokortizon támogatás, valamint 54 érintettnél vazopresszor igény merült fel a követés során. A gépi lélegeztetett szepszis betegek többsége a felvételt követően propofol vagy dexmedetomidin szedációban részesült, emellett mindössze 11 érintettnél alakult ki trombocitopénia és szintén 11 betegnek volt akut májelégtelensége.

A szepszis beteget tovább bontottuk a szepszissel társult többszervi elégtelenség (MODS) előfordulása alapján (2 vagy több vitális szervrendszer elégtelensége), a vizsgált csoportok felvétel utáni laboratóriumi és klinikai paraméterei a 9. és 10. táblázatokban olvashatók. A szepszis (24 fő) és a szepszis-indukálta MODS (41 fő) betegek között nem volt számottevő különbség az életkor, a nem, a felvétel oka, az infekció forrása, a hidrokortizon támogatás, a trombocitaszám és a hs-CRP szintek tekintetében. Ezzel szemben a két csoport között szignifikáns differencia ($p < 0,05$) mutatkozott az ITO kezelés hosszát, a 10-napos mortalitást, a klinikai prognosztikai pontszámokat (APACHE II, SAPS II, SOFA), a vizsgált laboratóriumi paraméterek zömét (szérum albumin, kreatinin, bilirubin, PCT, PSEP, GSN és PSEP:GSN arány) és a fontosabb terápiás igények többségét illetően. A szepszis-indukálta MODS és a többszervi elégtelenség nélküli szepszis csoportokban a leggyakoribb szepszissel társuló szervi diszfunkciók a következők voltak: szepszis-indukálta hipotenzió (97,6% vs. 58,3%), akut vesekárosodás (87,8% vs. 37,5%), akut tüdőszűrés (75,6% vs. 20,8%).

9. táblázat. A szepszis és szepszis-indukálta MODS betegek labor- és klinikai paraméterei.

Betegcsoportok	Szepszis MODS nélkül (n=24)	Szepszis + MODS (n=41)	p érték
Életkor (évek)	69 (59 - 79)	66 (56 - 72)	ns
Férfiak, n (%)	15 (62,5)	28 (68,3)	ns
Felvételi laboratóriumi paraméterek			
se-albumin (g/l)	24,8 (21,5 - 29,1)	22,1 (18,4 - 25,4)	<0,05
se-kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	105 (84 - 155)	196 (149 - 340)	<0,05
se-bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	5,6 (4,5 - 9,1)	18,8 (7,2 - 38,9)	<0,05
Trombocitaszám (G/l)	235 (156 - 298)	182 (94 - 312)	ns
hs-CRP (mg/l)	273,6 (156,9 - 342,5)	290,2 (194,6 - 389,6)	ns
PCT (ng/ml)	7,3 (2,4 - 28,6)	22,3 (6,9 - 59,8)	<0,05

PSEP (pg/ml)	470,5 (354 - 687)	1878 (1071 - 4136)	<0,05
GSN (mg/l)	17,3 (8,4 - 30,9)	10,3 (5,5 - 17,4)	<0,05
PSEP:GSN arány (ng/mg)	26,9 (18,2 - 77,1)	182,7 (95,9 - 609,4)	<0,05
pl-laktát (mmol/l)	1,5 (0,8 - 2,1)	2,4 (1,8 - 4,1)	<0,05
Felvétel típusa			
Belgyógyászati ok, n (%)	9 (37,5)	8 (19,5)	ns
Sebészeti ok, n (%)	15 (62,5)	33 (80,5)	ns
Klinikai prognosztikai paraméterek			
APACHE II pontszám	14 (11 - 19)	22 (19 - 26)	<0,05
SAPS II pontszám	37 (33 - 43)	51 (45 - 57)	<0,05
SOFA pontszám	8 (6 - 9)	11 (10 - 13)	<0,05
Emelkedett pl-laktát (>2 mmol/l), n (%)	6 (25,0)	27 (65,9)	<0,05
ITO kezelési napok száma	4 (3 - 9)	10 (6 - 15)	<0,05
10-napos mortalitás, halál (%)	1 (4,2)	17 (41,5)	<0,05
Vesepótló kezelést igénylő AKI, n (%)	2 (8,3)	13 (31,7)	<0,05

A csoportok összehasonlításához Khi-négyzet próbát és Mann-Whitney U és tesztet használtunk. Minőségi változók esetén a gyakoriságot (%), míg mennyiségi változók esetén a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns.

10. táblázat. A szeptikus betegek terápiás és mikrobiológiai paraméterei.

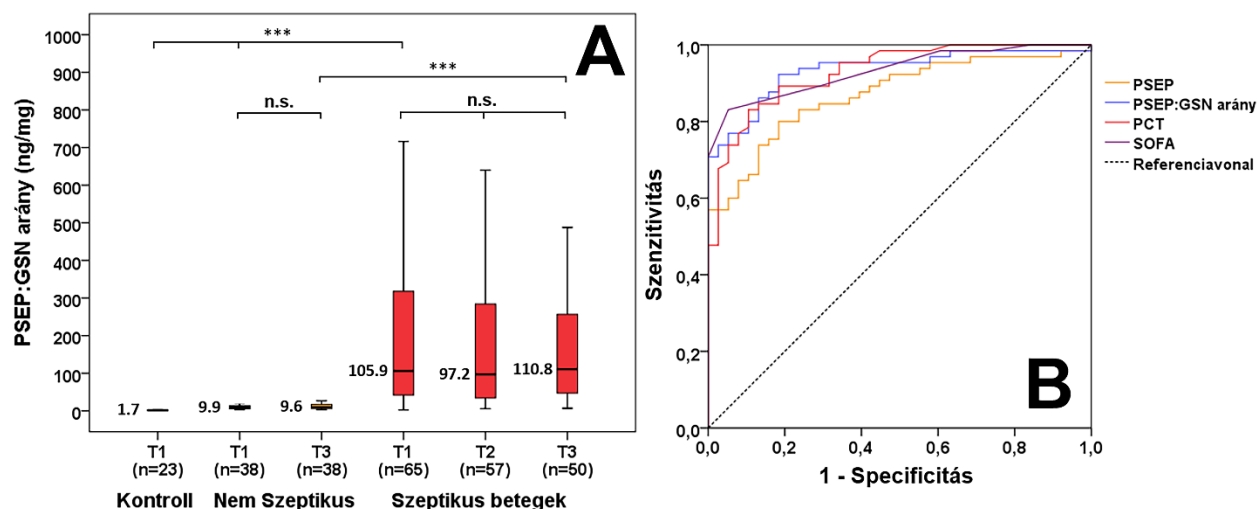
Betegcsoportok	Szepszis MODS nélkül (n=24)	Szepszis + MODS (n=41)	p érték
Terápiás szükségletek, n (%)			
Vazopresszor támogatás	14 (58,3)	40 (97,6)	<0,05
Noninvazív oxigén terápia	13 (54,2)	4 (9,8)	<0,05
Gépi lélegeztetés	11 (45,8)	37 (90,2)	<0,05
Hidrokortizon támogatás	18 (75,0)	35 (85,4)	ns
Infekció forrása, n (%)			
Légúti eredet	5 (20,8)	11 (26,8)	ns

Húgyúti eredet	4 (16,7)	5 (12,2)	ns
Hasi eredet	7 (29,1)	12 (29,3)	ns
Lágyrész/Csont eredet	4 (16,7)	5 (12,2)	ns
Kevert eredet	4 (16,7)	8 (19,5)	ns
Azonosított kórokozók, n (%)			
Ismeretlen	13 (54,2)	7 (17,1)	<0,05
Gram-pozitív baktérium	2 (8,3)	6 (14,6)	ns
Gram-negatív baktérium	1 (4,2)	6 (14,6)	ns
Gomba	2 (8,3)	2 (4,9)	ns
Kevert	6 (25,0)	20 (48,8)	<0,05

A csoportok összehasonlításához Khi-négyzet próbát használtunk, így mindenhol a gyakoriságot (%) tüntettük fel. ns: nem szignifikáns.

IV.2.2. A presepsin:gelsolin arány kontroll, nem szeptikus, szeptikus és szepszis-indukálta vesekárosodott betegekben

Jelentős emelkedést észleltünk a PSEP:GSN arányt illetően mind az első (medián: 1,7 vs. 9,9 ng/mg, $p<0,001$) napi kontroll és nem szeptikus, mind az első (medián: 9,9 vs. 105,9 ng/mg, $p<0,001$) és harmadik (medián: 9,6 vs. 116,7 ng/mg, $p<0,001$) napi nem szeptikus és szeptikus csoportok között. Ugyanakkor a marker kinetikáját tekintve nem tapasztaltunk szignifikáns változást a nem szeptikus (T1, T3) és szeptikus (T1, T2, T3) csoportokban (16A. ábra). Az első napi PSEP:GSN arány diagnosztikus és prognosztikus hatékonyságát ROC analízissel végeztük, melynek részletes adatai a 11. és 12. táblázatokban láthatók. A nem szeptikus és szeptikus betegek elkülönítése során ($p<0,001$) az első napi PSEP:GSN arány (AUC értékek alapján) hasonlóan hatékonynak mutatkozott, mint a SOFA ($p<0,001$), a PCT ($p<0,001$) és a PSEP ($p<0,001$) (16B. ábra, 11. táblázat).



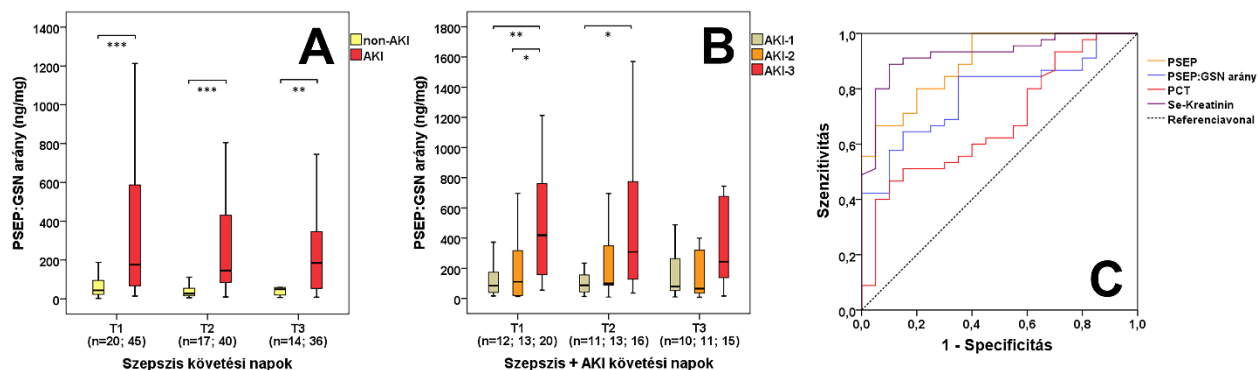
16. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszisben. PSEP:GNS arányok összehasonlítása kontroll, nem szeptikus és szeptikus betegekben a követés során (A). Nem szeptikus és szeptikus betegek differenciálása első napi labor- és klinikai paraméterek alapján ROC analízis használatával (B). n: mintaszám. ns: nem szignifikáns. *** $p < 0,001$.

Presepsin:gelsolin arány szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegeknél

A vesekárosodás nélküli szeptikus betegekhez képest jelentősen magasabb PSEP:GNS arányt észleltünk a szepszis-indukálta AKI betegeknél a követés első (medián: 43,6 vs. 176,1 ng/mg, $p < 0,001$), második (medián: 27,5 vs. 145,1 ng/mg, $p < 0,001$) és harmadik (medián: 49,5 vs. 185,4 ng/mg, $p < 0,05$) napján (17A. ábra). Második vizsgálatunkban is a szepszis-indukálta AKI betegek AKI stádiumok szerinti besorolása a KDIGO klasszifikáció alapján történt az első mintavételi napon. Ezek alapján a követés első napján az AKI-1 és AKI-3 (medián: 85,8 vs. 419,5 ng/mg, $p < 0,05$), valamint az AKI-2 és AKI-3 (medián: 111,1 vs. 419,5 ng/mg, $p < 0,05$) stádiumú szeptikus betegek között is jelentősen emelkedett PSEP:GNS arányt találtunk, míg ez a különbség a második napon is megmaradt az AKI-1 és AKI-3 (medián: 87,6 vs. 308,8 ng/mg, $p < 0,05$) súlyosságú szeptikus betegeknél (17B. ábra). Az összesen 20 AKI-3 stádiumú szeptikus beteg közül 15 (75%) érintettnél merült fel valamilyen RRT igény, így ebben a csoportban összesen 9 (60%) beteg részesült intermittáló hemodialízisben (IHD), míg 6 (40%) érintettnél volt szükség folyamatos vesepótló kezelésre (CRRT).

A szepszis-indukálta AKI és a vesekárosodás nélküli szeptikus betegek differenciálása során a se-kreatinin AUC értéke jobbnak bizonyult ($p < 0,001$), mint a PSEP ($p < 0,001$), a PSEP:GNS arány

($p < 0,001$), valamint a PCT ($p < 0,05$) (17C. ábra, 11. táblázat). Az első napi AKI-3 súlyosságú szeptikus betegeket és a vesekárosodás nélküli szeptikus betegeket is összehasonlítottuk, viszont a se-kreatinin AUC értéke (0,964; $p < 0,001$) így is jobbnak bizonyult a PSEP:GSN arányhoz (0,915; $p < 0,001$) képest.

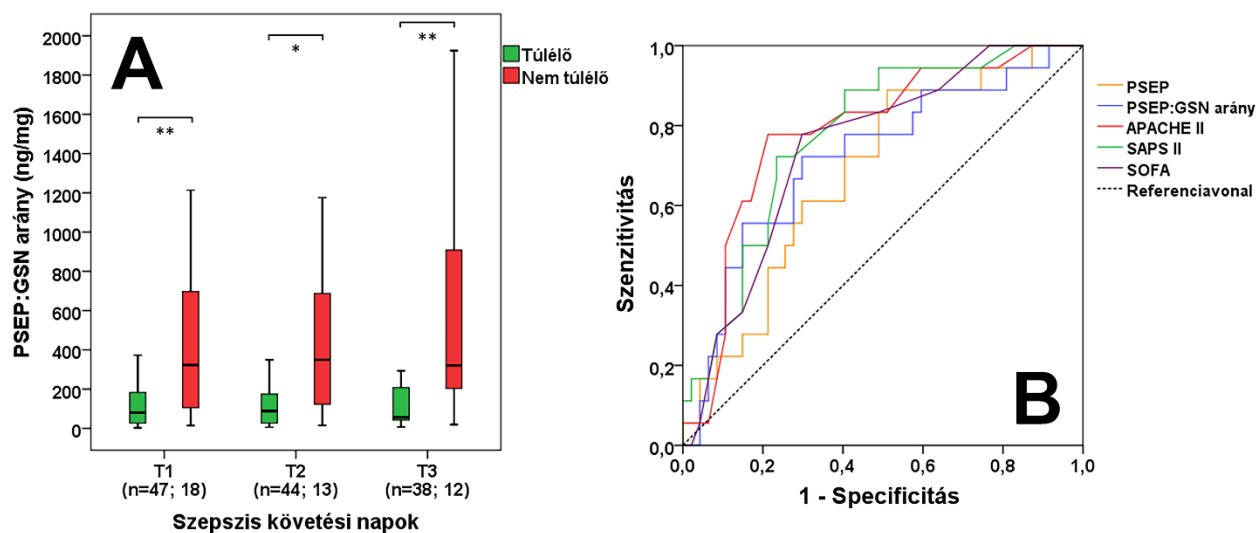


17. ábra. Presepsin:gelosolin arány szeptikus-indukálta vesekárosodásban. A PSEP:GSN arányok változása szeptikus és szeptikus-indukálta AKI betegeknél (A) és az egyes AKI stádiumokban (B). Szeptikus-indukálta AKI és vese-károsodás nélküli szeptikus betegeket elkülönítette első napi labor paraméterek alapján ROC analízissel (C). n: mintaszám. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A presepsin:gelosolin arány hasznossága a szeptikus betegek mortalitás becslésében

A szeptikus betegek 10-napos mortalitási adatait elemezve a PSEP:GSN arányban jelentős különbséget találtunk a túlélők és nem túlélők között a követés első (medián: 80,6 vs. 322,7 ng/mg, $p < 0,01$), második (medián: 88,4 vs. 349,4 ng/mg, $p < 0,05$) és harmadik (56,3 vs. 320,6 ng/mg, $p < 0,01$) napján (18A. ábra).

A túlélő és nem túlélő szeptikus betegek differenciálása során az első napi PSEP:GSN arány AUC értéke ($p < 0,01$) hasonlóan hatékonyan mutatkozott, mint az APACHE II ($p < 0,001$), a SAPS II ($p < 0,01$), a SOFA ($p < 0,01$) és a PSEP ($p < 0,05$) (18B. ábra, 11. táblázat). Egyebekben a PCT AUC értéke (0,511) nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.



18. ábra. Presepsin:gelatin arány a sepszis prognosztikájában. PSEP:GSN arány túlélő és nem túlélő szeptikus betegekben 10-napos mortalitás alapján (A). Túlélő és nem túlélő szeptikus betegek differenciálása első napi labor- és klinikai paraméterek alapján ROC analízis használatával (B). n: mintaszám. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

11. táblázat. Az intenzív osztályon kezelt betegek összehasonlítása ROC analízissel.

Paraméter	AUC (95% konfidencia intervallum)	Standard hiba	Szenz. (%)	Spec. (%)	Cut-off érték	p érték
Nem Szeptikus (n=38) és Szeptikus (n=65) betegek differenciálása						
PSEP (pg/ml)	0,870 (0,803 - 0,937)	0,034	80,0	81,6	479,5	<0,001
PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,933 (0,886 - 0,981)	0,024	92,3	81,6	16,3	<0,001
PCT (ng/ml)	0,930 (0,883 - 0,977)	0,024	89,2	81,6	2,35	<0,001
SOFA pontszám	0,933 (0,887 - 0,978)	0,023	83,1	94,7	7,5	<0,001
Szeptikus non-AKI (n=20) és Szepszis-indukálta AKI (n=45) betegek elkülönítése						
PSEP (pg/ml)	0,897 (0,820 - 0,974)	0,039	80,0	80,0	705,0	<0,001
PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,782 (0,670 - 0,894)	0,057	84,4	65,0	53,6	<0,001
PCT (ng/ml)	0,679 (0,542 - 0,816)	0,071	60,0	60,0	10,1	<0,05
se-kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	0,925 (0,858 - 0,992)	0,034	88,9	90,0	139,5	<0,001
Túlélő (n=47) és nem túlélő (n=18) szeptikus betegek differenciálása 10-napos mortalitás alapján						
PSEP (pg/ml)	0,683 (0,545 - 0,821)	0,071	72,2	59,6	1186,0	<0,05

PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,719 (0,576 - 0,862)	0,073	72,2	70,2	161,2	<0,01
APACHE II pontszám	0,784 (0,659 - 0,908)	0,063	77,8	78,7	21,5	<0,001
SAPS II pontszám	0,778 (0,660 - 0,897)	0,061	72,2	76,6	49,5	<0,01
SOFA pontszám	0,745 (0,619 - 0,827)	0,064	77,8	70,2	10,5	<0,01

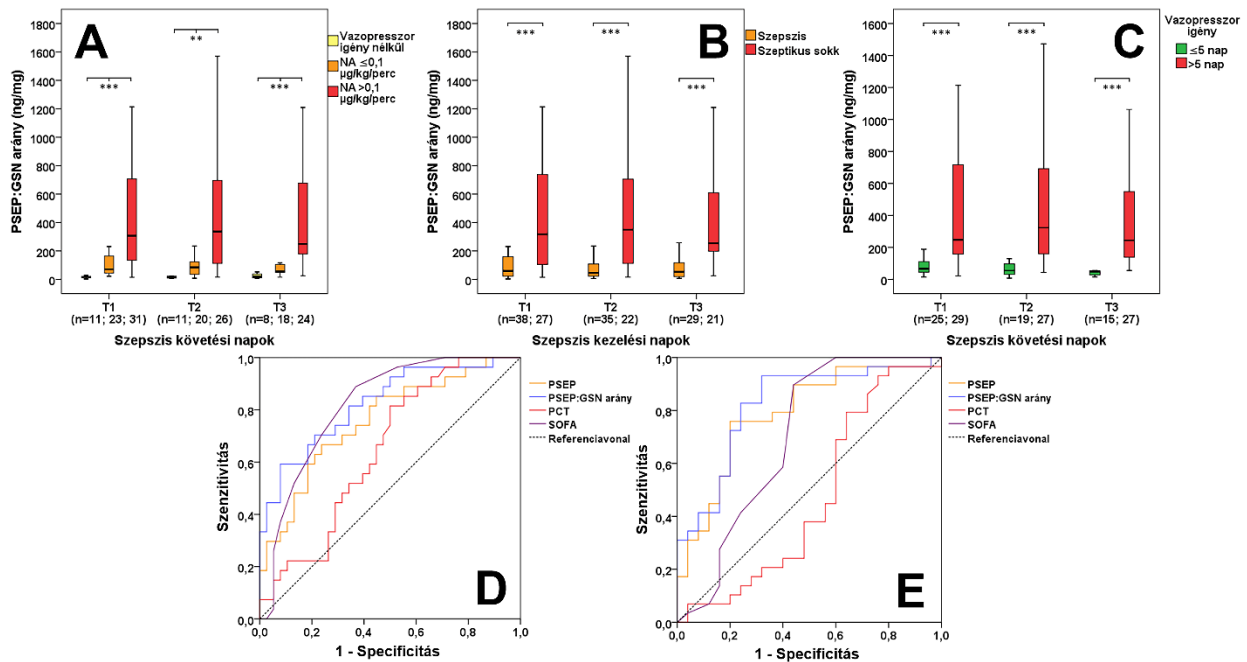
A nem szeptikus, szeptikus és szepszis indukálta vesekárosodott betegek első napi labor- és klinikai paramétereinek összehasonlítása ROC analízis használatával történt. Az AUC (95% konfidencia intervallum alsó és felső tartománya) értékeket, a standard hibát, a szenzitivitást (%), a specificitást (%), az optimális cut-off értéket és a szignifikancia szinteket tüntettük fel.

IV.2.3. A presepsin:gelsolin arány változása szepszissel társuló szervi elégtelenségekben

Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta hemodinamikai elégtelenségben

Második vizsgálatunkban a vazopresszor igény nélküli szeptikus betegekkel, valamint az alacsony ($\leq 0,1 \mu\text{g/kg/perc}$) és magas ($>0,1 \mu\text{g/kg/perc}$) dózisú vazopresszor támogatásra szoruló szeptikus betegekkel arányosan változó PSEP:GSN értékeket találtunk a követés első (medián: 17,4 vs. 70,9 vs. 307,1 ng/mg, $p<0,001$), második (medián: 16,4 vs. 83,9 vs. 336,1 ng/mg, $p<0,01$) és harmadik (medián: 19,1 vs. 54,5 vs. 249,1 ng/mg, $p<0,001$) napján (19A. ábra). Emellett a szeptikus sokk nélküli betegekhez képest jelentősen emelkedett PSEP:GSN arányt észleltünk a szepszis sokkban szenvedő betegeknél a követés első (medián: 59,2 vs. 317,8 ng/mg, $p<0,001$), második (medián: 45,9 vs. 349,3 ng/mg, $p<0,001$) és harmadik (medián: 53,2 vs. 254,1 ng/mg, $p<0,001$) napján (19B. ábra). Ezenkívül az elhúzódó (>5 nap) vazopresszor támogatásra szoruló szeptikus betegekben szignifikánsan magasabb PSEP:GSN arányt detektáltunk a rövidebb (≤ 5 nap) vazopresszor igényű betegekhez viszonyítva a követés első (medián: 66,7 vs. 247,4 ng/mg, $p<0,001$), második (medián: 54,9 vs. 323,1 ng/mg, $p<0,001$) és harmadik (medián: 48,9 vs. 243,9 ng/mg, $p<0,001$) napján. (19C. ábra).

A szeptikus sokkban szenvedő és a sokk nélküli szeptikus betegek differenciálása során az első napi PSEP:GSN arány AUC értéke ($p<0,001$) jobbnak bizonyult, mint a SOFA ($p<0,001$), a PSEP ($p<0,001$) vagy a PCT ($p<0,05$) (19D. ábra, 12. táblázat). Emellett a rövidebb és hosszabb vazopresszor igényű szeptikus betegek elkülönítése során is az első napi PSEP:GSN arány AUC értéke ($p<0,001$) hatékonyabban teljesített, mint a PSEP ($p<0,001$) vagy a SOFA ($p<0,05$), míg a PCT AUC értéke (0,468) nem volt statisztikailag szignifikáns (19E. ábra, 12. táblázat).



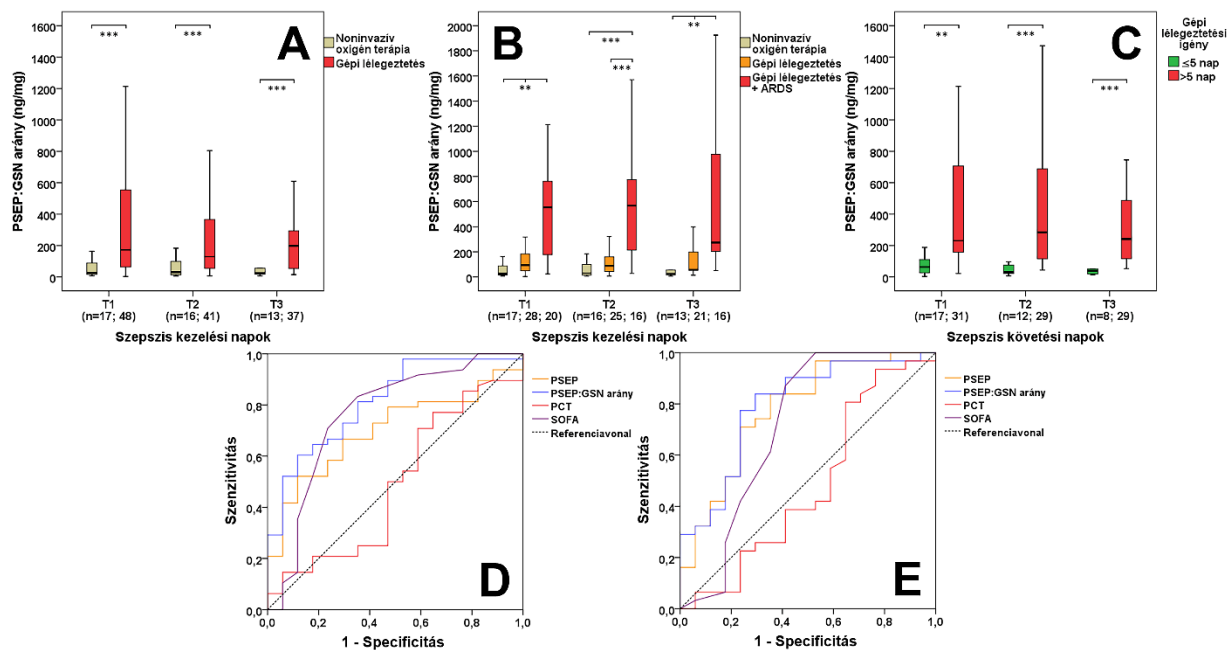
19. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta hemodinamikai elégtelenségben. PSEP:GSN arányok összehasonlítása szeptikus betegekben vazopresszor igény mennyisége (A), valamint a szeptikus sokk kialakulása (B) és a vazopresszor támogatás időtartama (C) alapján. A szeptikus betegek ROC analízissel történő differenciálása a szeptikus sokk kialakulása (D), valamint a vazopresszor igény hossza (E) alapján az első napi labor- és klinikai paraméterek használatával. NA: noradrenalin. n: mintaszám. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta légzési elégtelenségben

A noninvazív oxigén terápiában részesülő szeptikus betegekhez képest jelentősen emelkedett PSEP:GSN arányokat találtunk a gépi lélegeztetésre szoruló szeptikus betegeknél a követés első (medián: 26,9 vs. 173,2 ng/mg, $p < 0,001$), második (medián: 30,5 vs. 129,5 ng/mg, $p < 0,001$) és harmadik (medián: 25,4 vs. 198,5 ng/mg, $p < 0,001$) napján (20A. ábra). Az utóbbi csoportot a (legalább) középsúlyos ARDS kialakulása szerint is tovább bontva még extrémebb növekedést tapasztaltunk a PSEP:GSN arányokban a követés első (medián: 26,9 vs. 94,2 vs. 554,8 ng/mg, $p < 0,01$), második (medián: 30,5 vs. 89,1 vs. 567,3 ng/mg, $p < 0,01$) és harmadik (medián: 25,4 vs. 58,6 vs. 273,6 ng/mg, $p < 0,01$) napján (20B. ábra). Emellett a tartósabb (>5 nap) gépi lélegeztetési igényű szeptikus betegekben szignifikánsan magasabb PSEP:GSN arányt észleltünk a rövidebb ideig (≤5 nap) gépi lélegeztetésre szoruló betegekhez viszonyítva a követés első (medián: 63,2 vs.

230,4 ng/mg, $p < 0,01$), második (medián: 30,9 vs. 284,2 ng/mg, $p < 0,001$) és harmadik (medián: 39,2 vs. 241,5 ng/mg, $p < 0,001$) napján. (20C. ábra).

A noninvazív oxigén terápiában részesülő és a gépi lélegeztetett szeptikus betegek elkülönítése során az első napi PSEP:GSN arány AUC értéke ($p < 0,001$) hasonlóan hatékonynak mutatkozott, mint a SOFA ($p < 0,01$) és a PSEP ($p < 0,05$), viszont a PCT AUC értéke (0,488) nem volt statisztikailag szignifikáns (20D. ábra, 12. táblázat). Ezenkívül a rövidebb és hosszabb gépi lélegeztetési igényű szeptikus betegek differenciálása során az első napi PSEP:GSN arány AUC értékei ($p < 0,01$) jobban teljesítettek, mint a PSEP ($p < 0,01$) vagy a SOFA ($p < 0,05$), míg a PCT AUC értéke (0,480) nem volt statisztikailag szignifikáns (20E. ábra, 12. táblázat).



20. ábra. Presepsin:gelsolin arány szepszis-indukálta légzési elégtelenségben. PSEP:GSN arányok összehasonlítása szeptikus betegekben a noninvazív oxigén terápia és a gépi lélegeztetési igény (A), valamint a (legalább) közepsúlyos ARDS kialakulása (B) és a gépi lélegeztetési igény időtartama (C) szerint. A szeptikus betegek ROC analízissel történő elkülönítése a noninvazív oxigén terápia és gépi lélegeztetés szükségessége (D), valamint a gépi lélegeztetési igény hossza (E) alapján az első napi laboratóriumi és klinikai paraméterek használatával. n: mintaszám. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

12. táblázat. A septicus betegek összehasonlítása ROC analízissel.

Paraméter	AUC (95% konfidencia intervallum)	Standard hiba	Szenz. (%)	Spec. (%)	Cut-off érték	p érték
Szeptikus (n=38) és septicus sokkos (n=27) betegek elkülönítése						
PSEP (pg/ml)	0,757 (0,638 - 0,877)	0,061	66,7	76,3	1618,5	<0,001
PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,824 (0,720 - 0,927)	0,053	70,4	78,9	161,2	<0,001
PCT (ng/ml)	0,646 (0,513 - 0,779)	0,068	66,7	55,3	10,1	<0,05
SOFA pontszám	0,818 (0,715 - 0,920)	0,052	70,4	76,3	10,5	<0,001
Szeptikus betegek differenciálása rövidebb (≤5 nap) (n=25) és hosszabb (>5 nap) (n=29) időtartamú vazopresszor igény alapján						
PSEP (pg/ml)	0,789 (0,666 - 0,912)	0,063	75,9	80,0	1618,5	<0,001
PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,821 (0,705 - 0,937)	0,059	93,1	68,0	91,7	<0,001
SOFA pontszám	0,698 (0,546 - 0,850)	0,077	89,7	56,0	9,5	<0,05
Szeptikus betegek elkülönítése noninvazív oxigén terápia (n=17) és gépi lélegeztetési (n=48) igény alapján						
PSEP (pg/ml)	0,701 (0,570 - 0,832)	0,067	66,7	70,6	982,5	<0,05
PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,814 (0,699 - 0,929)	0,059	72,9	70,6	68,8	<0,001
SOFA pontszám	0,763 (0,612 - 0,914)	0,077	70,8	76,5	9,5	<0,01
Szeptikus betegek differenciálása rövidebb (≤5 nap) (n=17) és hosszabb (>5 nap) (n=31) időtartamú gépi lélegeztetési igény alapján						
PSEP (pg/ml)	0,778 (0,635 - 0,921)	0,073	83,9	64,7	884,5	<0,01
PSEP:GSN arány (ng/mg)	0,793 (0,655 - 0,931)	0,071	83,9	70,6	94,2	<0,01
SOFA pontszám	0,712 (0,529 - 0,895)	0,093	87,1	58,8	9,5	<0,05

A sepszis indukálta hemodinamikai és légzési elégtelen betegek első napi labor- és klinikai paramétereinek összehasonlítása ROC analízis használatával történt. Az AUC (95% konfidencia intervallum alsó és felső tartománya) értékeket, a standard hibát, a szenzitivitást (%), a specificitást (%), az optimális cut-off értéket, valamint a szignifikancia szinteket tüntettük fel.

Korrelációk

A második vizsgálatunk során végzett korrelációs vizsgálatokban is mindhárom mintagyűjtési pont laborértékeit felhasználtuk. A PSEP:GSN arány erős összefüggést ($p < 0,001$) mutatott a PSEP szintekkel ($\rho = 0,924$). Ezenkívül a PSEP:GSN arány közepes korrelációt ($p < 0,001$) mutatott a

szérum paraméterek közül a karbamiddal ($\rho=0,720$), a kreatininnel ($\rho=0,611$), a hs-CRP-vel ($\rho=0,573$), a PCT-vel ($\rho=0,576$) és a fehérvérsejtszámmal ($\rho=0,452$), valamint a klinikai pontszámok közül az APACHE II ($\rho=0,759$), a SAPS II ($\rho=0,743$) és a SOFA ($\rho=0,741$) score-ral. Ezzel szemben a PSEP:GSN arány negatív korrelációt ($p<0,001$) mutatott a szérum összfehérjével ($\rho=-0,439$), az albuminnal ($\rho=-0,667$) és a GSN-nel ($\rho=-0,853$). Egyebekben nem észleltünk szignifikáns összefüggést a PSEP:GSN arány és a többi vizsgált paraméter között.

V. Megbeszélés

V.1. Vizelet aktin szepszis-indukálta vesekárosodásban

A szepszis korai diagnózisa és a következményes hatékony terápiás intervenció elengedhetetlen az optimális gyógyulás érdekében. A jelenleg széleskörben elterjedt szepszis (szérum PCT, hs-CRP) és szepszis-indukálta AKI (se-kreatinin, óradiurézis) biomarkerek ugyan fontos információval szolgálnak a klinikai döntéshozatal és a szepszis monitorozását illetően, viszont előbbiek limitációi miatt a jelenleg érvényes Szepszis-3 definíciók alapján a szepszis diagnózisát már az egyes szervi diszfunkciók meglétére alapozzák. Emiatt a szepszis és a szepszis-indukálta AKI meghatározásánál ma is használt biomarkerek mellett új, szenzitívebb és specifikusabb vérben és vizeletben detektálható molekulák monitorozása fontos lehet a betegek gyógyulási esélyeinek javításában [13, 14, 62].

Irodalmi adatok alapján már több mint 200 potenciális szepszis biomarkert vizsgáltak, de egyelőre nem találtak olyan molekulát, amely minden idealizált kritériumnak megfelelné. Szepszisben gyakran jelentős proteinuria figyelhető meg, így az utóbbi években egyre több kutatás foglalkozott ezen jelenség vizsgálatával különböző gyulladásos állapotokban. A szepszis mellett a szepszis-indukálta AKI biomarkereinek kutatása is egy intenzíven kutatott terület, így már számos ismert, a vizeletben is mérhető molekula használatos az AKI korai felismerésére, mint például a TIMP-2xIGFBP-7, az NGAL, a KIM-1, illetve a CysC [60, 63, 64].

Az aktin scavenger rendszer fehérjéit illetően már számos klinikai tanulmányban észleltek csökkenő GSN szinteket súlyos gyulladással járó állapotokban (pl. akut májelégtelenség, trauma, miokardiális infarktus, szepszis) [100, 102, 103]. A csökkenő scavenger fehérje koncentrációkon kívül több vizsgálatban emelkedő se-aktin szinteket találtak, amit korábban egy intézetünkben végzett kutatás keretében is igazoltak szeptikus betegeknél [106].

Első tanulmányunkban a vizeletet választottuk vizsgálati anyagnak, mert könnyen, gyorsan és noninvazív módon hozzáférhető. Mivel az aktin egy ubikviter fehérje, így kiterjedt sejtkárosodás esetén a scavenger rendszer kimerülése miatt a se-aktin koncentráció emelkedése várható, azonban az u-aktin szintekről egyelőre alig rendelkezünk információval. Legjobb tudomásunk szerint eddig mindössze egy 2003-ban folytatott kutatás során vizsgálták az aktin szinteket vesetranszplantált betegek vizeletében. Kwon és mtsai. a vizsgálatba kontroll egyének mellett cadaverből és élő

donortól származó vese transzplantáción átesett betegeket vizsgáltak. Az u-aktin szinteket hozzánk hasonlóan Western blot technikával határozták meg, értékeiket vizelet kreatininre vonatkoztatva adták meg. A kontroll egyének vizeletében nem detektáltak aktint, viszont a vesetranszplantáltak esetében – különösen az akut veseelégtelen betegeknél – jelentős emelkedést találtak. Az u-aktin megjelenésének hátterében a vese iszkémiás, illetve hipoxiás károsodását feltételezték [107].

Vizsgálataink egyik legfontosabb célja egy érzékeny és specifikus módszer kidolgozása volt az u-aktin szintek meghatározására. Az irodalmi adatokban található kutatási eredményeknek megfelelően a se-aktin szintek emelkedő tendenciát mutattak a szeptikus betegekben a kontroll egyénekhez képest [101, 106]. A korábban Kwon és mtsai. által végzett kutatással ellentétben viszont mi a kontroll egyének vizeletében is (alacsony koncentrációban) ki tudtunk mutatni az aktint [107]. Emellett a kontroll egyénekhez képest a szeptikus betegekben jelentősen megemelkedett u-aktin szinteket találtunk, míg ezen növekedő tendencia még kifejezettebb volt a szepszis-indukálta AKI betegekben, kiváltképp a vesepótló kezelésre szoruló betegek esetében.

Az általunk vizsgált szeptikus betegeknél a 30-napos mortalitási adatok alapján nem észleltünk különbséget az u-aktin szintekben a túlélők és nem túlélők között a követés során. Emellett nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést az u-aktin szintek és a gyulladós paraméterek (hs-CRP, PCT), valamint a klinikai prognosztikai pontszámok (APACHE II, SAPS II, SOFA) között, így ezek alapján feltételezhetjük, hogy az u-aktin kevésbé alkalmas a szepszis, illetve a szepszis-indukálta AKI mortalitás becslésére. A magas halálozási arány a bevont betegek súlyos szeptikus állapotával és a következményes gyakori többszervi elégtelenség kifejlődésével indokolható.

Vizsgálatunk során spontán vizeletmintákat elemeztünk, így az irodalmi ajánlásoknak megfelelően az u-aktin szinteket vizelet-kreatininre vonatkoztatva is megadtuk. A natív ng/ml-es koncentráció értékekkel egybevágóan a $\mu\text{g}/\text{mmol}$ -ban kifejezett adatok is ugyanúgy erős összefüggést mutattak a szepszis-indukálta AKI súlyosságával. A vizeletben detektált biomarkerek esetében általános gyakorlat a kapott értékek vizelet kreatininre vonatkoztatása, ugyanakkor ezen gyakorlatot vitató közlemények alapján a natív biomarker koncentrációk használatát preferáljuk, ugyanis a vizelet kreatinin szint erősen függ a glomeruláris és tubuláris funkciótól, amely az akut vesekárosodás során szintén gyakran érintett. Ennek megfelelően Conti és mtsai. a vizelet CysC mérése kapcsán megfigyelték, hogy a vizelet CysC koncentrációk jól korreláltak a vesekárosodás mértékével,

azonban vizelet kreatininre vonatkoztatva diszkrepanciát tapasztaltak a natív koncentrációkhoz és a súlyosságához képest. Így végül arra a következtetésre jutottak, hogy vesekárosodás esetén a mért értékek vizelet kreatininre vonatkoztatása félrevezető lehet [143-146].

Elemzéseink során a vizeletben megjelenő emelkedett aktin szintek eredetére is kerestük a választ. Az u-aktin szintek közepes erősségű összefüggést mutattak a vese glomeruláris érintettségét jelző paraméterekkel (se-kreatinin, vizelet összfehérje, albumin), ezáltal feltételezhető, hogy a szepszisben gyakori kiterjedt szöveti károsodás miatt nagy mennyiségben felszabaduló aktin a kimerülő scavenger kapacitások révén szabad formában is filtrálódhat a glomerulusokban. Ezen hipotézissel szemben viszont az u-aktin szintek csak gyenge korrelációt mutattak a se-aktin szintekkel, továbbá a vizelet CysC koncentrációkkal mutatott közepes összefüggés felveti a tubuláris károsodás miatti u-aktin emelkedést. A szérum CK és myoglobulin értékekkel nem találtunk szignifikáns korrelációt sem a se-aktin, sem az u-aktin esetében, ezért feltételeztük, hogy a megfigyelt u-aktin szintek emelkedése nem egy kiterjedt izomszöveti károsodás következménye.

Fiziológiás körülmények között az aktin főként a GSN-nel vagy Gc-globulinnal komplexet képezve van jelen a keringésben, ezáltal megjelenése a vizeletben valószínűtlen. Ezzel szemben súlyos szepszis, illetve szepszis-indukálta vesekárosodás esetén az u-aktin szintek mind glomeruláris, mind tubuláris eredetű vesekárosodás miatt megemelkedhetnek. Mint ahogy pl. az NGAL vagy a KIM-1 is szöveti (főként tubuláris) károsodást jelző AKI biomarkerek, így az u-aktin is ebbe a kategóriába sorolható. Azt feltételezzük, hogy az u-aktin – a többi szöveti károsodást jelző AKI markerrel együtt – pontosabb információt nyújthat a szepszis-indukálta AKI mértékéről, mint a jelenleg használt se-kreatinin [60, 63, 64].

Ugyan a különféle RRT metodikák – kiváltképp a CRRT – igencsak hatékony eszközök a súlyos szepszis-indukálta AKI kezelésében, viszont egyelőre nincs konszenzus ezen módszerek preventív jellegű korai AKI-ban történő bevezetését illetően [40, 147, 148]. Mivel az aktin extracellulárisan vagy a scavenger fehérjékhez kötődik, vagy elkezd filamentumokat képezni, így a keringésből vélhetően nem lehet RRT módszerekkel eltávolítani. Mindemellett az u-aktin szintek emelkedése értékes információval szolgálhat a súlyos szepszis-indukálta AKI során gyakran szükségessé váló RRT technikák optimális bevezetési idejét illetően.

V.2. Presepsin:gelsolin arány szepszissel társult szervi elégtelenségekben

A napjainkban is használatos Szepszis-3 definíciók a szepsziszhez társuló szervi elégtelenségek meglétére, valamint a kórfolyamatot kiváltó infekció kimutatására alapozzák a diagnózist. Az egyes szervi diszfunkciók megítélésére a széleskörben elterjedt SOFA score-t alkalmazzák, amely könnyen értelmezhető és objektív tájékoztatást ad a beteg állapotának súlyosságával kapcsolatban. Ugyanakkor a szepszis heterogenitása miatt ezen pontrendszernek is lehetnek korlátozó tényezői, így a szepszis és a szepszis-indukálta szervi elégtelenségek adekvát meghatározásában az új, ígéretes szepszis biomarkerek monitorozása is fontos kiegészítő információt nyújthat [13, 14, 44].

A második vizsgálatunkba beválasztott nem szeptikus betegek között is volt olyan, akinél a PSEP és a PCT szinteket, valamint a SOFA értéket mérsékelten emelkedettnek találtuk. Az irodalomból jól ismert, hogy ez a jelenség szisztémás gyulladákos kórképekben vagy nagy műtéti beavatkozást követően fennállhat infekció hiányában [54, 116].

A szeptikus kórfolyamat előrehaladtával a konvencionális gyulladákos markerek (hs-CRP, PCT) gyakran emelkedő tendenciát mutatnak, a protektív funkciót betöltő scavenger proteinek (albumin, GSN) szérum szintjei pedig inkább csökkennek, így azt feltételeztük, hogy a PSEP és a GSN egyidejű mérése, majd az így kapott hányados – a PSEP:GSN arány – hatékony lehet a szepsziszhez társuló szervi elégtelenségek diagnosztikájában és prognosztikájában [131, 133, 134].

Második tanulmányunk egyik legfontosabb célja volt a PSEP:GSN arány vizsgálata egészséges kontroll egyénekben, valamint intenzív osztályon kezelt nem szeptikus és szeptikus betegekben. Az egészséges kontroll egyénekhez képest jelentősen emelkedett PSEP:GSN arányokat találtunk a nem szeptikus és szeptikus betegekben, továbbá a PSEP:GSN arányok hasonlóan hatékonyak bizonyultak az intenzív osztályos nem szeptikus és szeptikus betegek differenciálásában, mint a SOFA vagy a PCT.

Ezenkívül a szeptikus betegcsoportban a szepszis-indukálta AKI betegeknél még kifejezettebb növekedést észleltünk a PSEP:GSN arányokban, különösen a vesepótló kezelésre szoruló betegeknél. Ezzel szemben a szepszis-indukálta AKI és a vesekárosodás nélküli szeptikus betegek elkülönítésében a se-kreatinin szint effektívebbnek mutatkozott, mint a PSEP:GSN arány és a PSEP. Ennek ellenére úgy gondoljuk, hogy a PSEP:GSN arány átfogóbb információval szolgál a szepszis-indukálta szervkárosodás, így az AKI tekintetében is, míg a se-kreatinin főként a

glomeruláris érintettség egyik funkcionális markere. Ennek megfelelően további vizsgálatok tisztázhatják a PSEP:GSN arány hasznosságát szepszis-indukálta AKI-ban.

A szepszis-indukálta AKI súlyosságával arányosan növekedő PSEP:GSN arányok a natív PSEP szintek esetében is hasonló tendenciát mutattak, amelyet már más kutatócsoportok is megfigyeltek szepszis-indukálta AKI-ban, illetve krónikus veseelégtelenségben [122, 125, 126]. Számos kisméretű gyulladási markerhez (pl. IL-6, PCT) hasonlóan a PSEP sem kötődik fehérjéhez a keringésben, így különféle RRT technikákkal eltávolítható a vérből, amely a molekula prognosztikus hatékonyságát is negatívan befolyásolhatja. Eredményeink alapján mi is kissé csökkenő tendenciájú PSEP szinteket találtunk a vesepótló kezelést igénylő szepszis-indukálta AKI betegekben [122, 124, 127].

A szepszis-indukálta hemodinamikai elégtelenség tekintetében az emelkedő PSEP:GSN arányok szoros összefüggést mutattak a betegek vazopresszor igényének mértékével és időtartamával egyaránt. A PSEP:GSN arányok számottevő növekedést mutattak a szeptikus sokkban szenvedő betegekben a sokk nélküli szeptikus betegekhez képest. Emellett az első napi PSEP:GSN arány a SOFA score-hoz képest jobban teljesített a szeptikus betegek elkülönítésében a szeptikus sokk kialakulása, valamint az elhúzódó vazopresszor igény esetében.

A szepszis-indukálta légzési elégtelenséget illetően a noninvazív oxigén terápiát igénylő szeptikus betegekhez képest szignifikánsan magasabb PSEP:GSN arányokat detektáltunk a gépi lélegeztetett betegeknél, továbbá ezen emelkedés még kifejezettebb volt az utóbbi csoport azon betegeinél, akiknél (legalább) közép súlyos ARDS is kialakult. A tartós (5 napnál hosszabb) gépi lélegeztetési igényű szeptikus betegeknél szintén jelentős növekedést észleltünk a PSEP:GSN arányokban. Ezenkívül az első napi PSEP:GSN arány szintén hatékonyabbnak bizonyult a SOFA score-hoz képest a szeptikus betegek differenciálásában a gépi lélegeztetés szükségessége, valamint a tartós gépi lélegeztetési igény tekintetében. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a PSEP:GSN arány a rutinszerűen használt SOFA score mellett értékes kiegészítő információval szolgálhat a szepszishez társuló hemodinamikai és légzési elégtelenség diagnózisában és prognózisában.

Vizsgálataink során a PSEP:GSN arány közepes erősségű korrelációt mutatott a konvencionális szepszis biomarkerekkel (hs-CRP, PCT). Emellett a szeptikus betegek 10-napos mortalitási adatai alapján a túlélő betegekhez képest számottevően emelkedett PSEP:GSN arányokat találtunk a nem túlélő betegeknél, továbbá a PSEP:GSN arány hasonlóan hatékonyan bizonyult a klinikai

prognosztikus pontszámokhoz (APACHE II, SAPS II, SOFA) képest a túlélő és nem túlélő betegek elkülönítésében. Jelen tanulmányunkban a natív PSEP szintek nem voltak statisztikailag szignifikánsak a szeptikus betegek mortalitás becslésében, így ez némileg ellentmond a PSEP irodalomban közölt kedvezőbb prognosztikus teljesítményének tükrében [113, 114, 117, 120].

Az albumin fiziológias körülmények között számos esszenciális feladatot lát el a keringésben (pl. onkotikus nyomás fenntartása, pufferelés, transzport funkció, antioxidáns kapacitás), ezért súlyos katabolikus állapotokban gyakran csökkent szérumban albumin koncentrációk láthatók. Ennek megfelelően számos gyulladási állapotban (pl. iszkémiás szívbetegség, pankreatitisz, szepszis, tumoros megbetegedés) észleltek – a többnyire ellentétesen változó hs-CRP és albumin szintekből kalkulált – emelkedett CRP:albumin arányt [128-132]. Ezenkívül a CRP:albumin arány változásának mintájára több friss kutatás a PCT, valamint a PSEP és albumin szinteket elemezve emelkedett PCT:albumin és PSEP:albumin arányt mértek szeptikus betegeknél [133, 134]. A GSN is – mint aktin scavenger protein – a szervezet fiziológias működésében fontos szerepet tölt be, így már számos klinikai tanulmányban észleltek csökkenő szérumban GSN szinteket kiterjedt gyulladással járó állapotokban (pl. trauma, akut májelégtelenség, miokardiális infarktus, szepszis) [100, 102, 103]. Emellett az intézetünkben korábban folytatott vizsgálat során szintén csökkenő GSN koncentrációk mellett növekvő se-aktin szinteket detektáltak szeptikus betegeknél, ráadásul a markánsan csökkenő GSN szintek hatékonyan mutatkoztak az intenzív osztályos mortalitás prognosztikájában [106]. Ennek megfelelően mi is jelentősen emelkedett gyulladási marker koncentrációkat (hs-CRP, PCT, PSEP), valamint csökkent GSN szinteket találtunk szeptikus és szepszissel társult szervi elégtelen betegekben.

V.3. Vizsgálataink korlátai

A kutatásaink során észlelt eredményeink értékelését, valamint az így levonható következtetéseket számos tényező befolyásolhatja. Legjobb tudomásunk szerint sem az u-aktint, sem a PSEP:GSN arányt nem vizsgálták még szepszisben és szepszissel társuló szervelegetelenségekben, ezért elsőként egy-egy alacsonyabb esetszámú előtanulmány keretében elemeztük az említett biomarker szintek változását.

Kutatásaink monocentrikus jellege miatt korlátozott lehetőségeink adódtak a szeptikus betegek bevonására, ezért a vizsgált betegcsoportok eltértek az életkor, a nem, valamint bizonyos alapbetegségek tekintetében. Intézetünk egy regionális centrumként működik a kritikus állapotú

beteg ellátása szempontjából, ezért feltételezhető, hogy súlyos állapotú szepszises betegek gyakrabban kerültek felvételre. Az egyes betegcsoportok létszámbeli különbségei is befolyásolhatták mérési eredményeinket, bár az alkalmazott nem parametrikus statisztikai tesztek segítségével ezen torzítási tényező ellenére is megfelelően szignifikáns eredményeket kaptunk. A szepszises betegek főként ügyleti időben kerültek felvételre, ezért az osztályos felvétel és a másnap reggeli első mintavételi időpont között (1-12 órán belül) eltelt időszakban különbségek adódhattak.

Ezenkívül az intenzív osztályon kezelt szepszises betegek és a kontrollvizsgálatra érkező járóbetegek összehasonlítása az eltérő körülmények miatt szintén korlátozó tényező, ugyanakkor szeretnénk volna egy kisebb „referencia tartományt” meghatározni olyan betegekénél, akiknél nem állt fenn akut gyulladásos állapot mind az u-aktin, mind a PSEP:GSN arány tekintetében.

A vizsgálataink során szepsziszben észlelt emelkedett u-aktin szintek, illetve PSEP:GSN arány patomechanizmusának tisztázásához a jövőben további vizsgálatok szükségesek (esetszám növelése, a mintavételi időtartam bővítése (minimum 5-7 napra), egyéb betegcsoportok bevonása (pl. krónikus veseelégtelenség, pankreatitisz)).

Mivel az u-aktin szintek meghatározására jelenleg nem áll rendelkezésre a kereskedelmi forgalomban elérhető rutin diagnosztikai módszer, ezért egy megfelelően érzékeny erősített kemilumineszcencián alapuló Western blot technikát dolgoztunk ki erre a célra. A Western blot metodika legnagyobb hátránya, hogy meglehetősen idő- és munkaigényes módszer, ezért jelen formájában az u-aktin szintek rutin klinikai használata problematikus. Emiatt a jövőben egy gyorsabb rutin diagnosztikai módszer (pl. ELISA, POCT) kifejlesztése szükséges, mely által az u-aktin mérése szepszisz-indukálta vesekárosodásban jól hasznosulhat.

Jelenleg a PSEP szintek egy már kereskedelmi forgalomban elérhető POCT módszerrel meghatározhatók, emellett a szérumban GSN szintek is egy intézetünkben kifejlesztett automatizált mérési technikával detektálhatók, azonban a GSN mérések széleskörű kórházi elérhetősége egyelőre korlátozott, így a jövőben szintén egy specifikusan kifejlesztett POCT módszerrel a PSEP:GSN arány is rutinszerűen meghatározhatóvá válna, ezáltal segítheti a hatékony klinikai döntéshozatalt.

VI. Összefoglalás

Első kutatásunk során elemeztük az u-aktin szinteket szepszisben és szepszis-indukálta AKI-ban. Eredményeink fontos kiegészítő információval szolgálhatnak a szepszis-indukálta AKI során kifejlődő vesekárosodás pontosabb megítélésével kapcsolatban.

Az elvégzett vizsgálataink eredményeit összefoglalva:

- Kidolgoztunk egy megfelelően érzékeny módszert az u-aktin szintek detektálására.
- Az egészséges kontroll egyéneknél mért minimális mennyiségű u-aktin szintekhez képest szignifikánsan magasabb értékeket találtunk szeptikus betegeknél.
- A szepszis-indukálta AKI csoportban, kiváltképp a veseótló kezelést igénylő (de nem anuriás) betegeknél még kifejezettebb u-aktin szint emelkedést észleltünk.
- Korrelációs vizsgálataink során az u-aktin szintek közepes erősségű összefüggést mutattak mind a glomeruláris (se-kreatinin, u-összfehérje, u-albumin), mind a tubuláris (u-CysC) károsodást jelző biomarkerekkel, így feltételezzük, hogy az u-aktin átfogóbb információs értékkel rendelkezik az AKI során kialakuló szöveti károsodás kiterjedését illetően, mint a jelenleg széleskörben elterjedt se-kreatinin.
- Az u-aktin, mint szöveti károsodást jelző AKI biomarker a súlyos szepszis-indukálta AKI esetén gyakran szükséges veseótló kezelés korai indikációjában eredményeink alapján úgy tűnik, segítséget nyújthat.
- Az alkalmazott Western blot módszer limitációi miatt a jövőben egy rutin diagnosztikai módszer kidolgozása (pl. ELISA, POCT) jelentősen elősegítheti a klinikai döntéshozatalt.

Második kutatásunk során a PSEP:GSN arányt tanulmányoztuk szepszisben és szepsziszhez társuló szervi elégtelenségekben. Eredményeink segíthetik a szepszis diagnózist, valamint a szepszis-indukálta hemodinamikai és légzési elégtelenség súlyossági fokának és prognózisának pontosabb megítélését.

Vizsgálatunk eredményeit összegezve:

- Jelenleg a PSEP szintek egy kereskedelmi forgalomban is elérhető POCT módszerrel mérhetők, továbbá a szérumban a GSN szintek egy intézetünkben validált automatizált mérési

technikával detektálhatók, így a két biomarkerből képzett hányados – a PSEP:GSN arány – a PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézetben gyorsan meghatározható.

- Az egészséges kontroll egyénekhez képest számottevő növekedést észleltünk a PSEP:GSN arányokban az intenzív osztályon kezelt nem szeptikus és szeptikus betegeknél.
- Második tanulmányunkban is markánsan emelkedő PSEP:GSN arányokat találtunk a szepszis-indukálta AKI betegcsoportban, bár a marker diagnosztikus hatékonysága kissé elmaradt a se-kreatininhez képest.
- A PSEP:GSN arány növekedése erős összefüggést mutat a szeptikus betegek vazopresszor igényének mértékével és időtartamával, emellett a marker szeptikus sokk kialakulása esetén is jelentősen megemelkedik.
- A noninvazív oxigén terápiát igénylő szeptikus betegekhez képest szignifikánsan magasabb PSEP:GSN arányokat láttunk a gépi lélegeztetésre szoruló szeptikus betegeknél, különösen akkor, ha az utóbbi csoportban (legalább) középsúlyos ARDS is kialakult a követés során.
- Továbbá a PSEP:GSN arány az elhúzódo vazopresszor, illetve gépi lélegeztetési igény prognosztikájában is hatékonyabbnak bizonyult, mint a szervi diszfunkciók megítélésére széleskörben elterjedt SOFA pontrendszer.

Az elvégzett vizsgálatok eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az u-aktin a szepszis-indukálta AKI egy ígéretes szöveti károsodást jelző biomarkere, mely elősegítheti a szepszisben gyakran kialakuló vesekárosodás pontosabb meghatározását.

Ezenkívül a PSEP:GSN arány is hozzájárulhat a szepszis, valamint a szepszishez társuló szervi elégtelenségek hatékony diagnosztikájához és prognosztikájához. A szepszis heterogenitása miatt a kórkép felismerésében továbbra is a legfontosabb a beteg klinikai paramétereinek átfogó és korrekt értelmezése, azonban az emelkedő PSEP:GSN arányok értékes információt nyújthatnak a szepszis során a szervezetben zajló szisztémás gyulladás, valamint a szimultán kimerülő scavenger kapacitások mértékét illetően.

VII. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom páromnak és családomnak, akik doktori tanulmányaim alatt mellettem álltak és támogattak.

Szeretném megköszönni a támogatást, az áldozatos munkát és iránymutatást témavezetőimnek és egyben mentoraimnak, Dr. Mühl Diána Professzor asszonynak és Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak. Továbbá hálás köszönettel tartozom Györgyi Erzsébetnek is, aki bevezetett a vizsgálataink során alkalmazott laboratóriumi módszerek gyakorlati rejtelseibe, emellett nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a mérések elvégzéséhez. Szintén köszönettel tartozom fiatal kollégáimnak, Dr. Szirmay Baláznak és Dr. Horváth-Szalai Zoltánnak, valamint korábbi mentoromnak, Dr. Kustán Péternek, továbbá a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársának. Ugyancsak segítségemre volt Sümegei Donát TDK hallgatóm, akit szintén elismerés illet a házi TDK konferencián második, illetve a dékáni pályamunkájának kiemelt első helyezéseért. A Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, Prof. Dr. Miseta Attilának és a Szentágotthai Kutatóközpont igazgatójának, Prof. Dr. Kovács L. Gábornak is köszönettel tartozom, amiért biztosították a szükséges anyagi és műszeres háttérrel tanulmányaink kivitelezéséhez. Emellett szeretnék még köszönetet mondani az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet dolgozóinak is az együttműködésért és a vizsgált betegektől való mintavételben nyújtott segítségükért.

Végezetül hálás köszönettel tartozom a vizsgálatban résztvevő valamennyi személynek, akik hozzájárultak a jelen tudományos munka megszületéséhez.

Az értekezés a 2021 júniusában elnyert „ÁOK-PhD+1” pályázati program támogatásával készült.

VIII. Irodalomjegyzék

- [1] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine* 2003;348(16):1546-54.
- [2] Rhee C, Jones TM, Hamad Y, Pande A, Varon J, O'Brien C, et al. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. *JAMA network open* 2019;2(2):e187571.
- [3] Meyer N, Harhay MO, Small DS, Prescott HC, Bowles KH, Gaieski DF, et al. Temporal Trends in Incidence, Sepsis-Related Mortality, and Hospital-Based Acute Care After Sepsis. *Critical care medicine* 2018;46(3):354-60.
- [4] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020;395(10219):200-11.
- [5] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine* 2001;29(7):1303-10.
- [6] Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* 2011;140(5):1223-31.
- [7] Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Qu W, Georgescu C, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *Journal of critical care* 2016;31(1):58-62.
- [8] Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *Jama* 2017;318(13):1241-9.
- [9] Bogár L, Nagy G. A három országos szepszisaudit: 2005, 2010, 2015. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 2016;46(1):5-13.
- [10] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101(6):1644-55.

- [11] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine* 2003;29(4):530-8.
- [12] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care medicine* 2013;39(2):165-228.
- [13] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 2016;315(8):801-10.
- [14] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive care medicine* 2017;43(3):304-77.
- [15] Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014;5(1):4-11.
- [16] Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Jama* 2009;302(21):2323-9.
- [17] Kissoon N, Carcillo JA, Espinosa V, Argent A, Devictor D, Madden M, et al. World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 2011;12(5):494-503.
- [18] Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 2014;5(1):36-44.
- [19] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420(6917):885-91.
- [20] Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *The Journal of pathology* 2008;214(2):211-23.
- [21] Huang M, Cai S, Su J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *International journal of molecular sciences* 2019;20(21):5376.
- [22] Sygitowicz G, Sitkiewicz D. Molecular mechanisms of organ damage in sepsis: an overview. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2020;24(6):552-60.
- [23] Shubin NJ, Monaghan SF, Ayala A. Anti-inflammatory mechanisms of sepsis. *Contributions to microbiology* 2011;17:108-24.

- [24] Lebovitz EE, Burbelo PD. Commercial multiplex technologies for the microbiological diagnosis of sepsis. *Molecular diagnosis & therapy* 2013;17(4):221-31.
- [25] Chun K, Syndergaard C, Damas C, Trubey R, Mukindaraj A, Qian S, et al. Sepsis Pathogen Identification. *Journal of laboratory automation* 2015;20(5):539-61.
- [26] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine* 1985;13(10):818-29.
- [27] Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *Jama* 1993;270(24):2957-63.
- [28] Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Critical care medicine* 1998;26(11):1793-800.
- [29] Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive care medicine* 2018;44(6):925-8.
- [30] Adelman MW, Woodworth MH, Langelier C, Busch LM, Kempker JA, Kraft CS, et al. The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis. *Critical care (London, England)* 2020;24(1):278-.
- [31] Miller WD, Keskey R, Alverdy JC. Sepsis and the Microbiome: A Vicious Cycle. *The Journal of Infectious Diseases* 2020;223(Supplement_3):S264-S9.
- [32] Nebout S, Pirracchio R. Should We Monitor ScVO₂ in Critically Ill Patients? *Cardiol Res Pract* 2012;2012:370697-.
- [33] Litton E, Morgan M. The PiCCO monitor: a review. *Anaesthesia and intensive care* 2012;40(3):393-409.
- [34] Navas-Blanco JR, Vaidyanathan A, Blanco PT, Modak RK. CON: Pulmonary artery catheter use should be forgone in modern clinical practice. *Ann Card Anaesth* 2021;24(1):8-11.
- [35] Fan E, Gattinoni L, Combes A, Schmidt M, Peek G, Brodie D, et al. Venovenous extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory failure : A clinical review from an international group of experts. *Intensive care medicine* 2016;42(5):712-24.

- [36] Patroniti N, Bonatti G, Senussi T, Robba C. Mechanical ventilation and respiratory monitoring during extracorporeal membrane oxygenation for respiratory support. *Annals of translational medicine* 2018;6(19):386.
- [37] Ely EW, Margolin R, Francis J, May L, Truman B, Dittus R, et al. Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *Critical care medicine* 2001;29(7):1370-9.
- [38] Sessler CN, Gosnell MS, Grap MJ, Brophy GM, O'Neal PV, Keane KA, et al. The Richmond Agitation-Sedation Scale: validity and reliability in adult intensive care unit patients. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;166(10):1338-44.
- [39] Tsuruta R, Oda Y. A clinical perspective of sepsis-associated delirium. *Journal of Intensive Care* 2016;4(1):18.
- [40] Karkar A, Ronco C. Prescription of CRRT: a pathway to optimize therapy. *Annals of intensive care* 2020;10(1):32.
- [41] Bonavia A, Groff A, Karamchandani K, Singbartl K. Clinical Utility of Extracorporeal Cytokine Hemoadsorption Therapy: A Literature Review. *Blood Purification* 2018;46(4):337-49.
- [42] Honore PM, Hoste E, Molnár Z, Jacobs R, Joannes-Boyau O, Malbrain MLNG, et al. Cytokine removal in human septic shock: Where are we and where are we going? *Annals of intensive care* 2019;9(1):56.
- [43] Govil D, Kumar GP. Extracorporeal Therapy in Sepsis. *Indian J Crit Care Med* 2020;24(Suppl 3):S117-S21.
- [44] Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Critical care (London, England)* 2019;23(1):374-.
- [45] Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2013;50(1):23-36.
- [46] Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Critical care* 2010;14(1):R15.
- [47] Giannakopoulos K, Hoffmann U, Ansari U, Bertsch T, Borggrefe M, Akin I, et al. The Use of Biomarkers in Sepsis: A Systematic Review. *Current pharmaceutical biotechnology* 2017;18(6):499-507.

- [48] Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Critical care* 2020;24(1):287.
- [49] Póvoa P, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Mealha R, Aragão A, et al. C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive care medicine* 1998;24(10):1052-6.
- [50] Sierra R, Rello J, Bailén MA, Benítez E, Gordillo A, León C, et al. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive care medicine* 2004;30(11):2038-45.
- [51] Wang HE, Shapiro NI, Safford MM, Griffin R, Judd S, Rodgers JB, et al. High-sensitivity C-reactive protein and risk of sepsis. *PloS one* 2013;8(7):e69232.
- [52] Tan M, Lu Y, Jiang H, Zhang L. The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of cellular biochemistry* 2019;120(4):5852-9.
- [53] Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clinica Chimica Acta* 2002;323(1):17-29.
- [54] Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: A systematic review and meta-analysis. *Critical care medicine* 2006;34(7):1996-2003.
- [55] Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious diseases* 2013;13(5):426-35.
- [56] Li S, Rong H, Guo Q, Chen Y, Zhang G, Yang J. Serum procalcitonin levels distinguish Gram-negative bacterial sepsis from Gram-positive bacterial and fungal sepsis. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2016;21:39.
- [57] Donadello K, Scolletta S, Covajes C, Vincent JL. suPAR as a prognostic biomarker in sepsis. *BMC medicine* 2012;10:2.
- [58] Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology* 2018;14(10):607-25.

- [59] Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama* 2005;294(7):813-8.
- [60] Umbro I, Gentile G, Tinti F, Muiesan P, Mitterhofer AP. Recent advances in pathophysiology and biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury. *The Journal of infection* 2016;72(2):131-42.
- [61] Fani F, Regolisti G, Delsante M, Cantaluppi V, Castellano G, Gesualdo L, et al. Recent advances in the pathogenetic mechanisms of sepsis-associated acute kidney injury. *Journal of nephrology* 2018;31(3):351-9.
- [62] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements* 2012;2(1):1-138.
- [63] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive care medicine* 2017;43(6):816-28.
- [64] Oh DJ. A long journey for acute kidney injury biomarkers. *Renal failure* 2020;42(1):154-65.
- [65] Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical care* 2013;17(1):R25.
- [66] Su Y, Gong Z, Wu Y, Tian Y, Liao X. Diagnostic Value of Urine Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 for Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis. *PloS one* 2017;12(1):e0170214.
- [67] Kellum JA, Artigas A, Gunnerson KJ, Honore PM, Kampf JP, Kwan T, et al. Use of Biomarkers to Identify Acute Kidney Injury to Help Detect Sepsis in Patients With Infection. *Critical care medicine* 2021;49(4):e360-e8.
- [68] Choi JW, Fujii T. The Prevalence of Low Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Level in Systemic Inflammation and its Relationship with Proinflammatory Cytokines, Procalcitonin, Nutritional Status, and Leukocyte Profiles. *Clinical laboratory* 2019;65(6).
- [69] Wang K, Xie S, Xiao K, Yan P, He W, Xie L. Biomarkers of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *BioMed research international* 2018;2018:6937947.

- [70] Albert C, Zapf A, Haase M, Rover C, Pickering JW, Albert A, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Measured on Clinical Laboratory Platforms for the Prediction of Acute Kidney Injury and the Associated Need for Dialysis Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2020;76(6):826-41 e1.
- [71] Chen JJ, Lee TH, Lee CC, Chang CH. Using lipocalin as a prognostic biomarker in acute kidney injury. *Expert review of molecular diagnostics* 2021;21(5):455-64.
- [72] Qiu Z-L, Yan B-Q, Zhao R, Xu D-W, Shen K, Deng X-q, et al. Combination of hepcidin with neutrophil gelatinase-associated lipocalin for prediction of the development of sepsis-induced acute kidney injury. *Clinica Chimica Acta* 2021;523:38-44.
- [73] Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a Putative Epithelial Cell Adhesion Molecule Containing a Novel Immunoglobulin Domain, Is Up-regulated in Renal Cells after Injury *. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(7):4135-42.
- [74] Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *American journal of physiology Renal physiology* 2004;286(3):F552-63.
- [75] Huang Y, Don-Wauchope AC. The clinical utility of kidney injury molecule 1 in the prediction, diagnosis and prognosis of acute kidney injury: a systematic review. *Inflammation & allergy drug targets* 2011;10(4):260-71.
- [76] Shao X, Tian L, Xu W, Zhang Z, Wang C, Qi C, et al. Diagnostic Value of Urinary Kidney Injury Molecule 1 for Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis. *PloS one* 2014;9(1):e84131.
- [77] Terzi I, Papaioannou V, Papanas N, Dragoumanis C, Petala A, Theodorou V, et al. Alpha1-microglobulin as an early biomarker of sepsis-associated acute kidney injury: a prospective cohort study. *Hippokratia* 2014;18(3):262-8.
- [78] Aakjær M, Houliind MB, Trelldal C, Ankarfeldt MZ, S Jensen P, Andersen O, et al. Differences in Kidney Function Estimates Based on Creatinine and/or Cystatin C in Non-Traumatic Amputation Patients and Their Impact on Drug Prescribing. *J Clin Med* 2019;8(1):89.

- [79] Thurlow JS, Abbott KC, Linberg A, Little D, Fenderson J, Olson SW. SCr and SCysC Concentrations Before and After Traumatic Amputation in Male Soldiers: A Case-Control Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2014;63(1):167-70.
- [80] Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried LF, Seliger SL, Newman AB, et al. Cystatin C and the Risk of Death and Cardiovascular Events among Elderly Persons. *New England Journal of Medicine* 2005;352(20):2049-60.
- [81] Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, Mariat C, Froissart M, Cristol JP. Cystatin C: current position and future prospects. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2008;46(12):1664-86.
- [82] Martensson J, Martling CR, Oldner A, Bell M. Impact of sepsis on levels of plasma cystatin C in AKI and non-AKI patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012;27(2):576-81.
- [83] Ponte P, Gunning P, Blau H, Kedes L. Human actin genes are single copy for alpha-skeletal and alpha-cardiac actin but multicopy for beta- and gamma-cytoskeletal genes: 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. *Molecular and cellular biology* 1983;3(10):1783-91.
- [84] Reisler E, Egelman EH. Actin structure and function: what we still do not understand. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(50):36133-7.
- [85] Lodish H BA, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology* (4th edition). 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2000.; 2000.
- [86] Uzman A. *Molecular Cell Biology* (4th edition): Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell; Freeman & Co., New York, NY, 2000, 1084 pp., list price \$102.25, ISBN 0-7167-3136-3. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2001;29:126-8.
- [87] Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annual review of biophysics* 2011;40:169-86.
- [88] Furukawa R, Fechner M. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *International review of cytology* 1997;175:29-90.
- [89] Bugyi B, Carlier MF. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annual review of biophysics* 2010;39:449-70.

- [90] Maiti S, Bamburg JR. Actin-Capping and -Severing Proteins. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Waltham: Academic Press; 2013, p. 18-26.
- [91] Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *The New England journal of medicine* 1992;326(20):1335-41.
- [92] Sudakov NP, Klimenkov IV, Byvaltsev VA, Nikiforov SB, Konstantinov YM. Extracellular Actin in Health and Disease. *Biochemistry Biokhimiia* 2017;82(1):1-12.
- [93] Bucki R, Levental I, Kulakowska A, Janmey PA. Plasma gelsolin: function, prognostic value, and potential therapeutic use. *Current protein & peptide science* 2008;9(6):541-51.
- [94] Krebs J. Calcium | Calcium-Binding Proteins: Cytosolic (Annexins, Gelsolins, and C2-Domain Proteins)☆. In: Jez J, editor *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*. Oxford: Elsevier; 2021, p. 621-9.
- [95] Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clinical chemistry* 2006;52(7):1247-53.
- [96] Mozzi A, Forni D, Cagliani R, Pozzoli U, Vertemara J, Bresolin N, et al. Albuminoid genes: evolving at the interface of dispensability and selection. *Genome Biol Evol* 2014;6(11):2983-97.
- [97] Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2015;29(5):773-86.
- [98] Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Frontiers in Endocrinology* 2020;10(910).
- [99] Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(4):1381-5.
- [100] Lee PS, Patel SR, Christiani DC, Bajwa E, Stossel TP, Waxman AB. Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PloS one* 2008;3(11):e3712.
- [101] Belsky JB, Morris DC, Bouchebl R, Filbin MR, Bobbitt KR, Jaehne AK, et al. Plasma levels of F-actin and F:G-actin ratio as potential new biomarkers in patients with septic shock. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 2016;21(2):180-5.

- [102] Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock* 1999;12(2):102-4.
- [103] Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Critical care medicine* 1997;25(4):594-8.
- [104] Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Wians F, Lee WM, Balko J, et al. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. *Critical care medicine* 2003;31(1):152-6.
- [105] Schiødt FV, Bangert K, Shakil AO, McCashland T, Murray N, Hay JE, et al. Predictive value of actin-free Gc-globulin in acute liver failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2007;13(9):1324-9.
- [106] Horvath-Szalai Z, Kustan P, Muhl D, Ludany A, Bugyi B, Koszegi T. Antagonistic sepsis markers: Serum gelsolin and actin/gelsolin ratio. *Clinical biochemistry* 2017;50(3):127-33.
- [107] Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2003;41(5):1074-87.
- [108] Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2005;11(5):234-8.
- [109] Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Takahashi T, Furusako S. Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2011;49(5):937-9.
- [110] Nakamura M, Takeuchi T, Naito K, Shirakawa K, Hosaka Y, Yamasaki F, et al. Early elevation of plasma soluble CD14 subtype, a novel biomarker for sepsis, in a rabbit cecal ligation and puncture model. *Critical care* 2008;12(2):P194.
- [111] Gilbert DN. Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. *Journal of clinical microbiology* 2010;48(7):2325-9.

- [112] Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Nakamura M, Takeuchi T, Hosaka Y, et al. The new sepsis marker, sCD14-ST, induction mechanism in the rabbit sepsis models. *Critical care* 2010;14(2):P19.
- [113] Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2012;18(6):891-7.
- [114] Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2011;17(6):764-9.
- [115] Masson S, Caironi P, Fanizza C, Thomae R, Bernasconi R, Noto A, et al. Circulating presepsin (soluble CD14 subtype) as a marker of host response in patients with severe sepsis or septic shock: data from the multicenter, randomized ALBIOS trial. *Intensive care medicine* 2015;41(1):12-20.
- [116] Kondo Y, Umemura Y, Hayashida K, Hara Y, Aihara M, Yamakawa K. Diagnostic value of procalcitonin and presepsin for sepsis in critically ill adult patients: a systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care* 2019;7:22.
- [117] Ulla M, Pizzolato E, Lucchiari M, Loiacono M, Soardo F, Forno D, et al. Diagnostic and prognostic value of presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study. *Critical care* 2013;17(4):R168.
- [118] Zhang X, Liu D, Liu Y-N, Wang R, Xie L-X. The accuracy of presepsin (sCD14-ST) for the diagnosis of sepsis in adults: a meta-analysis. *Critical care* 2015;19(1):323.
- [119] Wu CC, Lan HM, Han ST, Chaou CH, Yeh CF, Liu SH, et al. Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis. *Annals of intensive care* 2017;7(1):91.
- [120] Velissaris D, Zareifopoulos N, Karamouzou V, Karanikolas E, Pierrakos C, Koniari I, et al. Presepsin as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Sepsis. *Cureus* 2021;13(5):e15019.

- [121] Nakamura Y, Ishikura H, Nishida T, Kawano Y, Yuge R, Ichiki R, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in patients with or without acute kidney injury. *BMC Anesthesiology* 2014;14(1):88.
- [122] Nagata T, Yasuda Y, Ando M, Abe T, Katsuno T, Kato S, et al. Clinical impact of kidney function on presepsin levels. *PloS one* 2015;10(6):e0129159.
- [123] Takahashi G, Shibata S, Fukui Y, Okamura Y, Inoue Y. Diagnostic accuracy of procalcitonin and presepsin for infectious disease in patients with acute kidney injury. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2016;86(2):205-10.
- [124] Honore PM, Jacobs R, Hendrickx I, De Waele E, Van Gorp V, Spapen HD. Presepsin and sepsis-induced acute kidney injury treated with continuous renal replacement therapy: will another promising biomarker bite the dust? *Critical care* 2015;19:428.
- [125] Miyoshi M, Inoue Y, Nishioka M, Ikegame A, Nakao T, Kishi S, et al. Clinical evaluation of presepsin considering renal function. *PloS one* 2019;14(9):e0215791.
- [126] Nakamura Y, Hoshino K, Kiyomi F, Kawano Y, Mizunuma M, Tanaka J, et al. Comparison of accuracy of presepsin and procalcitonin concentrations in diagnosing sepsis in patients with and without acute kidney injury. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2019;490:200-6.
- [127] Shimoyama Y, Umegaki O, Kadono N, Minami T. Presepsin and prognostic nutritional index are predictors of septic acute kidney injury, renal replacement therapy initiation in sepsis patients, and prognosis in septic acute kidney injury patients: a pilot study. *BMC nephrology* 2021;22(1):219.
- [128] Deng TB, Zhang J, Zhou YZ, Li WM. The prognostic value of C-reactive protein to albumin ratio in patients with lung cancer. *Medicine* 2018;97(50):e13505.
- [129] Kaplan M, Ates I, Akpınar MY, Yuksel M, Kuzu UB, Kacar S, et al. Predictive value of C-reactive protein/albumin ratio in acute pancreatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2017;16(4):424-30.
- [130] Karabag Y, Cagdas M, Rencuzogullari I, Karakoyun S, Artac I, Ilis D, et al. Relationship between C-reactive protein/albumin ratio and coronary artery disease severity in patients with stable angina pectoris. *Journal of clinical laboratory analysis* 2018;32(7):e22457.

- [131] Miyamoto T, Fujitani M, Fukuyama H, Hatanaka S, Koizumi Y, Kawabata A. The C-Reactive Protein/Albumin Ratio Is Useful for Predicting Short-Term Survival in Cancer and Noncancer Patients. *Journal of palliative medicine* 2019;22(5):532-7.
- [132] Zang Y, Fan Y, Gao Z. Pretreatment C-reactive protein/albumin ratio for predicting overall survival in pancreatic cancer: A meta-analysis. *Medicine* 2020;99(23):e20595.
- [133] Chen L, Wu X, Qin H, Zhu H. The PCT to Albumin Ratio Predicts Mortality in Patients With Acute Kidney Injury Caused by Abdominal Infection-Evoked Sepsis. *Frontiers in Nutrition* 2021;8(179).
- [134] Kaplan M, Duzenli T, Tanoglu A, Cakir Guney B, Onal Tastan Y, Bicer HS. Presepsin:albumin ratio and C-reactive protein:albumin ratio as novel sepsis-based prognostic scores : A retrospective study. *Wiener klinische Wochenschrift* 2020;132(7-8):182-7.
- [135] Force* TADT. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *Jama* 2012;307(23):2526-33.
- [136] Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, Lakatos A, Christensen PH, Huber T, et al. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2018;56(8):1373-82.
- [137] Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Lakatos A, Muhl D, et al. Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochemia medica* 2016;26(3):421-30.
- [138] Szirmay B, Kustan P, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Lakatos A, Muhl D, et al. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis* 2018;10(6):377-84.
- [139] Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clinical chemistry* 1979;25(9):1531-46.
- [140] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
- [141] Okamura Y, Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2011;412(23-24):2157-61.

- [142] Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, Lakatos A, Christensen PH, Huber T, et al. Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis. *Journal of clinical laboratory analysis* 2018;32(3).
- [143] Conti M, Moutereau S, Esmilaire L, Desbene C, Lallali K, Devanlay M, et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2009;47(12):1553-6.
- [144] Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney international* 2010;78(5):486-94.
- [145] Goldstein SL. Urinary kidney injury biomarkers and urine creatinine normalization: a false premise or not? *Kidney international* 2010;78(5):433-5.
- [146] Tang KW, Toh QC, Teo BW. Normalisation of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research--when and why. *Singapore medical journal* 2015;56(1):7-10.
- [147] Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, et al. Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *The New England journal of medicine* 2016;375(2):122-33.
- [148] Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Pavenstadt H, et al. Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial. *Jama* 2016;315(20):2190-9.

IX. Publikációs lista

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Ragán D, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Szirmay B, Bugyi B, Ludány A, Miseta A, Nagy B, Mühl D. Urinary actin, as a potential marker of sepsis-related acute kidney injury: A pilot study. PloS One. 2021;16(7):e0255266. **IF: 3,240**

Ragán D, Horváth-Szalai Z, Szirmay B, Mühl D. Novel damage biomarkers of sepsis-related acute kidney injury. E-JIFCC. 2022;33(1):11-22. **IF: -----**

Ragán D, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Szirmay B, Miseta A, Woth G, Mühl D, Kőszegi T. Presepsin:gelsolin ratio, as a promising marker of sepsis-related organ dysfunction: a prospective observational study. BMC Infectious Diseases. **Elbírálás alatt**

Ragán D, Kustán P, Németh Á, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. A presepsin, mint a szepszis új, ígéretes biomarkere – előtanulmány. Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2019; 49(2):35-39.

IF: -----

Kustán P, Horváth-Szalai Z, Németh B, Török C, **Ragán D**, Kőszegi T, Mühl D: A szepszis diagnózisa napjainkban. Magyar Epidemiológia. 2015;12(1-2):59-66. **IF: -----**

Az értekezéshez kapcsolódó konferencia előadások/absztraktok/poszterek:

Ragán D, Kustán P, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Actin, as a potential urinary marker of sepsis-related acute kidney injury. Clinica Chimica Acta. 2019;493:S10. **IF: 2,615**

Ragán D, Kustán P, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Presepsin, as a novel sepsis biomarker. VIII. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia; Pécs, 2019.05.24.

Ragán D, Kustán P, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Urinary actin, as a novel marker of sepsis induced acute kidney injury. SepsEast 2018; Budapest 2018.11.15-17.

Ragán D, Kustán P, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. A presepsin, mint potenciális szepszis biomarker. MEDPécs – Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences; Pécs, 2018.10.27.

Ragán D, Kustán P, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Actin is a promising urinary marker of sepsis-induced acute kidney injury. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2018;56(9):eA151-2.

IF: 3,638

Ragán D, Kustán P, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Urinary actin, as a potential marker of sepsis induced acute kidney injury (AKI). VII. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia; Pécs, 2018.05.17.

Ragán D, Kőszegi T, Ludány A, Mühl D, Kustán P. A vizelet-aktin, mint potenciális marker szepszis indukálta veseelégtelenségben. DKK17 – Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban; Pécs, 2017.10.28.

Ragán D, Kustán P, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. A vizelet-aktin, mint potenciális marker szepszis indukálta veseelégtelenségben. XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Orvos- és Egészségtudományi Szekció; Pécs, 2017.04.18-21.

Ragán D, Kustán P, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. A vizelet-aktin, mint potenciális marker szepszis indukálta veseelégtelenségben. PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia; Pécs, 2016.04.14-15.

Ragán D, Kustán P, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. A vizelet-aktin, mint az akut vesekárosodás potenciális markere szepszisben. VIII. Nemzetközi és XIV. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia; Pécs, 2016.03.10.

Az értekezéshez nem kapcsolódó konferencia előadások/absztraktok/posztterek:

Kanizsai P, Molnár T, Papp I, **Ragán D**, Tőkés-Füzesi M. Comparison of monocyte distribution width (MDW) with different sepsis markers in emergency care. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2021;59(9):eA60.

IF: 3,694

Ragán D, Wahler I, Kőszegi T, Mühl D, Molnár T. Melatonin, as a potential anti-inflammatory mediator in sepsis. MEDPécs – Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences; Pécs, 2019.11.09.

Ragán D, Wahler I, Kőszegi T, Mühl D, Molnár T. Vizeletben detektált melatonin metabolit jelentősége szepszisben. IV. Mediterrán Intenzíves Randevú (MIRA); Pécs, 2019.09.20-21.

Kustán P, Szirmay B, Horváth-Szalai Z, **Ragán D**, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Novel urinary protein markers in sepsis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2016;54(10):eA199-200.

IF: 3,432

Kustán P, Szirmay B, Horváth-Szalai Z, **Ragán D**, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. 4th Joint EFLM-UEMS Congress; Varsó, 2016.09.21.

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények impakt faktora: 3,240

Az értekezéshez nem használt közlemények impakt faktora: 13,379

Összesített impakt faktor: 16,619

RESEARCH ARTICLE

Urinary actin, as a potential marker of sepsis-related acute kidney injury: A pilot study

Dániel Ragán^{1,2*}, Péter Kustán¹, Zoltán Horváth-Szalai^{1,3}, Balázs Szirmay¹, Beáta Bugyi⁴, Andrea Ludány¹, Attila Miseta¹, Bálint Nagy², Diána Műhl²

1 Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, **2** Department of Anesthesiology and Intensive Therapy, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, **3** János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, **4** Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

* ragandaniel@hotmail.com

Abstract

Introduction

A major complication of sepsis is the development of acute kidney injury (AKI). Recently, it was shown that intracellular actin released from damaged tissues appears in the urine of patients with multiple organ dysfunction syndrome. Our aims were to measure urinary actin (u-actin) concentrations of septic and control patients and to test if u-actin levels could predict AKI and mortality.

Methods

Blood and urine samples were collected from septic and sepsis-related AKI patients at three time points (T1-3): T1: within 24 hours after admission; T2: second day morning; T3: third day morning of follow-up. Patients with malignancies needing palliative care, end-stage renal disease or kidney transplantation were excluded. Serum and u-actin levels were determined by quantitative Western blot. Patients were categorized by the Sepsis-3 and KDIGO AKI classifications.

Results

In our study, 17 septic, 43 sepsis-induced AKI and 24 control patients were enrolled. U-actin levels were higher in septic patients compared with controls during follow-up ($p < 0.001$). At T1, the septic and sepsis-related AKI groups also showed differences ($p < 0.001$), yet this increase was not statistically significant at T2 and T3. We also detected significantly elevated u-actin concentrations in AKI-2 and AKI-3 septic patients compared with AKI-1 septic patients ($p < 0.05$) at T1 and T3, along with a significant increase in AKI-2 septic patients compared with AKI-1 septic patients at T2 ($p < 0.01$). This tendency remained the same when referring u-actin to urine creatinine. Parameters of first-day septic patient samples could discriminate AKI from non-AKI state (AUC ROC, $p < 0.001$): u-actin: 0.876; se-creatinine: 0.875. Derived cut-off value for u-actin was 2.63 $\mu\text{g/L}$ (sensitivity: 86.0%, specificity: 82.4%).

OPEN ACCESS

Citation: Ragán D, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Szirmay B, Bugyi B, Ludány A, et al. (2021) Urinary actin, as a potential marker of sepsis-related acute kidney injury: A pilot study. PLoS ONE 16(7): e0255266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266>

Editor: Martina Crivellari, Vita Salute University of Milan, ITALY

Received: May 27, 2021

Accepted: July 13, 2021

Published: July 26, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266>

Copyright: © 2021 Ragán et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: The work was financially supported by the University of Pécs, Medical School, Hungary grant (KA-2018-17) and was also supported by the EFOP 3.6.1-16-2016-00004 project (Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies) of the University of Pécs. Bálint Nagy was supported by the Thematic Excellence Program 2020—National Excellence Subprogram; Biomedical Engineering Project (“2020-4.1.1-TKP2020”) of the University of Pécs. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

U-actin may be a complementary diagnostic biomarker to se-creatinine in sepsis-related AKI while higher u-actin levels also seem to reflect the severity of AKI. Further investigations may elucidate the importance of u-actin release in sepsis-related AKI.

Introduction

Effective treatment of sepsis is still a major challenge at the intensive care unit (ICU) with a 30% mortality rate [1]. Epidemiological research indicates an increasing incidence with a decreasing mortality in recent years [2, 3]. According to the latest Sepsis-3 definitions, sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [4].

Timely diagnosis and effective supportive therapy of sepsis is essential for a favorable outcome. Serum procalcitonin (PCT) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) are still the gold standard inflammatory markers in the current sepsis guidelines [4, 5]. Besides hs-CRP and PCT, more than 200 potential (mostly serum) sepsis biomarkers have been investigated in recent years but none of them showed sufficient performance for routine clinical practice [6, 7].

Acute kidney injury (AKI) is one of the most frequent organ dysfunctions associated with sepsis or septic shock with a mortality rate up to 60% [8]. AKI refers to an abrupt (mostly reversible) decrease in kidney function resulting in the retention of numerous waste products and the dysregulation of extracellular volume. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) classification is widely used for the diagnosis of AKI based on the elevation of serum creatinine levels and the decrease in urine output [9]. However, the changes in these parameters do not reflect the extent of kidney damage, therefore more sensitive and specific laboratory biomarkers are needed for the early diagnosis and prediction of AKI. Regarding this, serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1) and cystatin-C are extensively investigated novel biomarkers [10, 11]. Recent studies and reviews indicate other novel kidney damage biomarkers investigated in other clinical conditions (e.g. during cardiac surgery or ischemia-reperfusion injury), such as liver-type fatty acid binding protein (L-FABP), interleukin 18 (IL-18), hemojuvelin (HJV) and osteopontin (OPN), while other so-called “pre-injury phase” stress biomarkers (e.g. tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) and insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7)) showed promising results in the beginning stages of moderate AKI [12–14]. However, there is still a lack of knowledge on urinary biomarkers, including a ubiquitous intracellular protein, called actin.

Actin is a globular protein (MW = 42 kDa) existing in monomeric/globular (G-actin) and in polymeric/filamentous (F-actin) forms. In acute tissue injuries the released extracellular actin is found to be highly toxic in the circulation due to its spontaneous polymerizing tendency causing unfavorable effects on the coagulation system. Gelsolin and Gc-globulin are the most important proteins of the so-called actin scavenger system which is responsible for binding and depolymerizing extracellular actin in the circulation, thus making the urinary appearance of these protein complexes unlikely [15–18]. However, an earlier study indicates that actin could be detected in the urine of kidney transplant patients with sustained AKI [19].

Therefore, we aimed to be the first to describe the time course of urinary actin (u-actin) in sepsis and sepsis-related AKI by ICU patients. We hypothesized that elevated u-actin concentrations might be useful regarding the early diagnosis of sepsis-related AKI as well as a

predictive marker of the outcome. Unfortunately, there are no commercial diagnostic kits available yet for serum and/or urinary actin quantification. Therefore, first we had to develop a sensitive and specific Western blot method for the quantitative analysis of actin levels.

Materials and methods

Study design

Patients with acutely confirmed sepsis or sepsis-related AKI were enrolled consecutively in our follow-up study conducted between January 2016 and December 2019 at the Department of Anesthesiology and Intensive Therapy (Medical School, University of Pécs, Hungary). All patients or their next-of-kin were given detailed information regarding our study protocol while written consent was also obtained from all. Exclusion criteria were patients with malignancies needing palliative care, end-stage renal disease with chronic dialysis or kidney transplantation, under 18 years of age or unobtainable consent. The study protocol was approved by the Regional Research Ethics Committee of the University of Pécs (no. 4327.316-2900/KK15/2011) in accordance with the 7th revision of the Helsinki Declarations (2013).

The diagnosis of sepsis and AKI were established using the Sepsis-3 definitions and KDIGO guidelines, respectively [4, 5, 9]. Inclusion criteria for sepsis were signs of organ dysfunction shown in increased Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score (>2 ; median: 10), elevated serum PCT levels (>2 ng/mL; median: 9.865 ng/mL) and a suspected or microbiologically confirmed infection. Patients with elevated serum creatinine levels (≥ 1.5 -fold increase from the baseline in the last 7 days or ≥ 26.5 $\mu\text{mol/L}$ increase within 48 hours) or with decreased urine output (<0.5 mL/kg/h for 6 hours) were regarded to have AKI. Management of sepsis and sepsis-related AKI followed the international guidelines of the 2016 Surviving Sepsis Campaign regarding vasopressor, respiratory, anticoagulation and hydrocortisone therapy, along with feeding, ulcer prophylaxis and sedation [5]. All patients received adequate fluid resuscitation and ex juvantibus broad spectrum antimicrobial therapy guided by the clinical presentation for 24 to 72 hours, which was later modified based on the results of microbiological investigations. Defined end points were death or withdrawal of consent during the sample collection period.

Regarding disease severity and mortality, the first-day values of Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II), Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) and SOFA scores were determined. Using 30-day mortality data, patients were divided into survivor and non-survivor groups.

Outpatients from the Department of Ophthalmology (Medical School, University of Pécs, Hungary) served as controls. Exclusion criteria for control patients were lack of consent, acute inflammation (hs-CRP >5 mg/L), infectious disease or kidney disease.

Sampling

Blood and urine samples were taken from septic patients at the ICU at three time points (T1-3): T1: within 24 hours after admission; T2: second day morning of follow-up; T3: third day morning of follow-up. Venous blood (5 mL) was taken from every septic patient from central venous catheter into plastic blood collection tubes with accelerator gel (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA), while urine (6 mL) was obtained simultaneously from the bladder catheter using plain plastic tubes (Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany). Not more than one sample (venous blood, midstream spot urine) was collected from control patients. Urine and clotted blood samples were centrifuged (10 min, 1500 g) and supernatants were treated with electrophoresis sample buffer [20] then heated at 100°C for 5 minutes. Serum and urinary actin were

determined by quantitative Western blot (see below). Native and denatured sample aliquots were stored at -70°C until analysis.

Laboratory analysis

Serum parameters including total protein (se-TP), albumin, creatine kinase (se-CK), kidney function markers (se-creatinine), platelet count (PLT), inflammatory parameters (white blood cell count (WBC), hs-CRP, PCT) and basic urinary markers (total protein (u-TP), u-albumin, urine creatinine (u-creatinine)) were determined using automated routine procedures at our accredited laboratory (Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Hungary). Urinary orosomucoid (u-ORM) and urinary cystatin-C (u-CysC) were also measured using automated immune turbidimetric assays (Cobas 8000/c502 module (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)) worked out and validated in our laboratory [21, 22].

Determination of urinary actin

Serum and urine samples were separated with a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to Laemmli [20]. Serum actin (se-actin) levels were determined by a quantitative enhanced chemiluminescence (ECL) Western blot based on the work of Lee et al. and Horváth-Szalai et al. [23–25]. This method was optimized and adapted for the determination of u-actin concentrations. A polyclonal pan-anti-actin primary antibody (1:1000 dilution; Rabbit Anti-Human Actin, N-terminal, ref.no: A2103, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and a horseradish peroxidase (HRP)-labeled secondary antibody (1:4000 dilution; Goat Anti-Rabbit IgG, Cat. #31460, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) were used. The calibration of Western blot was done by running a dilution series of a purified rabbit skeletal muscle extract of known G-actin concentration (Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Hungary). A 3-part dilution series of a serum sample from a healthy individual was applied in every gel as an internal standard which had been quantified by the mentioned rabbit skeletal muscle extract calibrator. Therefore, actin concentrations could be calculated in each serum and urine sample based on the light signals being directly proportional to the internal standard series applied in every gel.

Statistical analysis

The IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22 (IBM Corp., NY, USA) software was used for statistical analysis. Non-parametric tests were used since our data did not show normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. The control and septic patient groups were compared using Chi-square test for qualitative data and Mann-Whitney U-test for quantitative data. Friedman's ANOVA with post hoc Dunn tests were carried out to compare the data of different time points in every patient group. Diagnostic and prognostic values of serum and urinary parameters were evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves. Relationships between quantitative variables were analyzed by Spearman's rank correlation test. Qualitative data are shown as frequencies and percentages (%) while quantitative data are shown as medians and interquartile ranges (IQR). Statistical significance was set at $p < 0.05$. P values were adjusted according to Bonferroni during the analyses of multiple comparisons.

Results

Patients' demographic and laboratory data

In the present study, 24 control individuals, 17 septic patients and 43 patients with sepsis-related AKI were enrolled. Basic demographic and admission laboratory data are shown in

Table 1. Patients' demographic and admission laboratory data.

	Control (n = 24)	Sepsis (n = 17)	Sepsis + AKI (n = 43)	p value
Age (years)	54 (48–57)	73 (64–78)	64 (53–70)	<0.05 ^{a,b,c}
Males, n (%)	10 (41.7)	8 (47.1)	33 (76.7)	<0.05 ^{b,c}
Major comorbidities, n (%)				
Cardiovascular disease	11 (45.8)	15 (88.2)	30 (69.8)	<0.05 ^a
Type-2 diabetes mellitus	4 (16.7)	3 (17.6)	15 (34.9)	n.s.
Chronic kidney disease	0	3 (17.6)	5 (11.6)	<0.05 ^a
KDIGO-CKD stages, n (GFR/Albuminuria)	-	3 (G3b/A1)	1 (G2/A1); 1 (G3a/A2); 3 (G4/A2)	-
Pulmonary disease	1 (4.2)	3 (17.6)	11 (25.6)	<0.05 ^b
Immunological disease	2 (8.3)	1 (5.9)	3 (6.9)	n.s.
Malignancy	0	4 (23.5)	12 (27.9)	<0.05 ^{a,b}
Admission laboratory data				
se-TP (g/L)	71.6 (67.4–73.7)	40.9 (38.6–46.9)	46.9 (42.2–50.4)	<0.05 ^{a,b}
se-albumin (g/L)	42.7 (40.1–46.3)	21.2 (19.5–25.9)	23.1 (19.2–26.6)	<0.05 ^{a,b}
se-creatinine (μmol/L)	71 (67–76)	91 (67–121)	182 (142–328)	<0.05 ^{a,b,c}
se-CK (U/L)	40 (54–73)	198 (145–649)	305 (88–1047)	<0.05 ^{a,b}
WBC (G/L)	5.9 (4.7–6.9)	13.2 (9.8–17.5)	16.4 (9.9–20.5)	<0.05 ^{a,b}
PLT (G/L)	265 (226–301)	223 (159–265)	162 (95–301)	<0.05 ^{a,b}
hs-CRP (mg/L)	1.5 (0.6–1.8)	304.2 (188.9–372.4)	276.1 (138.6–388.7)	<0.05 ^{a,b}
PCT (ng/mL)	-	7.9 (3.1–20.6)	23.6 (6.1–59.9)	<0.05 ^c
se-actin (mg/L)	0.75 (0.6–0.9)	0.68 (0.4–1.1)	0.84 (0.5–1.2)	n.s.
u-TP (mg/L)	60 (40–90)	230 (50–425)	440 (240–1020)	<0.05 ^{a,b,c}
u-albumin (mg/L)	3.5 (2.0–12.5)	17.1 (3.4–54.4)	61.8 (26.8–169.2)	<0.05 ^{a,b,c}
u-ORM (mg/L)	1.2 (0.3–3.2)	32.6 (17.8–87.5)	72.1 (23.7–144.8)	<0.05 ^{a,b}
u-CysC (mg/L)	0.06 (0.03–0.08)	0.46 (0.1–1.1)	1.04 (0.2–3.5)	<0.05 ^{a,b}
u-actin (μg/L)	0.78 (0.3–1.9)	1.27 (0.6–2.5)	9.5 (3.2–23.7)	<0.05 ^{b,c}
u-actin/u-creatinine (μg/mmol)	0.13 (0.1–0.2)	0.6 (0.4–1.4)	2.59 (0.6–10.4)	<0.05 ^{a,b,c}
u-actin/u-TP (%)	0.17 (0.1–0.3)	0.08 (0.04–0.26)	0.21 (0.1–1.1)	<0.05 ^c

Continuous variables are shown as median (25th–75th percentiles) and categorical variables are expressed as a number (percentage). Mann-Whitney U and Chi-square tests were used for data comparison between patient groups. Level of significance is set at $p < 0.05$; n.s.: non-significant. Superscript lowercase letters refer to post-hoc analyses:

a: $p < 0.05$ between Control and Sepsis

b: $p < 0.05$ between Control and Sepsis + AKI

c: $p < 0.05$ between Sepsis and Sepsis + AKI groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266.t001>

Table 1. A moderate difference ($p < 0.05$) was found between the patient groups regarding age, gender and the majority of comorbidities. A significant difference ($p < 0.05$) was found between the control and septic patient groups in se-TP, se-albumin, se-CK, WBC, PLT, hs-CRP, u-CysC and u-ORM levels. Admission values of se-creatinine, u-TP, u-albumin, and u-actin/u-creatinine were significantly higher ($p < 0.05$) in the septic and sepsis-related AKI groups compared with the control patients. Se-PCT ($p < 0.05$), u-actin ($p < 0.05$) and u-actin/u-TP ($p < 0.05$) levels were also significantly higher between the septic and sepsis-related AKI patients.

Septic patients' clinical data

Major differences in therapeutic requirements of 60 septic patients are the following: 38 needed mechanical ventilation, 22 needed oxygen supplementation (median Horowitz

Table 2. Clinical and microbiological data of septic patients.

	Sepsis (n = 17)	Sepsis + AKI (n = 43)	p value
Age (years)	73 (64–78)	64 (53–70)	<0.05
Males, n (%)	8 (47.1)	33 (76.7)	<0.05
Cause of admission			
Internal medicine origin, n (%)	3 (17.6)	22 (51.1)	<0.05
Surgical origin, n (%)	14 (82.4)	21 (48.9)	<0.05
ICU treatment days	9 (5–17)	6 (3–15)	n.s.
30-day mortality, death (%)	8 (47.1)	28 (65.1)	n.s.
AKI requiring RRT, n (%)	-	18 (41.9)	-
Clinical prognostic scores			
APACHE II score	15 (11–17)	24 (17–27)	<0.05
SAPS II score	41 (33–46)	55 (41–64)	<0.05
SOFA score	8 (7–11)	11 (9–13)	<0.05
Organ dysfunctions, n (%)			
1	4 (23.5)	5 (11.6)	n.s.
2	4 (23.5)	7 (16.3)	n.s.
≥3	9 (53.0)	31 (72.1)	n.s.
Identified pathogens, n (%)			
Unidentified	6 (35.3)	11 (25.6)	n.s.
Gram-positive bacteria	1 (5.9)	6 (13.9)	n.s.
Gram-negative bacteria	4 (23.5)	10 (23.3)	n.s.
Fungi	1 (5.9)	4 (9.3)	n.s.
Mixed	5 (29.4)	12 (27.9)	n.s.

Continuous variables are shown as median (25th–75th percentiles) and categorical variables are expressed as a number (percentage). Mann-Whitney U and Chi-square tests were performed for data comparison between patient groups. Level of significance is set at $p < 0.05$; n.s.: non-significant. Abbreviations: RRT: renal replacement therapy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266.t002>

quotient: 221.2), 51 needed vasopressor support, 12 had liver failure, 13 had thrombocytopenia, 30 had elevated lactate levels (> 2 mmol/L) and 47 needed hydrocortisone supplementation. Ventilated patients received Propofol or Dexmedetomidine sedation during the early stage of severe respiratory failure. Regarding differences between the septic and sepsis-related AKI groups, more patients needed ICU hospitalization due to surgical interventions (e.g. esophageal or pancreatic cancer surgery, peritonitis) than internal medicine complications (e.g. pneumonia) ($p < 0.05$). No significant difference was found between the septic patient groups regarding the length of ICU stay and 30-day mortality, however, 30-day mortality was higher in the AKI-1 (8 patients, 80.0%) and AKI-2 (10 patients, 71.4%) stage septic groups compared with the AKI-3 (10 patients, 52.6%) stage septic and sepsis (8 patients, 47.1%) groups. Moreover, 41.9% of sepsis-related AKI patients required some kind of renal replacement therapy (RRT). Regarding the clinical prediction scores, sepsis-related AKI patients had considerably higher values (APACHE II: $p < 0.05$; SAPS II: $p < 0.05$; SOFA: $p < 0.05$) compared with the sepsis group while multiple organ dysfunction syndrome (MODS) was also a more common complication in the former group (69.8%) than in the latter (53.0%). The most frequent organ dysfunctions—besides AKI—in the sepsis-related AKI and sepsis patient groups were sepsis-induced hypotension (78.1% vs. 76.5%), followed by acute lung injury (48.7% vs. 52.9%), thrombocytopenia (25.6% vs. 11.8%) and acute liver failure (25.6% vs. 5.9%). Additional clinical data of septic patients are presented in [Table 2](#) and in [S1 Table](#) as well.

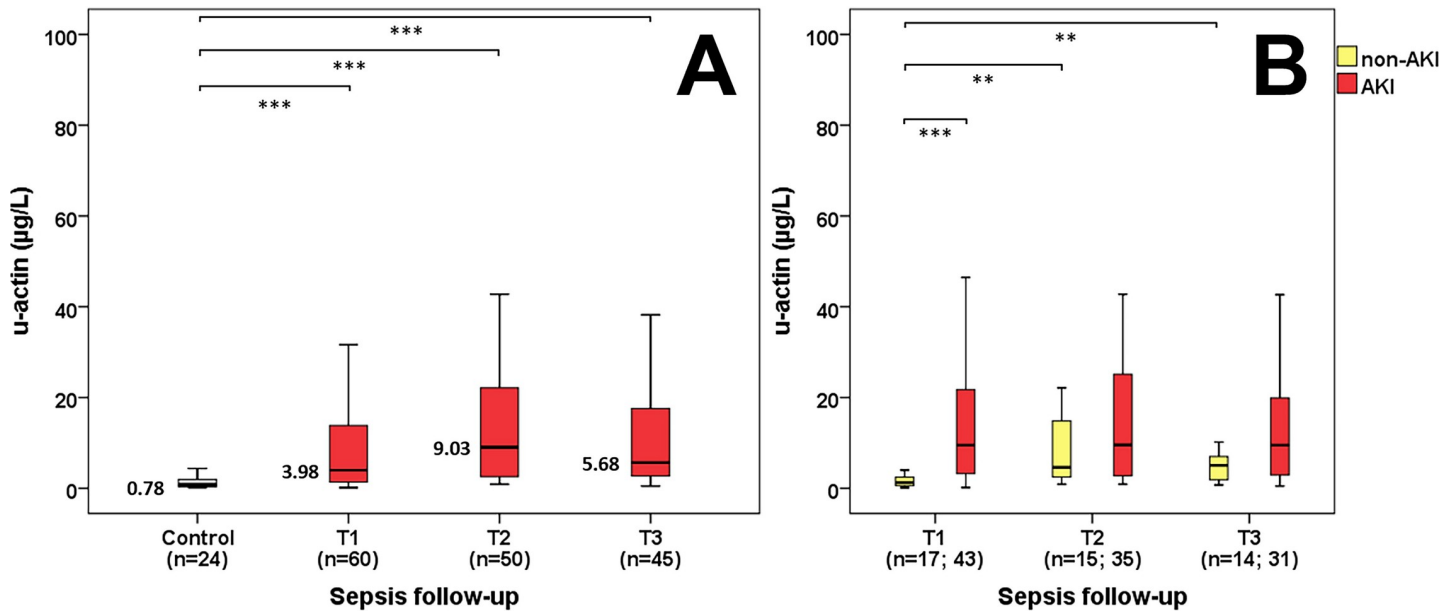


Fig 1. Urinary actin in sepsis. U-actin levels of control and septic patients (A) along with sepsis and sepsis-related AKI patients (B) during follow-up. n: sample count. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266.g001>

Serum and urinary actin levels in control, septic and sepsis-related AKI patients

No considerable difference was observed in serum actin levels between the control and septic patient groups by comparing the first (T1 median: 0.75 vs. 0.8 mg/L, $p = 0.757$), second (T2 median: 0.75 vs. 0.78 mg/L, $p = 0.584$) and third (T3 median: 0.75 vs. 0.79 mg/L, $p = 0.608$) day serum samples during follow-up. However, a significant increase in u-actin levels was discovered between the control and septic patients during the first (T1 median: 0.78 vs. 3.98 µg/L, $p < 0.001$), second (T2 median: 0.78 vs. 9.03 µg/L, $p < 0.001$) and third (T3 median: 0.78 vs. 5.68 µg/L, $p < 0.001$) day of follow-up (Fig 1A). This tendency was also explicit between the septic and sepsis-related AKI groups at the first day (T1 median: 1.27 vs. 9.52 µg/L, $p < 0.001$), but this difference was not statistically significant by the second (T2 median: 4.61 vs. 9.55 µg/L, $p = 0.368$) and third (T3 median: 5.05 vs. 9.51 µg/L, $p = 0.220$) day of follow-up (Fig 1B). Regarding the AKI stages, sepsis-related AKI patients were categorized retrospectively based on the KDIGO guidelines. We also detected significantly elevated u-actin concentrations on the first day regarding AKI-1 and AKI-2 (T1 median: 3.16 vs. 10.78 µg/L, $p < 0.01$) along with AKI-1 and AKI-3 (T1 median: 3.16 vs. 11.55 µg/L, $p < 0.01$) septic patients, while these changes were also statistically significant on the second day regarding AKI-1 and AKI-2 (T2 median: 3.22 vs. 9.68 µg/L, $p < 0.01$) septic patients and on the third day regarding AKI-1 and AKI-2 (T3 median: 3.66 vs. 13.76 µg/L, $p < 0.05$) along with AKI-1 and AKI-3 (T3 median: 3.66 vs. 12.92 µg/L, $p < 0.05$) septic patients (Fig 2A). This tendency remained the same when referring u-actin values to u-creatinine on the first day regarding AKI-1 and AKI-2 (T1 median: 0.47 vs. 3.74 µg/mmol, $p < 0.05$) along with AKI-1 and AKI-3 (T1 median: 0.47 vs. 6.16 µg/mmol, $p < 0.05$) septic patients, on the second day regarding AKI-1 and AKI-2 (T2 median: 0.87 vs. 4.53 µg/mmol, $p < 0.05$) septic patients and on the third day regarding AKI-1 and AKI-3 (T3 median: 0.84 vs. 5.37 µg/mmol, $p < 0.05$) septic patients (Fig 2B).

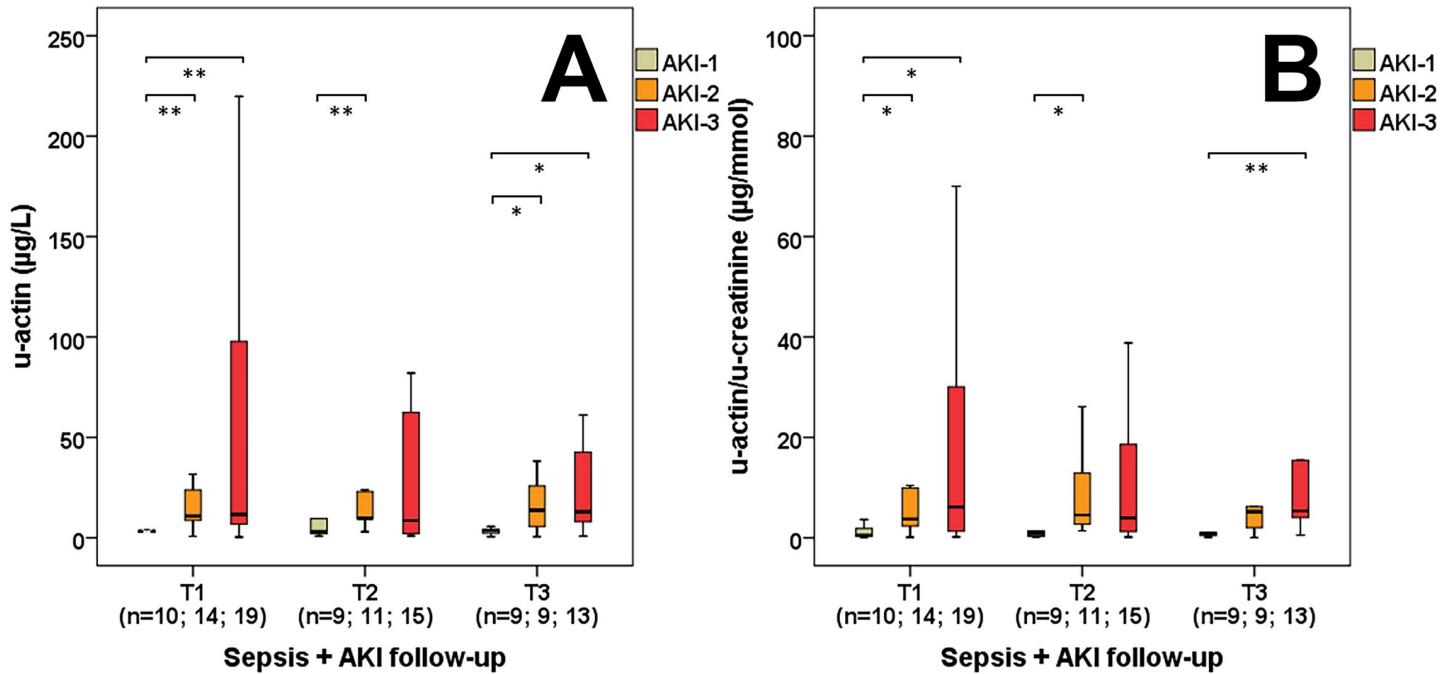


Fig 2. Urinary actin in sepsis-related AKI. U-actin (A) and u-actin/u-creatinine (B) levels of the individual sepsis-related AKI stages during follow-up. n: sample count. *p<0.05; **p<0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266.g002>

Survival data and distinctive power of urinary actin in sepsis

No significant difference was found in u-actin levels between survivors and non-survivors based on 30-day mortality data during follow-up (Fig 3A). The diagnostic performance of

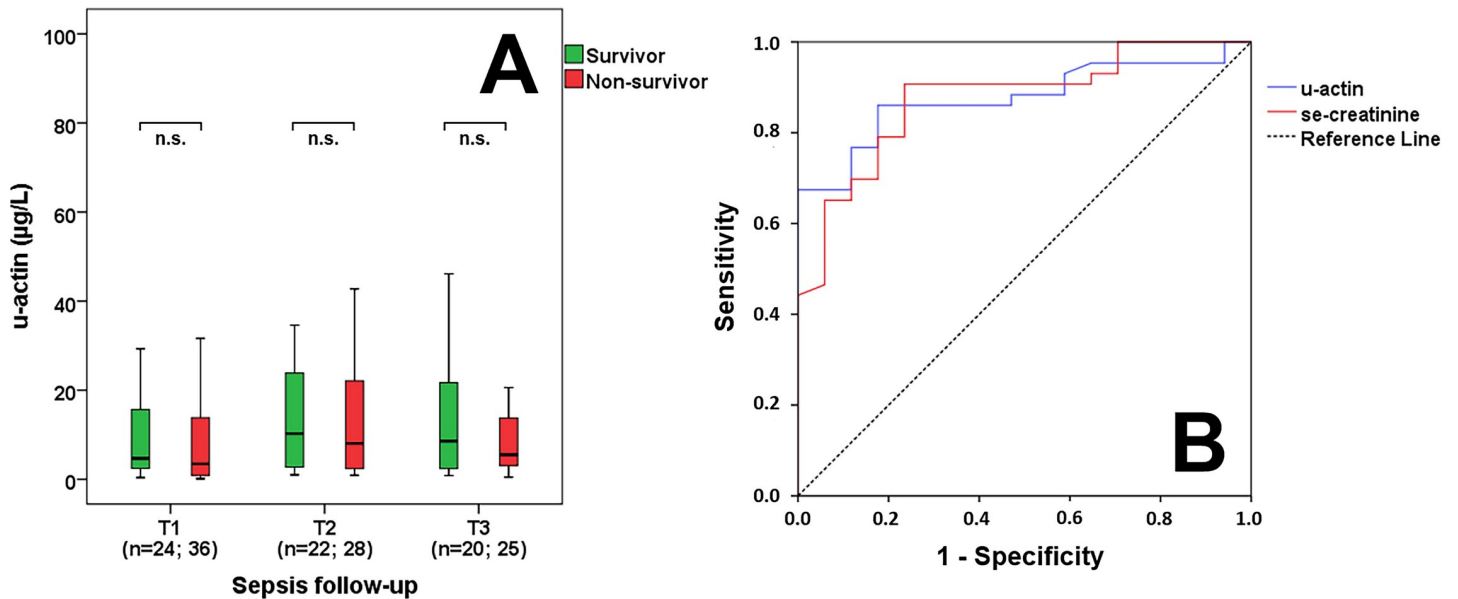


Fig 3. Survival and predictive power of urinary actin. U-actin levels in survivor and non-survivor septic patients based on 30-day mortality during follow-up (A). Receiver operating characteristic (ROC) curves of admission laboratory parameters for distinguishing sepsis from sepsis-related AKI (B). n: sample count. n.s.: non-significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255266.g003>

first-day u-actin levels in sepsis-related AKI was assessed using ROC analysis (Fig 3B). For discerning all sepsis-related AKI from septic patients without AKI, area under the curve (AUC) values were found to be the following: u-actin: 0.876 ($p < 0.001$); se-creatinine: 0.875 ($p < 0.001$); Derived cut-off values were: u-actin 2.63 $\mu\text{g/L}$ (sensitivity: 86.0%, specificity: 82.4%); se-creatinine: 111 $\mu\text{mol/L}$ (sensitivity: 90.7%, specificity: 76.5%).

Correlations

In our study, data from all sample collection time points were used for calculating correlations, while the absolute u-actin levels were presented in most cases due to their strong correlation to u-actin/u-creatinine ($\rho = 0.898$, $p < 0.001$). U-actin levels showed moderate correlation ($p < 0.001$) with u-TP ($\rho = 0.489$), u-albumin ($\rho = 0.617$), se-creatinine ($\rho = 0.371$), u-CysC ($\rho = 0.434$) and u-ORM ($\rho = 0.367$). Weak correlations ($p < 0.01$) were observed between u-actin and se-actin ($\rho = 0.272$) and WBC ($\rho = 0.223$), respectively. No further associations were found with other inflammatory or clinical parameters.

Discussion

The early diagnosis and effective therapy of sepsis and sepsis-related AKI are essential for a successful recovery. However, the currently used biomarkers (sepsis: PCT, hs-CRP; AKI: se-creatinine, urine output) show several limitations regarding the diagnosis and prognosis of sepsis and AKI, hence a multi-marker approach involving novel laboratory markers may prove to be beneficial in achieving a favorable outcome [6, 7, 10, 11].

There is a growing body of evidence indicating the importance of decreased actin scavenger protein concentrations and/or elevated se-actin levels in various clinical conditions (e.g. trauma, acute liver failure, myocardial infarction, sepsis) [26–29]. Our previous study showed that the increase of se-actin was inversely proportional to the amounts of actin scavenger proteins in the circulation which was associated with increased mortality rate [25].

Since urine is noninvasively available, it is becoming a popular source for disease biomarker studies. Several studies have already examined actin in the circulation, however, the importance of u-actin has not yet been extensively investigated [17, 24, 25, 30]. Only one study carried out by Kwon et al. investigated u-actin as a potential AKI marker. They found increased u-actin/u-creatinine ratios in patients after cadaveric kidney transplantation (u-actin/u-creatinine levels were significantly higher in patients with sustained AKI compared to patients recovering from AKI). However, the origin of this considerable u-actin release has not been clarified, the ischemic injury of renal allografts was assumed to be the main cause of AKI [19].

One of the main focuses of our study was to develop a sensitive method for detecting actin in the urine samples of septic patients. In accordance with previous findings, se-actin levels were slightly elevated in our septic patients compared with controls [25]. In contrast to the study conducted by Kwon et al., we could also detect low concentrations of u-actin in each control sample as well. This might be due to our improved actin-detecting technique. Significantly higher u-actin levels were found in the urine samples of septic patients compared with the control group, yet this increase was also explicit between the sepsis and sepsis-related AKI groups, especially in sepsis-related AKI patients needing renal replacement therapy (RRT).

During the 3-day follow-up period, no significant difference was found in u-actin levels between survivors and non-survivors. These findings suggest that u-actin may not be a suitable marker for sepsis or sepsis-related AKI mortality prediction. Moreover, no correlation was observed between u-actin and the conventional inflammatory markers (hs-CRP, PCT) or clinical scores (APACHE II, SAPS II, SOFA). Therefore, our results contradict the data available

from large multi-center clinical trials indicating better performance of currently used sepsis markers regarding mortality prediction [4, 5].

Our study has several limitations. As far as we know, before our study nobody investigated u-actin in sepsis or in sepsis-related AKI, thus we aimed to be the first to explore this promising and interesting field by conducting a small sample size pilot study to establish some baseline data. Since our study was performed as single center study (16 bedded central ICU), we had very limited capacities for consecutive patient recruitment, hence the patient groups were different regarding age and gender, while the study took a longer time period to achieve this relatively small sample size. Differences in sample size between control, septic and sepsis-related AKI groups might reduce the power of comparison, although non-parametric tests (e.g. Mann-Whitney U test) could be used well with unequal sample sizes. There was a slightly variable time interval (mostly within 12 hours) in the actual first day sample collection, as most patients were admitted at night or in the late afternoon before taking the first sample on the next morning.

In our research, the absolute u-actin levels are shown in most of our results due to their strong correlation to u-actin/u-creatinine. We are aware of the practice that novel urinary AKI biomarkers have to be normalized to u-creatinine concentrations in order to control variations in urine flow rate. However, there is a growing body of evidence challenging the importance of u-creatinine normalization in AKI since the excretion rates of u-creatinine and other novel urinary AKI biomarkers may be affected differently during an acute severe condition [31–34].

A moderate correlation with u-TP, u-albumin and se-creatinine suggest that elevated u-actin levels could be the consequence of severe glomerular injury potentially caused by sepsis-related systemic cellular damage with an excessive release of free extracellular actin. However, the increase of u-actin might not be the direct result of excessive free actin release due to a weaker correlation with se-actin and a moderate correlation with u-CysC indicating a tubular dysfunction as well during the development of AKI. Se-CK did not show significant correlations with se-actin or u-actin suggesting the cause of increased u-actin is not extensive muscle damage. Since renal ischemia is common during sepsis, it could also contribute to the development of sepsis-related AKI, as postulated by Kwon et al. [19].

As actin is bound to gelsolin or Gc-globulin in the circulation, it is unlikely to appear in the urine. However, u-actin could appear in the urine due to both severe glomerular or tubular injury, so it seems that the elevation of u-actin assumes severe kidney injury. As KIM-1 or NGAL are known examples of damage biomarkers in AKI according to recent reviews, u-actin may also be classified into this group [12, 13]. We suspect that u-actin might provide more accurate information regarding the extent of kidney injury compared with serum creatinine. Therefore, a multi-marker approach including u-actin and the measurement of various damage biomarkers (e.g. urine Cystatin C, KIM-1, NGAL, IL-18) may provide valuable information regarding the more accurate staging of sepsis-related AKI.

Since different forms of RRT—especially continuous renal replacement therapy (CRRT)—represent a better modality for the management of severe sepsis-related AKI, there is no clear evidence demonstrating the adequate time point of initiation of RRT in sepsis-related AKI [13, 35–37]. Since actin is either bound to the actin scavenger proteins in the circulation or immediately starts forming filaments during severe tissue injury, it could not be removed from the circulation by RRT, yet the increase of u-actin could yield valuable information regarding the extent of kidney damage and the need for the early initiation of RRT in sepsis-related AKI.

In the future, we should extend the sampling period to 5–7 days while increasing the number of critically ill patients, especially patients needing RRT with forming subgroups due to the heterogeneity of sepsis in order to draw more accurate conclusions. Exploring other patient groups with different kinds of kidney disease (e.g. CKD, glomerulonephritis) might provide

additional information regarding the appearance of actin in the urine. As this is the first study investigating the importance of u-actin in sepsis-related AKI, there are no commercially available diagnostic kits for serum and/or urinary actin quantification. For this reason, we developed a highly sensitive Western blot method evaluated by an ECL technique. Since Western blot is a quite expensive and time-consuming laboratory technique, its routine clinical utility is questionable, hence the development of a more rapid and efficient laboratory method (e.g. ELISA, POCT) is necessary.

Conclusions

U-actin may serve as a complementary diagnostic biomarker to se-creatinine in sepsis-related AKI while higher u-actin levels also seem to reflect the severity of AKI. As the optimal time point for the initiation of RRT in sepsis-related AKI is still controversial, u-actin might provide valuable information regarding this issue. Further investigations may elucidate the importance of increased u-actin release in sepsis-related AKI.

Supporting information

S1 Table. The anonymous dataset of 84 patients. Additional demographic, clinical and laboratory data of control, septic and sepsis-related AKI patients. (XLSX)

Acknowledgments

A preliminary version of the study has been presented as part of a mini-review [38] and as an abstract at the 59th National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine, 2018, Pécs, Hungary [39]. We express our special thanks for the invaluable help of the nurses and the colleagues from every participating institute.

Author Contributions

Conceptualization: Péter Kustán.

Data curation: Dániel Ragán, Zoltán Horváth-Szalai.

Formal analysis: Dániel Ragán.

Funding acquisition: Attila Miseta.

Investigation: Péter Kustán, Balázs Szirmay.

Methodology: Dániel Ragán, Zoltán Horváth-Szalai, Balázs Szirmay, Beáta Bugyi.

Resources: Beáta Bugyi, Attila Miseta.

Supervision: Andrea Ludány, Attila Miseta, Bálint Nagy, Diána Mühl.

Validation: Diána Mühl.

Writing – original draft: Dániel Ragán.

Writing – review & editing: Andrea Ludány, Bálint Nagy, Diána Mühl.

References

1. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007). *Chest*. 2011; 140(5):1223–31. <https://doi.org/10.1378/chest.11-0352> PMID: 21852297

2. Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Qu W, Georgescu C, et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008–2012. *Journal of critical care*. 2016; 31(1):58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.09.034> PMID: 26601855
3. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009–2014. *Jama*. 2017; 318(13):1241–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.13836> PMID: 28903154
4. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016; 315(8):801–10. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> PMID: 26903338
5. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive care medicine*. 2017; 43(3):304–77. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6> PMID: 28101605
6. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Critical care*. 2010; 14(1):R15. <https://doi.org/10.1186/cc8872> PMID: 20144219
7. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2013; 50(1):23–36. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.764490> PMID: 23480440
8. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama*. 2005; 294(7):813–8. <https://doi.org/10.1001/jama.294.7.813> PMID: 16106006
9. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements*. 2012; 2(1):1–138.
10. Endre ZH, Westhuyzen J. Early detection of acute kidney injury: emerging new biomarkers. *Nephrology*. 2008; 13(2):91–8. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00905.x> PMID: 18275495
11. Umbro I, Gentile G, Tinti F, Muiesan P, Mitterhofer AP. Recent advances in pathophysiology and biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury. *The Journal of infection*. 2016; 72(2):131–42. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.11.008> PMID: 26702738
12. Oh DJ. A long journey for acute kidney injury biomarkers. *Renal failure*. 2020; 42(1):154–65. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2020.1721300> PMID: 32050834
13. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive care medicine*. 2017; 43(6):816–28. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4755-7> PMID: 28364303
14. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical care*. 2013; 17(1):R25. <https://doi.org/10.1186/cc12503> PMID: 23388612
15. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *The New England journal of medicine*. 1992; 326(20):1335–41. <https://doi.org/10.1056/NEJM199205143262006> PMID: 1314333
16. Sudakov NP, Klimenkov IV, Byvaltsev VA, Nikiforov SB, Konstantinov YM. Extracellular Actin in Health and Disease. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017; 82(1):1–12. <https://doi.org/10.1134/S0006297917010011> PMID: 28320282
17. Belsky JB, Morris DC, Bouchebl R, Filbin MR, Bobbitt KR, Jaehne AK, et al. Plasma levels of F-actin and F:G-actin ratio as potential new biomarkers in patients with septic shock. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2016; 21(2):180–5. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1126646> PMID: 26754286
18. Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(4):1381–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1381> PMID: 2154744
19. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003; 41(5):1074–87. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(03\)00206-3](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(03)00206-3) PMID: 12722043
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0> PMID: 5432063
21. Kustan P, Szirmay B, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Lakatos A, Muhl D, et al. Urinary orosomuroid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochemia medica*. 2016; 26(3):421–30. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.044> PMID: 27812309
22. Szirmay B, Kustan P, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Lakatos A, Muhl D, et al. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis*. 2018; 10(6):377–84. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0228> PMID: 29451000

23. Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clinical chemistry*. 1979; 25(9):1531–46. PMID: [380843](#)
24. Lee PS, Patel SR, Christiani DC, Bajwa E, Stossel TP, Waxman AB. Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PloS one*. 2008; 3(11):e3712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003712> PMID: [19002257](#)
25. Horvath-Szalai Z, Kustan P, Muhl D, Ludany A, Bugyi B, Koszegi T. Antagonistic sepsis markers: Serum gelsolin and actin/gelsolin ratio. *Clinical biochemistry*. 2017; 50(3):127–33. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.10.018> PMID: [27823961](#)
26. Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Wians F, Lee WM, Balko J, et al. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. *Critical care medicine*. 2003; 31(1):152–6. <https://doi.org/10.1097/00003246-200301000-00024> PMID: [12545009](#)
27. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Critical care medicine*. 1997; 25(4):594–8. <https://doi.org/10.1097/00003246-199704000-00007> PMID: [9142022](#)
28. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clinical chemistry*. 2006; 52(7):1247–53. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.065680> PMID: [16709624](#)
29. Wu F, Dong XJ, Li YY, Zhao Y, Xu QL, Su L. Identification of phosphorylated MYL12B as a potential plasma biomarker for septic acute kidney injury using a quantitative proteomic approach. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8(11):14409–16. PMID: [26823757](#)
30. Belsky JB, Filbin MR, Rivers EP, Bobbitt KR, Jaehne AK, Wisnik CA, et al. F-Actin is associated with a worsening qSOFA score and intensive care unit admission in emergency department patients at risk for sepsis. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2020; 25(5):391–6. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1771419> PMID: [32421363](#)
31. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney international*. 2010; 78(5):486–94. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.165> PMID: [20555318](#)
32. Goldstein SL. Urinary kidney injury biomarkers and urine creatinine normalization: a false premise or not? *Kidney international*. 2010; 78(5):433–5. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.200> PMID: [20706215](#)
33. Conti M, Moutereau S, Esmilaire L, Desbene C, Lallali K, Devanlay M, et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2009; 47(12):1553–6. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.341> PMID: [19877765](#)
34. Tang KW, Toh QC, Teo BW. Normalisation of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research—when and why. *Singapore medical journal*. 2015; 56(1):7–10. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015003> PMID: [25640093](#)
35. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, et al. Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *The New England journal of medicine*. 2016; 375(2):122–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1603017> PMID: [27181456](#)
36. Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Pavenstadt H, et al. Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2016; 315(20):2190–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.5828> PMID: [27209269](#)
37. Karkar A, Ronco C. Prescription of CRRT: a pathway to optimize therapy. *Annals of intensive care*. 2020; 10(1):32. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-0648-y> PMID: [32144519](#)
38. Kustan P, Horvath-Szalai Z, Muhl D. Nonconventional Markers of Sepsis. *Ejifcc*. 2017; 28(2):122–33. PMID: [28757820](#)
39. Ragán D, Kustán P, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Actin is a promising urinary marker of sepsis-induced acute kidney injury. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018; 56(9):eA151–2.

Novel damage biomarkers of sepsis-related acute kidney injury

Dániel Ragán^{1,2}, Zoltán Horváth-Szalai^{1,3}, Balázs Szirmay¹, Diána Mühl²

¹ Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Hungary

² Department of Anesthesiology and Intensive Therapy, Medical School, University of Pécs, Hungary

³ János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Dániel Ragán
Department of Laboratory Medicine
Medical School, University of Pécs
H-7624 Pécs, Ifjúság u. 13
Hungary
Phone: +36 30 364 0402
Fax: +36 72 536 121
E-mail: ragandaniel@hotmail.com

Key words:

Sepsis-3, acute kidney injury,
presepsin, gelsolin, urinary actin,
urinary Gc-globulin, novel biomarker

ORCID ID:

<https://orcid.org/0000-0002-5429-0168>

ABSTRACT

Sepsis-related acute kidney injury (AKI) is one of the most common complications of sepsis at the intensive care unit (ICU) with more adverse mortality rates. The early diagnosis and reliable monitoring of sepsis-related AKI are essential in achieving a favorable outcome. Novel serum and urinary biomarkers could yield valuable information during this process.

Regarding the widely used Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) classifications, the diagnosis of AKI is still based on the increase of serum creatinine levels and the decrease of urine output; however, these parameters have limitations in reflecting the extent of kidney damage, therefore more sensitive and specific laboratory biomarkers are needed for the early diagnosis and prognosis of sepsis-related AKI. Regarding this, several serum parameters are discussed in this review including presepsin and the most important actin scavenger proteins (gelsolin,

Gc-globulin) while other urinary markers are also examined including cell cycle arrest biomarkers, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule 1 (KIM-1), Cystatin C and actin.

Novel biomarkers of sepsis-related AKI could facilitate the early diagnosis and monitoring of sepsis-related AKI.

INTRODUCTION

Sepsis is a complex clinical syndrome with increasing incidence and unfavorable mortality rates which still poses a significant challenge in intensive care despite the availability of advanced treatment methods [1-3]. As stated in the latest Sepsis-3 definitions, sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by a dys-regulated host response to infection [4].

CONVENTIONAL SEPSIS BIOMARKERS

Timely diagnosis along with effective causal and supportive treatment of sepsis are essential for achieving adequate recovery. Although not being part of the Sepsis-3 definitions, serum high-sensitivity C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) are still widely used inflammatory markers in the clinical evaluation of sepsis [4, 5]. CRP is a non-specific inflammatory marker; thus, it can be elevated in various acute and chronic diseases (e.g. autoimmune disorders, trauma, malignancies) besides sepsis [6-8]. However, despite CRP being a general inflammatory marker, its mostly inversely proportional relation to albumin – namely the CRP:albumin ratio – has already been investigated in numerous clinical conditions (e.g. sepsis, pancreatitis, coronary artery disease, malignancies) [9-11]. CRP reaches its peak levels 48 hours after the start of the inflammatory process and significantly elevated CRP levels also have a moderate correlation with the severity of sepsis [6, 12]. Compared to CRP, PCT

concentrations increase 4-6 hours after the onset of infection while PCT also showed better performance regarding the diagnosis and mortality prediction of sepsis [8, 13, 14]. However, exclusively fungal or viral infections do not elevate PCT, yet other inflammatory conditions (e.g. extensive tissue injury, pancreatitis) besides infection could result in slightly increased PCT levels [14, 15]. Furthermore, the antagonistic changes in PCT and albumin were also investigated in sepsis-related AKI [16].

Besides hs-CRP and PCT, more than 200 novel (mostly serum) sepsis biomarkers have been evaluated, yet no single marker was sensitive or specific enough for accurately diagnosing sepsis [17, 18]. However, a multi-marker approach including various promising sepsis biomarkers (e.g. presepsin, IL-6) may provide useful information regarding the early diagnosis of sepsis.

Presepsin

Presepsin (PSEP) is the soluble N-terminal fragment (MW=13 kDa) of the cluster of differentiation (CD) marker protein CD14 (MW=55 kDa), which is the receptor for lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein complexes [19, 20]. Compared to PCT, PSEP has an even more rapid response time of 2-4 hours after the onset of infection, while PSEP was also deemed valuable for the early diagnosis and prognosis of sepsis in contrast to other conditions (e.g. trauma, burn injury, major surgical operations) [21, 22]. PSEP has varying diagnostic cut-off values among 400-600 pg/mL for sepsis, yet there is a concern that PSEP concentrations are affected by kidney function [23-25]. It is presumed that PSEP is filtered by the glomeruli, then reabsorbed and catabolized within proximal tubular cells. Several studies reported increasing PSEP levels as kidney function decreases (e.g. during chronic kidney disease or sepsis-related AKI) [26-28]. However, PSEP – along with hs-CRP and PCT – could be removed from the circulation

using different modalities of renal replacement therapy (RRT), therefore potentially causing falsely low inflammatory marker levels [28, 29].

CONVENTIONAL MARKERS OF SEPSIS-RELATED AKI

AKI refers to an abrupt decrease in kidney function resulting in the retention of numerous waste products and the dysregulation of extracellular volume [30, 31]. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) classification is widely used for the diagnosis of AKI based on the increase in serum creatinine (sCr) levels and the decrease of urine output, both of which are kidney function markers [32]. Urine output often decreases before the elevation of sCr concentration could be detected, yet not all reductions in urine output indicate AKI. Unfortunately, due to the non-linear relationship between glomerular filtration rate (GFR) and sCr, the increase of creatinine could be overlooked in the early phase of AKI. Therefore, the changes in these parameters do not reflect the extent of kidney damage, hence more sensitive and specific laboratory biomarkers are needed for the early diagnosis and prediction of AKI [33, 34].

So far, several novel biomarkers have been investigated to improve early diagnosis and prognosis of sepsis-related AKI [34, 35]. However, the clinical use of the studied biomarkers remains unclear due to heterogeneity of AKI itself and the limitations of novel AKI biomarkers. Regarding this, several biomarkers are discussed including tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2), insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1) and Cystatin C (CysC) while urinary actin and the most important proteins of the actin scavenger system (gelsolin, Gc-globulin) are also presented in this review.

NOVEL DAMAGE BIOMARKERS IN SEPSIS-RELATED AKI

Pre-injury phase stress markers

It has been proposed that the development of AKI is mostly preceded by a so-called acute kidney stress (AKS) phase which can occur due to several sources of renal insults (e.g. hypoperfusion, nephrotoxic drugs, cytokines, reactive oxygen species). The expression of several cell growth regulating proteins including TIMP-2 (MW=21 kDa) and IGFBP7 (MW=29 kDa) could be upregulated in the tubular system as a consequence of kidney stress, thus leading to G1 cell cycle arrest through the induction of several apoptotic pathways. In the case of prolonged kidney stress, the persistent urinary increase of these biomarkers could also indicate apoptotic tubular injury, thereby signaling the early development of AKI. Urine measurements of TIMP-2 and IGFBP7 were found useful in the early diagnosis and prognosis of AKI according to several multicentric studies. However, these biomarkers did not prove to be beneficial in patients with more severe stages of AKI while false positive results could also occur frequently in low-risk patients [36-38].

Tubular markers of AKI progression

NGAL is a glycoprotein (MW=25 kDa) of the lipid carrier protein superfamily expressed mostly on the surface of neutrophils while also being scarcely present in other cell types (e.g. nephrocytes, hepatocytes). NGAL is filtered through the glomeruli and reabsorbed in the proximal tubules under normal circumstances. NGAL expression is rapidly upregulated if the tubular system is affected during ischemic or nephrotoxic renal injury, hence NGAL is detectable in the urine as early as 3 hours after the onset of kidney damage. Plasma NGAL levels seem to have a stronger correlation with absolute neutrophil count than proinflammatory cytokines,

therefore lower plasma NGAL levels could still occur due to neutropenia in patients with systemic inflammation [39]. However, urine NGAL levels may also be significantly increased in AKI patients with neutropenia if the tubular system is affected. As NGAL also has an antimicrobial effect by binding siderophores, it was also found valuable along with hepcidin – a main regulator of iron homeostasis – in the prognosis of sepsis-related AKI. All in all, urinary NGAL elevation could reflect the decreased reabsorption of filtered NGAL due to the dysfunction or injury of the proximal tubules while its expression could also be upregulated in the tubular system during sepsis-related AKI [40-43].

KIM-1 is a transmembrane glycoprotein (MW=39 kDa) containing extracellular immunoglobulin and mucin domains having a low expression in the kidney under physiological conditions. However, it is upregulated after ischemia-reperfusion injury, especially in proliferating de-differentiated proximal tubular epithelial cells 48 hours after injury. KIM-1 appears to be a highly sensitive marker of AKI in non-cardiac surgical patients as well as after cardiac surgery. Persistent serum KIM-1 elevation indicates ongoing tubular injury, potentially increasing the risk for the development of chronic kidney disease, while urinary KIM-1 also shows a similar correlation to kidney injury [44-47].

CysC (MW=13 kDa) is constantly produced by all nucleated cells, filtered by the glomeruli, then mostly reabsorbed and catabolized in the proximal tubular cells. The measurement of serum CysC was found to be preferable to sCr in patients after non-traumatic and traumatic amputation while also being superior in predicting cardiovascular events and mortality in elderly patients [48-50]. However, as CysC is a more reliable kidney function marker compared with sCr, it seems to be influenced by old age, large doses of corticosteroids, conditions affecting the thyroid gland, inflammation and malignancies. As

the changes in sCr concentrations have some limitations, especially late in the clinical course of ICU patients, urine CysC seems to be unaffected by several non-renal factors affecting creatinine levels in sepsis-related AKI [50-53].

RELEVANCE OF ACTIN AND THE ACTIN SCAVENGER SYSTEM

Actin

Actin is a multifunctional globular protein (MW=42 kDa) existing in monomeric/globular (G-actin) and in polymeric/filamentous (F-actin) forms. In acute tissue injuries the released extracellular actin is found to be highly toxic in the circulation due to its spontaneous polymerizing tendency causing unfavorable effects on the coagulation system. Gelsolin and Gc-globulin are the most important proteins of the so-called actin scavenger system which is responsible for binding and depolymerizing extracellular actin in the circulation, thus making the urinary appearance of these protein complexes unlikely [54-57]. However, an earlier study indicates that actin could be detected in the urine of kidney transplant patients with sustained AKI [58]. Recently published data suggest that urinary actin (u-actin) could be a complementary diagnostic biomarker to sCr in sepsis-related AKI while higher u-actin levels also seemed to reflect the severity of AKI [59]. Significantly different admission u-actin levels were found between 24 control and 60 septic patients (median: 0.78 vs. 3.98 µg/L, $p<0.001$), while samples from 17 septic non-AKI and 43 sepsis-related AKI patients also showed differences (median: 1.27 vs. 9.52 µg/L, $p<0.001$) (Fig 1). Admission u-actin levels were even more elevated in 43 patients with sepsis-related AKI and were in good agreement with the severity of AKI stages (median: 3.16 vs. 10.78 vs. 11.55 µg/L, $p<0.05$) (Fig 2). This tendency remained the same when referring u-actin to urine creatinine. Parameters of first-day

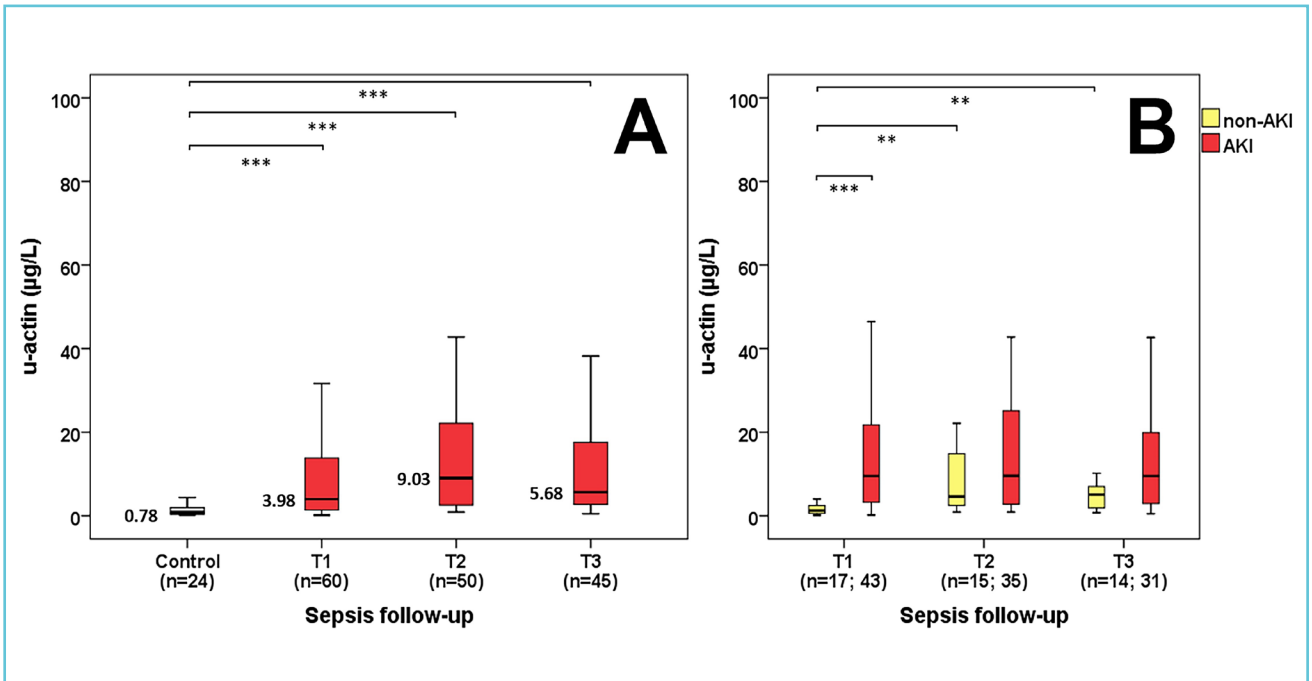
septic patient samples could discriminate AKI from non-AKI state (AUC ROC, $p < 0.001$): u-actin: 0.876; se-creatinine: 0.875. Derived cut-off value for u-actin was 2.63 $\mu\text{g/L}$ (sensitivity: 86.0%, specificity: 82.4%). Although this study has several limitations, u-actin showed moderate correlation with other urinary parameters. Furthermore, extremely elevated u-actin levels were found in sepsis-related AKI patients with RRT requirement. Despite actin being bound to the actin scavenger proteins (gelsolin, Gc-globulin) in the circulation, u-actin could appear in the urine due to both severe glomerular and/or tubular injury, so it seems that the elevation of u-actin indicates severe kidney injury (Figure 1, Figure 2).

Gelsolin

Gelsolin (GSN) is a multifunctional protein existing in three different isoforms. Secreted or

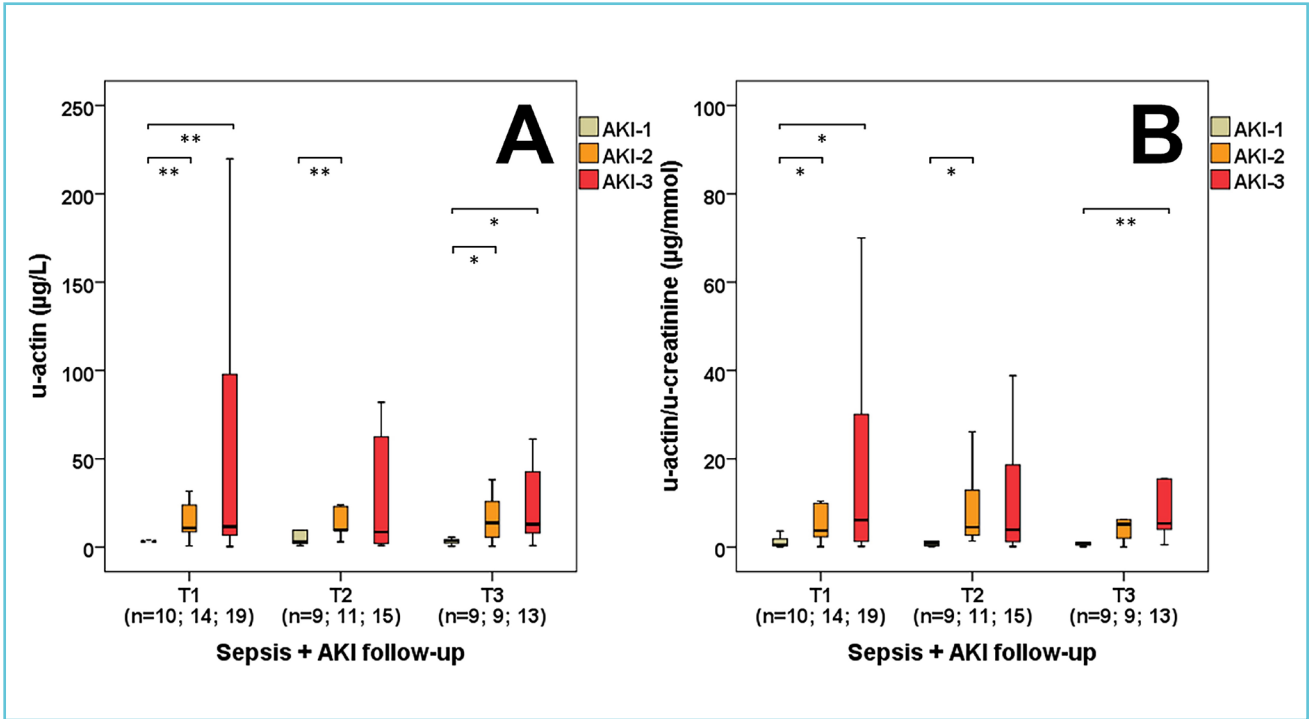
plasma GSN (MW=83 kDa) is an essential component of the extracellular actin scavenger system [55, 60, 61]. Besides actin, GSN may also bind to pro-inflammatory mediators and bacterial wall components (lipoteichoic acid, LPS). Since GSN seems to have a protective role in the body (e.g. by depolymerizing actin filaments in the circulation), a growing body of evidence indicates decreasing GSN levels in various clinical conditions (e.g. severe sepsis, multiple organ dysfunction syndrome (MODS), extensive trauma, acute liver failure, myocardial infarction) [62-64]. Our previous study showed as well that the increase of serum actin was inversely proportional to the amounts of serum GSN which was associated with increased mortality rate [65]. Furthermore, the simultaneous measurement of other inflammatory parameters and GSN levels may provide valuable information in the management of critically ill patients.

Figure 1 Urinary actin in sepsis. U-actin levels of control and septic patients (A) along with sepsis and sepsis-related AKI patients (B) during follow-up



Time points: T1: within 24h after admission; T2: second day morning; T3: third day morning; n: sample count. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. Reprinted with permission from Ragán et al. (2021) (CC BY 4.0) [59].

Figure 2 U-actin (A) and u-actin/u-creatinine (B) levels of the individual sepsis-related AKI stages during follow-up



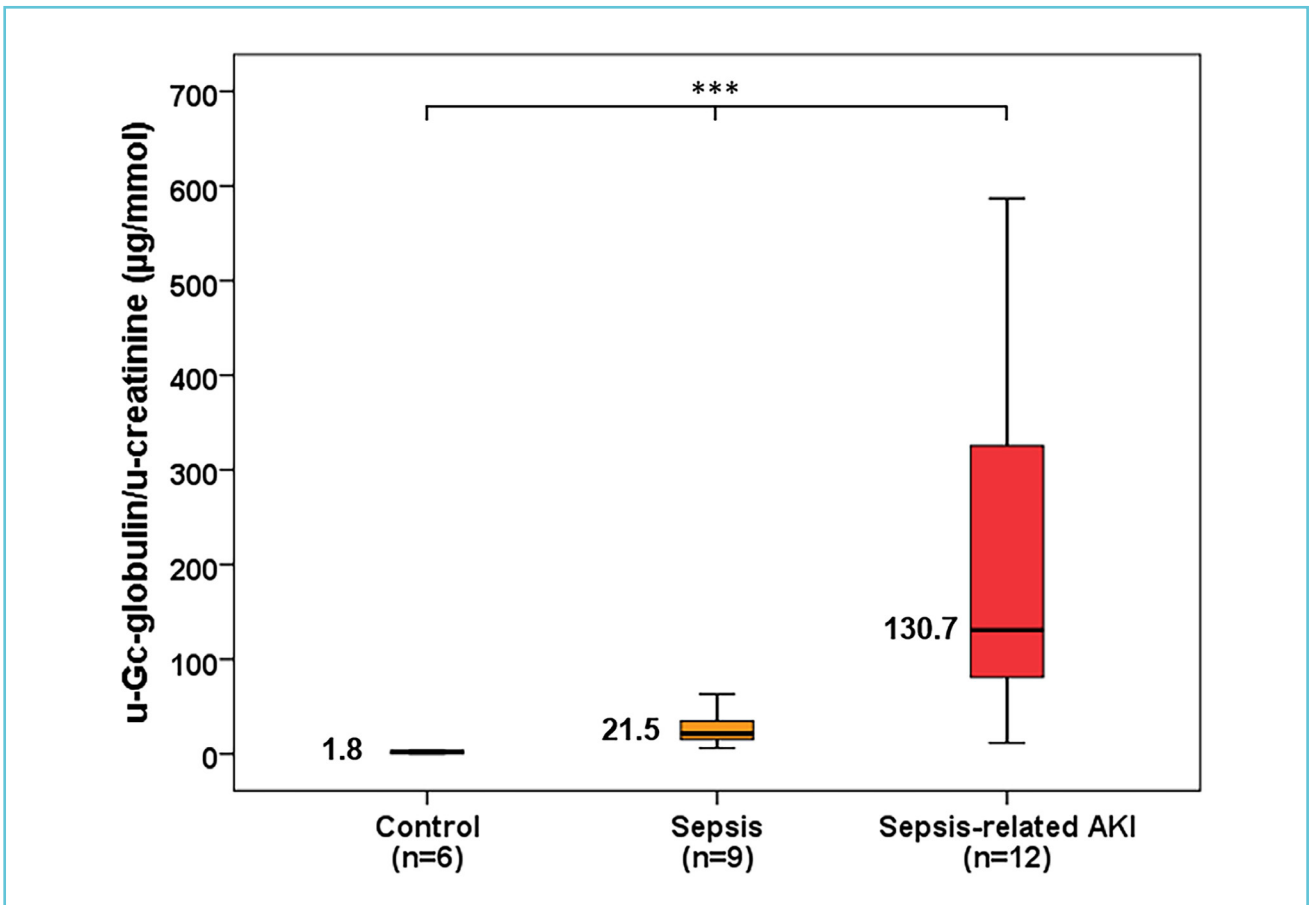
Time points: T1: within 24h after admission; T2: second day morning; T3: third day morning;
 n: sample count. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Reprinted with permission from Ragán et al. (2021) (CC BY 4.0) [59].

Gc-globulin

Gc-globulin (MW=52-59 kDa) has 3 major isoforms (Gc1f, Gc1s, Gc2) while also being a member of the albuminoid superfamily, which consists of several transport proteins in the circulation including albumin, alpha-fetoprotein and afamin [66]. Albumin is the most abundant human serum protein acting as a transporter of endogenous and exogenous substances including thyroxine, fatty acids and drugs. Gc-globulin is mainly produced by the liver with a reference range of 300-600 mg/L, yet severely decreased levels of 50-120 mg/L were observed in acute injury or sepsis. Gc-globulin is involved in the vitamin D biosynthesis process by binding and transporting vitamin D metabolites while it also plays an important role in modulating cells of the adaptive immune response [67, 68]. Under physiological conditions, Gc-globulin is filtered

freely through the glomeruli, then reabsorbed and catabolized by proximal tubular epithelial cells resulting only in a trace urinary excretion. Therefore, tubular kidney damage is expected to result in increased urinary Gc-globulin concentrations [69, 70]. There is only scarce data on urinary appearance of Gc-globulin in sepsis, yet this marker was already investigated in other conditions including endometriosis, diabetic nephropathy and contrast-induced nephropathy as well [67, 71]. Recently, our research group started investigating urinary Gc-globulin/urine creatinine (u-Gc-globulin/u-Cr) levels in sepsis-related AKI by conducting a small sample size pilot study. Compared to 6 control patients, significantly elevated admission u-Gc-globulin/u-Cr levels were found in 9 septic and 12 sepsis-related AKI patients (median: 1.8 vs. 21.5 vs. 136.7 µg/mmol, $p < 0.001$) (Figure 3).

Figure 3 Urinary Gc-globulin in sepsis and in sepsis-related AKI. Admission u-Gc-globulin/u-creatinine levels of control, septic and sepsis-related AKI patients.



n: sample count. AKI: acute kidney injury. *** $p < 0.001$.

SUMMARY OF NOVEL BIOMARKERS IN SEPSIS-RELATED AKI

Despite their limitations and the heterogeneity of AKI itself, the discussed laboratory markers yield valuable information regarding the early diagnosis and effective prognosis of sepsis-related AKI. Most widely known laboratory markers including TIMP-2xIGFBP-7, NGAL, KIM-1 and Cystatin C can be measured using commercially available diagnostic assays, thereby providing accurate results with a short turnaround time (less than 1 hour). Serum GSN was measured using an automated immune turbidimetric assay developed

in our laboratory with a short turnaround time (less than 1 hour) as well, yet this measurement method is not yet commercially available.

However, the measurement of u-actin and u-Gc-globulin/u-creatinine was carried out using quantitative Western blot techniques, hence the routine clinical utility of these biomarkers is questionable. Therefore, our research group is currently working on the development of more rapid and efficient ELISA methods for measuring u-actin and u-Gc-globulin/u-creatinine. All of the discussed laboratory markers are shown in Table 1.

Table 1 Classification of novel AKI biomarkers

	Diagnostic utility based on renal injury site	Measurement method
Novel sepsis-related AKI biomarkers		
Urine TIMP-2xIGFBP-7 (MW=21 kDa)x(MW=29 kDa)	Tubular injury	Point of Care test
Urine NGAL (MW=25 kDa)	Tubular injury	Automated immune turbidimetric assay
Urine KIM-1 (MW=39 kDa)	Tubular injury	ELISA
Urine Cystatin C (MW=13 kDa)	Tubular injury	Automated immune turbidimetric assay
Actin scavenger system proteins		
Urinary actin (MW=42 kDa)	Glomerular and tubular injury	Western blot
Serum Gelsolin (MW=83 kDa)	Glomerular injury	Automated immune turbidimetric assay
Urine Gc-globulin (MW=52-59 kDa)	Glomerular and tubular injury	Western blot

Abbreviations: TIMP-2: tissue inhibitor of metalloproteinases-2; IGFBP7: insulin-like growth factor-binding protein 7; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; KIM-1: kidney injury molecule-1; MW: molecular weight; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

CONCLUSION

The early diagnosis and effective therapy of sepsis and sepsis-related AKI are essential for a successful recovery. However, the currently used biomarkers (sepsis: PCT, hs-CRP; AKI: se-creatinine, urine output) show several limitations regarding the diagnosis and prognosis of sepsis and AKI, hence investigating novel laboratory markers may prove to be beneficial in achieving a more favorable outcome. Most of the discussed AKI biomarkers provide valuable information regarding the injury of the tubular system, yet the monitoring of serum and urinary actin levels along with measuring the proteins of

the actin-scavenger system (GSN, Gc-globulin) could yield more complex information for the assessment of overall renal damage involving both glomerular and tubular sources of kidney injury. Moreover, the increase of these markers could yield valuable information regarding the need for the early initiation of RRT, thus potentially attenuating renal injury and improving the outcome of sepsis-related AKI. Urinary markers provide a non-invasive tool for monitoring of inflammatory conditions. Since sepsis-related AKI is a heterogeneous clinical syndrome, it seems that the measurement of a single marker alone would be insufficient for accurate diagnostic and monitoring purposes. Therefore, a

multi-marker approach involving various serum and urinary biomarkers and the complex evaluation of the clinical parameters should improve patient management at the ICU.



Acknowledgements

The present research was funded by the 2020-4.1.1.-TKP2020 project (Thematic Excellence Program 2020 - National Excellence Subprogram of the Hungarian Ministry for Innovation and Technology) and partially by the Human Reproduction National Laboratory as part of the “Establishment of National Laboratories 2020” program. Zoltán Horváth-Szalai was supported by the University of Pécs, Medical School, Hungary grant (KA-2019-36). We express our special thanks for the invaluable help of the nurses and the colleagues from every participating institute.

Ethical statement

The authors state that they have obtained institutional review board approval from the Regional Research Ethics Committee of the University of Pécs (no. 4327.316-2900/KK15/2011) conforming to the 7th revision of the Helsinki Declarations (2013) for the research described. Verbal and written informed consent were obtained from the patients for the inclusion of their medical and treatment history within this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.



REFERENCES

1. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200-11.

2. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *Jama*. 2017;318(13):1241-9.

3. Rhee C, Jones TM, Hamad Y, Pande A, Varon J, O'Brien C, et al. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. *Jama Network Open*. 2019;2(2):e187571.

4. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.

5. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine*. 2017;43(3):304-77.

6. Póvoa P, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Mealha R, Aragão A, et al. C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Medicine*. 1998;24(10):1052-6.

7. Wang HE, Shapiro NI, Safford MM, Griffin R, Judd S, Rodgers JB, et al. High-sensitivity C-reactive protein and risk of sepsis. *PLoS One*. 2013;8(7):e69232.

8. Tan M, Lu Y, Jiang H, Zhang L. The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(4):5852-9.

9. Kaplan M, Ates I, Akpınar MY, Yuksel M, Kuzu UB, Kacar S, et al. Predictive value of C-reactive protein/albumin ratio in acute pancreatitis. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT*. 2017;16(4):424-30.

10. Karabag Y, Cagdas M, Rencuzogullari I, Karakoyun S, Artac I, Ilis D, et al. Relationship between C-reactive protein/albumin ratio and coronary artery disease severity in patients with stable angina pectoris. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2018;32(7):e22457.

11. Miyamoto T, Fujitani M, Fukuyama H, Hatanaka S, Koizumi Y, Kawabata A. The C-Reactive Protein/Albumin Ratio Is Useful for Predicting Short-Term Survival in Cancer and Noncancer Patients. *Journal of Palliative Medicine*. 2019;22(5):532-7.

12. Sierra R, Rello J, Bailén MA, Benítez E, Gordillo A, León C, et al. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Medicine*. 2004;30(11):2038-45.

13. Meisner M. Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clinica Chimica Acta*. 2002;323(1):17-29.

14. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic

review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(5):426-35.

15. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care Medicine*. 2006;34(7):1996-2003.

16. Chen L, Wu X, Qin H, Zhu H. The PCT to Albumin Ratio Predicts Mortality in Patients With Acute Kidney Injury Caused by Abdominal Infection-Evoked Sepsis. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8(179).

17. Giannakopoulos K, Hoffmann U, Ansari U, Bertsch T, Borggrefe M, Akin I, et al. The Use of Biomarkers in Sepsis: A Systematic Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2017;18(6):499-507.

18. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Critical Care*. 2020;24(1):287.

19. Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Takahashi T, Furusako S. Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011;49(5):937-9.

20. Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2005;11(5):234-8.

21. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012;18(6):891-7.

22. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2011;17(6):764-9.

23. Velissaris D, Zareifopoulos N, Karamouzou V, Karanikolas E, Pierrakos C, Koniari I, et al. Presepsin as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Sepsis. *Cureus*. 2021;13(5):e15019.

24. Wu CC, Lan HM, Han ST, Chaou CH, Yeh CF, Liu SH, et al. Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Intensive Care*. 2017;7(1):91.

25. Zhang X, Liu D, Liu Y-N, Wang R, Xie L-X. The accuracy of presepsin (sCD14-ST) for the diagnosis of sepsis in adults: a meta-analysis. *Critical Care*. 2015;19(1):323.

26. Nagata T, Yasuda Y, Ando M, Abe T, Katsuno T, Kato S, et al. Clinical impact of kidney function on presepsin levels. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129159.

27. Nakamura Y, Hoshino K, Kiyomi F, Kawano Y, Mizunuma M, Tanaka J, et al. Comparison of accuracy of presepsin and procalcitonin concentrations in diagnosing sepsis in patients with and without acute kidney injury. *Clinica Chimica Acta*. 2019;490:200-6.

28. Shimoyama Y, Umegaki O, Kadono N, Minami T. Presepsin and prognostic nutritional index are predictors of septic acute kidney injury, renal replacement therapy initiation in sepsis patients, and prognosis in septic acute kidney injury patients: a pilot study. *BMC Nephrology*. 2021;22(1):219.

29. Honore PM, Jacobs R, Hendrickx I, De Waele E, Van Gorp V, Spapen HD. Presepsin and sepsis-induced acute kidney injury treated with continuous renal replacement therapy: will another promising biomarker bite the dust? *Critical Care*. 2015;19:428.

30. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama*. 2005;294(7):813-8.

31. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2018;14(10):607-25.

32. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements*. 2012;2(1):1-138.

33. Waikar SS, Betensky RA, Bonventre JV. Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies? *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2009;24(11):3263-5.

34. Oh DJ. A long journey for acute kidney injury biomarkers. *Renal Failure*. 2020;42(1):154-65.

35. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Medicine*. 2017;43(6):816-28.

36. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical Care*. 2013;17(1):R25.

37. Su Y, Gong Z, Wu Y, Tian Y, Liao X. Diagnostic Value of Urine Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 for Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170214.

38. Kellum JA, Artigas A, Gunnerson KJ, Honore PM, Kampf JP, Kwan T, et al. Use of Biomarkers to Identify Acute Kidney

- Injury to Help Detect Sepsis in Patients With Infection. *Critical Care Medicine*. 2021;49(4):e360-e8.
39. Choi JW, Fujii T. The Prevalence of Low Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Level in Systemic Inflammation and its Relationship with Proinflammatory Cytokines, Procalcitonin, Nutritional Status, and Leukocyte Profiles. *Clinical Laboratory*. 2019;65(6).
40. Wang K, Xie S, Xiao K, Yan P, He W, Xie L. Biomarkers of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *BioMed Research International*. 2018;2018:6937947.
41. Albert C, Zapf A, Haase M, Rover C, Pickering JW, Albert A, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Measured on Clinical Laboratory Platforms for the Prediction of Acute Kidney Injury and the Associated Need for Dialysis Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*. 2020;76(6):826-41 e1.
42. Chen JJ, Lee TH, Lee CC, Chang CH. Using lipocalin as a prognostic biomarker in acute kidney injury. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2021;21(5):455-64.
43. Qiu Z-L, Yan B-Q, Zhao R, Xu D-W, Shen K, Deng X-q, et al. Combination of hepcidin with neutrophil gelatinase-associated lipocalin for prediction of the development of sepsis-induced acute kidney injury. *Clinica Chimica Acta*. 2021;523:38-44.
44. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney International*. 2002;62(1):237-44.
45. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *American Journal of Physiology Renal physiology*. 2004;286(3):F552-63.
46. Huang Y, Don-Wauchope AC. The clinical utility of kidney injury molecule 1 in the prediction, diagnosis and prognosis of acute kidney injury: a systematic review. *Inflammation & Allergy Drug Targets*. 2011;10(4):260-71.
47. Shao X, Tian L, Xu W, Zhang Z, Wang C, Qi C, et al. Diagnostic Value of Urinary Kidney Injury Molecule 1 for Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis. *PloS One*. 2014;9(1):e84131.
48. Thurlow JS, Abbott KC, Linberg A, Little D, Fenderson J, Olson SW. SCr and SCysC Concentrations Before and After Traumatic Amputation in Male Soldiers: A Case-Control Study. *American Journal of Kidney Diseases*. 2014;63(1):167-70.
49. Aakjær M, Houliand MB, Tredal C, Ankarfeldt MZ, S Jensen P, Andersen O, et al. Differences in Kidney Function Estimates Based on Creatinine and/or Cystatin C in Non-Traumatic Amputation Patients and Their Impact on Drug Prescribing. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(1):89.
50. Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried LF, Seliger SL, Newman AB, et al. Cystatin C and the Risk of Death and Cardiovascular Events among Elderly Persons. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(20):2049-60.
51. Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, Mariat C, Froissart M, Cristol JP. Cystatin C: current position and future prospects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008;46(12):1664-86.
52. Martensson J, Martling CR, Oldner A, Bell M. Impact of sepsis on levels of plasma cystatin C in AKI and non-AKI patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2012;27(2):576-81.
53. Szirmay B, Kustan P, Horvath-Szalai Z, Ludany A, Lakatos A, Muhl D, et al. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis*. 2018;10(6):377-84.
54. Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1381-5.
55. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *The New England Journal of Medicine*. 1992;326(20):1335-41.
56. Belsky JB, Morris DC, Bouchebl R, Filbin MR, Bobbitt KR, Jaehne AK, et al. Plasma levels of F-actin and F:G-actin ratio as potential new biomarkers in patients with septic shock. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*. 2016;21(2):180-5.
57. Sudakov NP, Klimenkov IV, Byvaltsev VA, Nikiforov SB, Konstantinov YM. Extracellular Actin in Health and Disease. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017;82(1):1-12.
58. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003;41(5):1074-87.
59. Ragan D, Kustan P, Horvath-Szalai Z, Szirmay B, Bugyi B, Ludany A, et al. Urinary actin, as a potential marker of sepsis-related acute kidney injury: A pilot study. *PloS One*. 2021;16(7):e0255266.
60. Maiti S, Bamburg JR. Actin-Capping and -Severing Proteins. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Waltham: Academic Press; 2013. p. 18-26.
61. Krebs J. Calcium | Calcium-Binding Proteins: Cytosolic (Annexins, Gelsolins, and C2-Domain Proteins)☆. In: Jez J, editor. *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*. Oxford: Elsevier; 2021. p. 621-9.
62. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial

infarction, septic shock, and myonecrosis. *Critical Care Medicine*. 1997;25(4):594-8.

63. Dahl B, Schiodt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock*. 1999;12(2):102-4.

64. Lee PS, Patel SR, Christiani DC, Bajwa E, Stossel TP, Waxman AB. Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PloS One*. 2008;3(11):e3712.

65. Horvath-Szalai Z, Kustan P, Mühl D, Ludany A, Bugyi B, Koszegi T. Antagonistic sepsis markers: Serum gelsolin and actin/gelsolin ratio. *Clinical Biochemistry*. 2017;50(3):127-33.

66. Mozzi A, Forni D, Cagliani R, Pozzoli U, Vertemara J, Bresolin N, et al. Albuminoid genes: evolving at the interface of dispensability and selection. *Genome Biology and Evolution*. 2014;6(11):2983-97.

67. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin

D binding. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;29(5):773-86.

68. Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;10(910).

69. Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Wians F, Lee WM, Balko J, et al. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. *Critical Care Medicine*. 2003;31(1):152-6.

70. Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, Lakatos A, Christensen PH, Huber T, et al. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2018;56(8):1373-82.

71. Chaykovska L, Heunisch F, von Einem G, Alter ML, Hocher C-F, Tsuprykov O, et al. Urinary Vitamin D Binding Protein and KIM-1 Are Potent New Biomarkers of Major Adverse Renal Events in Patients Undergoing Coronary Angiography. *PloS One*. 2016;11(1):e0145723.

BMC Infectious Diseases

Presepsin:gelsolin ratio, as a promising marker of sepsis-related organ dysfunction: a prospective observational study

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	INFD-D-22-00365	
Full Title:	Presepsin:gelsolin ratio, as a promising marker of sepsis-related organ dysfunction: a prospective observational study	
Article Type:	Research article	
Section/Category:	I don't know (Editor will decide Section)	
Funding Information:	Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (2020-4.1.1.-TKP2020)	Dr. Tamás Kőszegi
	Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (Establishment of National Laboratories 2020)	Dr. Tamás Kőszegi
	Emberi Eforrások Minisztériuma (EFOP 3.6.1-16-2016-00004)	Dr. Tamás Kőszegi
	Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem (KA-2019-36)	Dr. Zoltán Horváth-Szalai
Abstract:	<p>Background: We aimed to facilitate the diagnosis and prognosis of sepsis-related organ dysfunction through analyzing presepsin (PSEP) and gelsolin (GSN) levels along with a novel marker, the presepsin:gelsolin (PSEP:GSN) ratio.</p> <p>Methods: Blood samples were collected from septic patients at the intensive care unit (ICU) at three time points (T1-3): T1: within 12h after admission; T2: second day morning; T3: third day morning. Sampling points for non-septic ICU patients were T1 and T3. PSEP was measured by a chemiluminescence-based POCT method while GSN was measured by an automated immune turbidimetric assay. Data were compared with routine lab and clinical parameters. Patients were categorized by the Sepsis-3 definitions. PSEP:GSN ratio was evaluated in major sepsis-related organ dysfunctions including hemodynamic instability, respiratory insufficiency and acute kidney injury (AKI).</p> <p>Results: In our single center prospective observational study, 126 patients were enrolled (23 control, 38 non-septic and 65 septic patients). Compared with controls, significantly elevated ($p < 0.001$) admission PSEP:GSN ratios were found in non-septic and septic patients. PSEP:GSN ratios were also increased ($p < 0.001$) in patients with sepsis-related AKI compared with septic non-AKI patients during follow-up, especially in sepsis-related AKI patients needing renal replacement therapy. Furthermore, increasing PSEP:GSN ratios were in good agreement ($p < 0.001$) with the dosage and the duration of vasopressor requirement in septic patients. Moreover, PSEP:GSN ratios were significantly higher ($p < 0.001$) in patients with septic shock than in septic patients without shock. Compared to septic patients needing oxygen supplementation, considerably elevated ($p < 0.001$) PSEP:GSN ratios were observed in septic patients needing mechanical ventilation, while higher PSEP:GSN ratios ($p < 0.001$) were also associated with prolonged mechanical ventilation requirement in septic patients.</p> <p>Conclusions: PSEP:GSN ratio was found to be a useful marker regarding the diagnosis and short term mortality prediction of sepsis along with the more accurate assessment of sepsis-related hemodynamic instability and respiratory insufficiency. PSEP:GSN ratio could yield valuable information regarding the extent of inflammation and the simultaneous depletion of the patient's scavenger capacity during sepsis.</p> <p>Trial registration: NIH U.S. National Library of Medicine, Clinicaltrials.gov Trial Identifier: NCT05060679, 23.03.2022, Retrospectively registered.</p> <p>Keywords: Sepsis-3; Organ dysfunction; Prognosis; Presepsin; Gelsolin; Presepsin:gelsolin ratio; Novel biomarker</p>	
Corresponding Author:	Dániel Ragán, M.D. University of Pecs Medical School: Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Pécs, Baranya HUNGARY	

Corresponding Author E-Mail:	ragandaniel@hotmail.com
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Pecs Medical School: Pecs Tudomanyegyetem Altalanos Orvostudományi Kar
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Dániel Ragán, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Dániel Ragán, M.D.
	Péter Kustán, M.D., Ph.D.
	Zoltán Horváth-Szalai, M.D., Ph.D.
	Balázs Szirmay, M.D.
	Attila Miseta, M.D., D.Sc.
	Gábor Woth, M.D., Ph.D.
	Diána Mühl, M.D., Ph.D.
	Tamás Kőszegi, M.D., Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Has this manuscript been submitted before to this journal or another journal in the BMC series</ a>?	No



[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Presepsin:gelsolin ratio, as a promising marker of sepsis-related organ**
2 **dysfunction: a prospective observational study**

3 **Short title:** Presepsin:gelsolin ratio in sepsis-related organ dysfunction

4 Dániel Ragán^{1,2,*}, Péter Kustán¹, Zoltán Horváth-Szalai^{1,3}, Balázs Szirmay¹, Attila Miseta¹,
5 Gábor Woth^{2,4}, Diána Mühl², Tamás Kőszegi^{1,3,5}

6 ¹ Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Medical School, Ifjúság u. 13, H-7624
7 Pécs, Hungary; ragandaniel@hotmail.com (DR), peter.kustan89@gmail.com (PK),
8 h.sz.zoltan2@gmail.com (ZH-Sz), balazs.drszirmay@gmail.com (BSz),
9 attila.miseta@aok.pte.hu (AM), tamas.koszegi@aok.pte.hu (TK)

10 ² Department of Anesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs, Medical School,
11 Ifjúság u. 13, H-7624 Pécs, Hungary; drdianamuhl@gmail.com (DM), glwoth@gmail.com (GW)

12 ³ János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság u. 20, H-7624 Pécs, Hungary

13 ⁴ Department of Anesthesia, Intensive Care and Pain Medicine, Klinik Ottakring,
14 Montleartstraße 37, A-1160 Vienna, Austria

15 ⁵ Human Reproduction National Laboratory, University of Pécs, Ifjúság u. 20, H-7624 Pécs,
16 Hungary

17 * **Corresponding author:** Dániel Ragán, Department of Laboratory Medicine, University of
18 Pécs, Medical School, Ifjúság u. 13, H-7624 Pécs, Hungary
19 E-mail address: ragandaniel@hotmail.com (DR)

20 **ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0002-5429-0168>

21 **Trial registration:** NIH U.S. National Library of Medicine, Clinicaltrials.gov Trial Identifier:
22 NCT05060679, 23.03.2022, Retrospectively registered. The manuscript adheres to the STROBE
23 guidelines for reporting observational studies (see Supplementary information).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

24 **Abstract**

25 **Background:** We aimed to facilitate the diagnosis and prognosis of sepsis-related organ
26 dysfunction through analyzing presepsin (PSEP) and gelsolin (GSN) levels along with a novel
27 marker, the presepsin:gelsolin (PSEP:GSN) ratio.

28 **Methods:** Blood samples were collected from septic patients at the intensive care unit (ICU) at
29 three time points (T1-3): T1: within 12h after admission; T2: second day morning; T3: third day
30 morning. Sampling points for non-septic ICU patients were T1 and T3. PSEP was measured by a
31 chemiluminescence-based POCT method while GSN was measured by an automated immune
32 turbidimetric assay. Data were compared with routine lab and clinical parameters. Patients were
33 categorized by the Sepsis-3 definitions. PSEP:GSN ratio was evaluated in major sepsis-related
34 organ dysfunctions including hemodynamic instability, respiratory insufficiency and acute kidney
35 injury (AKI).

36 **Results:** In our single center prospective observational study, 126 patients were enrolled (23
37 control, 38 non-septic and 65 septic patients). Compared with controls, significantly elevated
38 ($p<0.001$) admission PSEP:GSN ratios were found in non-septic and septic patients. PSEP:GSN
39 ratios were also increased ($p<0.001$) in patients with sepsis-related AKI compared with septic non-
40 AKI patients during follow-up, especially in sepsis-related AKI patients needing renal replacement
41 therapy. Furthermore, increasing PSEP:GSN ratios were in good agreement ($p<0.001$) with the
42 dosage and the duration of vasopressor requirement in septic patients. Moreover, PSEP:GSN ratios
43 were significantly higher ($p<0.001$) in patients with septic shock than in septic patients without
44 shock. Compared to septic patients needing oxygen supplementation, considerably elevated
45 ($p<0.001$) PSEP:GSN ratios were observed in septic patients needing mechanical ventilation,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

46 while higher PSEP:GSN ratios ($p < 0.001$) were also associated with prolonged mechanical
47 ventilation requirement in septic patients.

48 **Conclusions:** PSEP:GSN ratio was found to be a useful marker regarding the diagnosis and short
49 term mortality prediction of sepsis along with the more accurate assessment of sepsis-related
50 hemodynamic instability and respiratory insufficiency. PSEP:GSN ratio could yield valuable
51 information regarding the extent of inflammation and the simultaneous depletion of the patient's
52 scavenger capacity during sepsis.

53 **Trial registration:** NIH U.S. National Library of Medicine, Clinicaltrials.gov Trial Identifier:
54 NCT05060679, 23.03.2022, Retrospectively registered.

55 **Keywords:** Sepsis-3; Organ dysfunction; Prognosis; Presepsin; Gelsolin; Presepsin:gelsolin ratio;
56 Novel biomarker

57
58 **Background**

59 Early diagnosis and effective therapy of sepsis are still one of the biggest challenges at the intensive
60 care unit (ICU) with adverse mortality rates despite of the availability of modern treatment
61 modalities [1, 2]. Recent epidemiological studies show an increasing incidence with a slightly
62 decreasing mortality rate [3-5]. As stated in the latest Sepsis-3 definitions, sepsis is a life-
63 threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [6].

64 Regarding laboratory markers, serum procalcitonin (PCT) and high-sensitivity C-reactive protein
65 (hs-CRP) are the most widely used inflammatory markers in the clinical evaluation of sepsis, yet
66 the role of biomarkers remains unspecified in the Sepsis-3 definitions [6, 7]. Besides hs-CRP and
67 PCT, more than 200 novel (mostly serum) sepsis biomarkers have been evaluated to date, however,
68 no single marker was sensitive or specific enough for accurately diagnosing sepsis [8-10]. On the

1
2
3
4 69 other hand, a multi-marker approach involving various promising sepsis biomarkers (e.g.
5
6
7 70 presepsin, IL-6) may provide useful information regarding the extent or the source of organ
8
9 71 dysfunction during sepsis.

10
11 72 Potentially any vital organ system could be affected during the development of sepsis, therefore
12
13
14 73 the most important manifestations of potentially life-threatening organ dysfunctions include
15
16 74 hemodynamic instability, respiratory insufficiency, acute kidney injury (AKI), acute liver failure,
17
18
19 75 thrombocytopenia and altered mental state [6, 7]. The currently used and widely validated Acute
20
21 76 Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II), Simplified Acute Physiology Score
22
23 77 II (SAPS II) and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores have major advantages
24
25
26 78 regarding the mortality prediction of critically ill patients along with the assessment of sepsis-
27
28
29 79 related organ dysfunction. However, the measurement of novel sepsis biomarkers could also
30
31 80 provide valuable information in the more accurate assessment of specific sepsis-related organ
32
33 81 dysfunctions, as these clinical prediction scores may have limitations due to the heterogeneity of
34
35
36 82 sepsis itself [6-8, 11].

37
38 83 AKI is a common complication of sepsis or septic shock often associated with more severe
39
40
41 84 mortality rates [12-14]. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) classification
42
43 85 is widely used for the diagnosis of AKI based on the increase in serum creatinine levels and the
44
45
46 86 decrease of urine output [15]. However, due to the retention of numerous waste products during
47
48 87 the development of sepsis-related AKI, various protein concentrations could also increase further
49
50
51 88 in the circulation including a novel sepsis biomarker, called presepsin.

52
53 89 Presepsin is the 13-kDa soluble N-terminal fragment of the 55-kDa cluster of differentiation (CD)
54
55 90 marker protein CD14, which is the receptor for lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein
56
57
58 91 complexes [16, 17]. Plasma presepsin (PSEP) levels may increase earlier compared with the
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

92 conventional sepsis biomarkers (hs-CRP, PCT), which has been confirmed in animal models of
93 experimental sepsis [18-20]. The measurement of PSEP concentrations was deemed valuable for
94 the early diagnosis of sepsis and the evaluation of sepsis severity in contrast to other conditions
95 (e.g. trauma, burn injury, surgeries) [21, 22]. According to several multicentric studies, the
96 diagnostic cut-off levels of PSEP varied among 400 - 600 pg/mL for sepsis, while the measurement
97 of PSEP levels was also useful for the prognosis of septic patients [23-26].

98 However, PSEP concentrations can also be affected by kidney function [27-29]. Several studies
99 reported increasing PSEP levels as kidney function decreases (e.g. during chronic kidney disease
100 or sepsis-related AKI). However, PSEP – along with hs-CRP and PCT – could be removed from
101 the circulation due to its relatively small size using different modalities of renal replacement
102 therapy (RRT), thereby potentially causing falsely low biomarker levels [30-33].

103 Albumin has various physiological functions in the circulation by (e.g. maintaining the plasma
104 oncotic pressure, transporting substances, scavenging free radicals). As albumin levels mostly
105 decrease during severe catabolic conditions, elevated CRP:albumin ratios, PCT:albumin ratios and
106 Presepsin:albumin ratios (calculated from inversely changing inflammatory markers and albumin
107 levels) were observed in sepsis, sepsis-related AKI, pancreatitis, coronary artery disease and some
108 types of malignancies [34-41].

109 Gelsolin (GSN) is a multifunctional protein existing in three different isoforms. Secreted or plasma
110 GSN (MW = 83 kDa) is an essential component of the so-called extracellular actin scavenger
111 system [42-44]. A growing body of experimental evidence indicates decreasing serum GSN levels
112 in various clinical conditions (e.g. severe sepsis, multiple organ dysfunction syndrome (MODS),
113 extensive trauma, acute liver failure, myocardial infarction) [45-47]. Our previous study showed

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

114 as well that the increase of serum actin was inversely proportional to the amounts of serum GSN
115 which was associated with increased mortality rate [48].

116 Since the increasing ratios of several inflammatory markers (e.g. CRP, PCT, PSEP) and scavenger
117 proteins (e.g. albumin) were found to be useful markers in sepsis, we hypothesized that the
118 simultaneous measurement of PSEP and GSN levels could also yield valuable information
119 regarding the diagnosis and prognosis of sepsis and sepsis-related organ dysfunctions. Therefore,
120 we investigated a new potential marker: the Presepsin:Gelsolin (PSEP:GSN) ratio. The main
121 focuses of our study were the followings:

- 122 • comparing PSEP:GSN ratios of control, non-septic and septic patients
- 123 • investigating PSEP:GSN ratios in septic patients with and without MODS
- 124 • analyzing the diagnostic performance of PSEP:GSN ratio in non-septic vs. septic and septic
125 non-AKI vs. sepsis-related AKI patients
- 126 • examining the 10-day mortality prediction of PSEP:GSN ratio
- 127 • investigating the diagnostic utility of PSEP:GSN ratio in sepsis-related hemodynamic
128 instability based on the dosage and the duration of vasopressor requirement
- 129 • analyzing the diagnostic and prognostic performance of PSEP:GSN ratio in sepsis-related
130 respiratory insufficiency based on the requirement for oxygen supplementation vs.
131 mechanical ventilation
- 132 • comparing PSEP:GSN ratio to the routinely used sepsis markers (e.g. PCT) along with
133 other laboratory parameters (e.g. se-creatinine) and clinical prognostic scores (e.g. SOFA)

134 **Methods**

135 **Study design**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

136 Besides control individuals, non-septic patients needing ICU hospitalization after major surgical
137 interventions (e.g. esophageal or pancreatic cancer surgery, cardiac surgery) and acutely diagnosed
138 septic patients were enrolled consecutively in our single center prospective observational study
139 conducted between January 2018 and February 2020 at the Department of Anesthesiology and
140 Intensive Therapy (Medical School, University of Pécs, Hungary). Detailed information was given
141 to all patients or their next-of-kin regarding our study protocol while written consent was obtained
142 from all. Exclusion criteria were patients under 18 years of age, unobtainable consent, end-stage
143 renal disease requiring chronic dialysis or kidney transplantation and patients with malignancies
144 needing palliative care. Defined end points were death or withdrawal of consent during sample
145 collection. The study protocol was registered retrospectively at ClinicalTrials.gov
146 (NCT05060679) and was approved by the Regional Research Ethics Committee of the University
147 of Pécs (no. 4327.316-2900/KK15/2011) conforming to the 7th revision of the Helsinki
148 Declarations (2013).

149 The diagnosis of sepsis was determined after admission based on the Sepsis-3 definitions [6].
150 Inclusion criteria for sepsis were the followings: a suspected or microbiologically confirmed
151 infection and at least 1 vital organ dysfunction shown in increased SOFA score (>2). Non-septic
152 patients could have also had increased admission SOFA scores, yet these patients' clinical
153 presentation was not associated with the presence of an infection. Therapeutic approaches of sepsis
154 were based on the international guidelines of the actual Surviving Sepsis Campaign (SSC)
155 regarding respiratory, anticoagulation, vasopressor and hydrocortisone therapy, along with
156 sedation, ulcer prophylaxis and nutrition [7]. According to the updated hour-1 bundle of the SSC
157 guidelines, all patients received adequate fluid resuscitation and ex juvantibus broad spectrum

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

158 antimicrobial therapy guided by the clinical presentation for 24 to 72 hours, which was later
159 modified based on the results of microbiological investigations [49].

160 Regarding sepsis-related hemodynamic instability, patients were categorized based on low (≤ 0.1
161 $\mu\text{g/kg/min}$) and high ($> 0.1 \mu\text{g/kg/min}$) dose vasopressor (mostly norepinephrine) requirement,
162 while patients were also divided based on shorter (≤ 5 consecutive days) and longer (> 5 consecutive
163 days) vasopressor requirement during ICU stay. Patients were regarded to have septic shock if they
164 had persisting sepsis-induced hypotension despite adequate fluid resuscitation, higher doses of
165 vasopressor requirement and elevated plasma lactate levels ($> 2 \text{ mmol/L}$) [6].

166 Regarding sepsis-related respiratory insufficiency, patients were categorized based on their
167 requirement for oxygen supplementation (e.g. face mask ($\text{FiO}_2 \geq 50\%$), high-flow nasal oxygen
168 therapy) and mechanical ventilation (invasive ventilation after endotracheal intubation), while the
169 latter group was also divided based on shorter (≤ 5 consecutive days) and longer (> 5 consecutive
170 days) requirement for mechanical ventilation during ICU stay [6, 7]. Patients needing mechanical
171 ventilation were further divided based on the development of (at least) moderate acute respiratory
172 distress syndrome (ARDS) according to the Berlin definition (diffuse pulmonary infiltrates on
173 chest radiographs, the absence of congestive heart failure, decreased lung compliance, Horowitz
174 quotient $< 200 \text{ mmHg}$, positive end-expiratory pressure ($\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$)) [50].

175 As the majority of mechanically ventilated septic patients received propofol or dexmedetomidine
176 sedation during the early stages of respiratory failure, we had limitations regarding the accurate
177 assessment of the patients' level of consciousness using the Glasgow Coma Scale.

178 Patients were diagnosed with AKI within 12 hours after admission to the ICU in the case of
179 elevated serum creatinine levels (≥ 1.5 - fold increase from the baseline in the last 7 days or ≥ 26.5
180 $\mu\text{mol/L}$ increase within 48 hours) or decreased urine output ($< 0.5 \text{ mL/kg/h}$ for 6 hours) [15].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

181 First-day values of SAPS II, APACHE II and SOFA scores were calculated for the assessment of
182 disease severity. Septic patients were considered to have MODS if they developed at least 2 or
183 more vital organ dysfunctions (e.g. hemodynamic instability, respiratory insufficiency, AKI, acute
184 liver failure, thrombocytopenia, altered mental state) during follow-up based on significantly
185 elevated SOFA scores. Patients were categorized as survivors and non-survivors using 10-day
186 mortality data.

187 Control individuals were recruited as outpatients from the Department of Ophthalmology (Medical
188 School, University of Pécs, Hungary). Exclusion criteria were lack of consent, infectious disease,
189 kidney disease or acute inflammation (hs-CRP >5 mg/L).

190 Sampling

191 Blood samples were collected from septic patients at the ICU at three time points (T1-3): T1:
192 within 12 hours after admission; T2: second day morning of follow-up; T3: third day morning of
193 follow-up. The majority of patients were admitted at night or in the late afternoon before the actual
194 first-day sample collection resulting in a slightly variable time interval (within 12 hours) before
195 taking the first sample. Sampling points for non-septic patients were the first (T1) and third (T3)
196 postoperative morning. Arterial blood was obtained from every non-septic and septic patient from
197 arterial catheter using plastic blood collection tubes with accelerator gel (5 mL) for serum samples
198 and EDTA-anticoagulated tubes (4 mL) for plasma samples (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ,
199 USA). Not more than one sample (venous blood) was collected from controls. Anticoagulated
200 blood samples were centrifuged immediately (10 min, 1500 g) while for native blood, tubes after
201 coagulation were centrifuged (10 min, 1500 g), then plasma and serum aliquots were stored
202 without preservatives at -70 °C until analysis.

203 Laboratory analysis

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

204 Serum parameters including total protein (se-TP), albumin, bilirubin, kidney function markers (se-
205 urea, se-creatinine) along with plasma lactate, platelet count (PLT), and inflammatory parameters
206 (white blood cell count (WBC), hs-CRP, PCT) were measured using automated routine procedures
207 at our accredited laboratory (Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of
208 Pécs, Hungary; NAH-9-0008/2021). Serum gelsolin (GSN) was measured by an automated
209 immune turbidimetric assay (Cobas 8000/c502 module (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
210 Germany)) developed and validated in our laboratory [51, 52].

211 Determination of plasma presepsin levels and presepsin:gelsolin ratio

212 PSEP concentrations were measured using an automated Point of Care instrument (PATHFAST;
213 LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan) based on a chemiluminescent enzyme immunoassay
214 technique with a detection range of 20 – 20,000 pg/mL [53]. Tests were performed according to
215 the manufacturer’s instructions and the performance of the method was checked by bi-level
216 controls. PSEP:GSN ratio was calculated as the ratio of PSEP to GSN concentrations.

217 Statistical analysis

218 The IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22 (IBM Corp., NY, USA) software was used for
219 statistical analysis. Since our data did not show normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov
220 and Shapiro-Wilk tests, we performed non-parametric tests. The control, non-septic and septic
221 patient groups were compared using Chi-square or Fischer’s exact test for qualitative data and
222 Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis tests for quantitative data. Friedman’s ANOVA with post hoc
223 Dunn tests along with Wilcoxon tests were carried out to compare the quantitative data of different
224 time points in every patient group. Diagnostic and prognostic performance of laboratory and
225 clinical parameters were evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves. Spearman's
226 rank correlation test was applied for investigating relationships between quantitative variables.

Quantitative data were presented as medians and interquartile ranges (IQR) while qualitative data as frequencies and percentages (%). Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

Patients' demographic and laboratory data

In the present study, 126 patients were enrolled consecutively (23 control individuals, 38 non-septic and 65 septic patients). Basic admission demographic, laboratory and clinical data are shown in Table 1. A moderate difference ($p < 0.05$) was found between the patient groups regarding age and some of the listed of comorbidities. A significant difference ($p < 0.05$) was observed between the control, non-septic and septic patient groups in se-TP, se-albumin, hs-CRP, PSEP and GSN levels along with PSEP:GSN ratios. Admission values of se-urea, se-creatinine, WBC and PLT were significantly different ($p < 0.05$) as well in the non-septic and septic groups compared with those of the controls. APACHE II, SAPS II and SOFA scores along with PCT levels were considerably higher ($p < 0.05$) in septic patients than in non-septic patients. Major therapeutic requirements of the non-septic group were the followings: all patients received adequate fluid resuscitation, yet 23 patients also had temporary low dose vasopressor requirement; 36 patients needed oxygen supplementation, 2 patients needed temporary mechanical ventilation and no patients required RRT during follow-up.

Table 1. Patients' admission demographic, laboratory and clinical data.

	Control (n=23)	Non-Sepsis (n=38)	Sepsis (n=65)	p value
Age (years)	52 (48 - 56)	64 (56 - 72)	68 (57 - 73)	$< 0.05^{a,b}$
Males, n (%)	13 (56.5)	26 (68.4)	43 (66.2)	n.s.
Major comorbidities, n (%)				
Cardiovascular disease	10 (43.5)	33 (86.8)	51 (78.5)	$< 0.05^{a,b}$
Type-2 diabetes mellitus	5 (21.7)	12 (24.9)	19 (29.2)	n.s.

Chronic kidney disease	0	3 (7.9)	8 (12.3)	n.s.
Pulmonary disease	2 (8.7)	11 (28.9)	12 (18.5)	n.s.
Immunological disease	1 (4.3)	2 (5.2)	2 (3.1)	n.s.
Malignancy	0	10 (26.3)	18 (27.7)	<0.05 ^{a,b}
Admission laboratory data				
se-TP (g/L)	76.1 (72.2 - 77.7)	51.7 (47.3 - 57.4)	47.6 (40.3 - 50.3)	<0.05 ^{a,b,c}
se-albumin (g/L)	49.2 (46.9 - 51.1)	34.3 (29.2 - 38.5)	23.4 (19.5 - 27.7)	<0.05 ^{a,b,c}
se-urea (mmol/L)	4.6 (4.0 - 5.5)	4.4 (3.5 - 5.8)	15.1 (9.9 - 24.9)	<0.05 ^{b,c}
se-creatinine (μmol/L)	76 (70 - 86)	73 (62 - 99)	159 (99 - 285)	<0.05 ^{b,c}
se-bilirubin (μmol/L)	11.2 (6.7 - 15.9)	7.3 (5.4 - 14.1)	9.7 (5.1 - 21.9)	n.s.
WBC (G/L)	7.2 (6.4 - 7.9)	14.1 (12.1 - 16.2)	16.4 (10.6 - 22.7)	<0.05 ^{a,b}
PLT (G/L)	262 (249 - 300)	165 (132 - 205)	197 (139 - 301)	<0.05 ^{a,b}
hs-CRP (mg/L)	1.3 (0.6 - 2.5)	102.8 (72.6 - 141.6)	284.2 (172.8 - 382.1)	<0.05 ^{a,b,c}
PCT (ng/mL)	-	0.7 (0.3 - 2.1)	10.9 (4.5 - 48.7)	<0.05 ^c
PSEP (pg/mL)	127 (89.5 - 159)	329 (209.5 - 442.5)	1185 (501 - 3073)	<0.05 ^{a,b,c}
GSN (mg/L)	78.5 (75.1 - 89.1)	34.3 (28.7 - 40.3)	11.2 (6.1 - 20.8)	<0.05 ^{a,b,c}
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	1.7 (1.1 - 2.1)	9.9 (5.5 - 14.3)	105.9 (41.1 - 322.7)	<0.05 ^{a,b,c}
Admission clinical data				
APACHE II score	-	7 (6 - 8)	20 (15 - 24)	<0.05 ^c
SAPS II score	-	20 (17 - 26)	46 (36 - 55)	<0.05 ^c
SOFA score	-	5.5 (3 - 7)	10 (8 - 12)	<0.05 ^c
ICU treatment days	-	2 (1 - 3)	8 (4 - 14)	<0.05 ^c

Continuous variables are shown as median (25th - 75th percentiles) and categorical variables are expressed as a number (percentage). Mann-Whitney U and Chi-square tests were used for data comparison between patient groups. Level of significance was set at $p < 0.05$; n.s.: non-significant. Superscript lowercase letters refer to post-hoc analyses: a: $p < 0.05$ between Control and Non-Sepsis; b: $p < 0.05$ between Control and Sepsis; c: $p < 0.05$ between Non-Sepsis and Sepsis groups.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

250 Abbreviations: TP: total protein; WBC: white blood cell count; PLT: platelet count; hs-CRP: high-
251 sensitivity C-reactive protein; PCT: procalcitonin; PSEP: presepsin; GSN: gelsolin; PSEP:GSN:
252 presepsin:gelsolin ratio; APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score;
253 SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
254 score; ICU: intensive care unit.

255 Septic patients' clinical data

256 Major therapeutic requirements of 65 septic patients were the followings: 54 needed vasopressor
257 support, 48 needed mechanical ventilation, 17 needed oxygen supplementation (median Horowitz
258 quotient: 184 mmHg), 53 needed hydrocortisone supplementation. Mechanically ventilated
259 patients received propofol or dexmedetomidine sedation during the early stage of severe
260 respiratory failure. Furthermore, only 11 septic patients developed liver failure, while also 11
261 septic patients had thrombocytopenia.

262 Septic patients were further divided based on the occurrence of MODS (at least 2 or more vital
263 organ dysfunctions). No considerable difference was found between septic patients without MODS
264 (n=24) and septic patients with MODS (n=41) regarding age, gender, PLT and hs-CRP levels, the
265 cause of admission, the focus of infection, and hydrocortisone supplementation requirement.
266 However, a significant difference ($p<0.05$) was observed between the two patient groups regarding
267 the length of ICU stay, 10-day mortality, the majority of therapeutic requirements (e.g. vasopressor
268 support and mechanical ventilation), clinical prediction scores (APACHE II; SAPS II; SOFA) and
269 most of the laboratory markers including se-albumin, se-creatinine, se-bilirubin, PCT, PSEP and
270 GSN levels along with PSEP:GSN ratios. The most frequent organ dysfunctions between septic
271 patients without MODS and septic patients with MODS were sepsis-induced hypotension (58.3%
272 vs. 97.6%), followed by AKI (37.5% vs. 87.8%) and acute lung injury (20.8% vs. 75.6%).

273 Additional data of septic patients are presented in Table 2, in Table 3 and in “Additional File
 274 1.xlsx” as well.

275 **Table 2. Clinical and laboratory data of septic patients.**

	Sepsis without MODS (n=24)	Sepsis + MODS (n=41)	p value
Age (years)	69 (59 - 79)	66 (56 - 72)	n.s.
Males, n (%)	15 (62.5)	28 (68.3)	n.s.
Major admission laboratory parameters			
se-albumin (g/L)	24.8 (21.5 - 29.1)	22.1 (18.4 - 25.4)	<0.05
se-creatinine (µmol/L)	105 (84 - 155)	196 (149 - 340)	<0.05
se-bilirubin (µmol/L)	5.6 (4.5 - 9.1)	18.8 (7.2 - 38.9)	<0.05
PLT (G/L)	235 (156 - 298)	182 (94 - 312)	n.s.
hs-CRP (mg/L)	273.6 (156.9 - 342.5)	290.2 (194.6 - 389.6)	n.s.
PCT (ng/mL)	7.3 (2.4 - 28.6)	22.3 (6.9 - 59.8)	<0.05
PSEP (pg/mL)	470.5 (354 - 687)	1878 (1071 - 4136)	<0.05
GSN (mg/L)	17.3 (8.4 - 30.9)	10.3 (5.5 - 17.4)	<0.05
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	26.9 (18.2 - 77.1)	182.7 (95.9 - 609.4)	<0.05
pl-lactate (mmol/L)	1.5 (0.8 - 2.1)	2.4 (1.8 - 4.1)	<0.05
Cause of admission			
Internal medicine origin, n (%)	9 (37.5)	8 (19.5)	n.s.
Surgical origin, n (%)	15 (62.5)	33 (80.5)	n.s.
Clinical prognostic parameters			
APACHE II score	14 (11 - 19)	22 (19 - 26)	<0.05
SAPS II score	37 (33 - 43)	51 (45 - 57)	<0.05
SOFA score	8 (6 - 9)	11 (10 - 13)	<0.05
Elevated pl-lactate (>2 mmol/L), n (%)	6 (25.0)	27 (65.9)	<0.05
ICU treatment days	4 (3 - 9)	10 (6 - 15)	<0.05

10-day mortality, death (%)	1 (4.2)	17 (41.5)	<0.05
AKI requiring RRT, n (%)	2 (8.3)	13 (31.7)	<0.05

276 Continuous variables are shown as median (25th - 75th percentiles) and categorical variables are
277 expressed as a number (percentage). Mann-Whitney U and Chi-square tests were performed for
278 data comparison between patient groups. Level of significance was set at p<0.05; n.s.: non-
279 significant. Abbreviations: MODS: multiple organ dysfunction syndrome; PLT: platelet count;
280 PCT: procalcitonin; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; PSEP: presepsin; GSN: gelsolin;
281 PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio; ICU: intensive care unit; AKI: acute kidney injury; RRT:
282 renal replacement therapy; APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score;
283 SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
284 score.

285 **Table 3. Clinical and microbiological data of septic patients.**

	Sepsis without MODS (n=24)	Sepsis + MODS (n=41)	p value
Major therapeutic requirements, n (%)			
Vasopressor support	14 (58.3)	40 (97.6)	<0.05
Oxygen supplementation	13 (54.2)	4 (9.8)	<0.05
Mechanical ventilation	11 (45.8)	37 (90.2)	<0.05
Hydrocortisone supplementation	18 (75.0)	35 (85.4)	n.s.
Focus of infection, n (%)			
Respiratory	5 (20.8)	11 (26.8)	n.s.
Urogenital	4 (16.7)	5 (12.2)	n.s.
Abdominal	7 (29.1)	12 (29.3)	n.s.
Soft tissue/Bones	4 (16.7)	5 (12.2)	n.s.
Mixed	4 (16.7)	8 (19.5)	n.s.
Identified pathogens, n (%)			

Unidentified	13 (54.2)	7 (17.1)	<0.05
Gram-positive bacteria	2 (8.3)	6 (14.6)	n.s.
Gram-negative bacteria	1 (4.2)	6 (14.6)	n.s.
Fungi	2 (8.3)	2 (4.9)	n.s.
Mixed	6 (25.0)	20 (48.8)	<0.05

Categorical variables are expressed as a number (percentage). Chi-square tests were performed for data comparison between patient groups. Level of significance was set at $p < 0.05$; n.s.: non-significant. Abbreviations: MODS: multiple organ dysfunction syndrome.

Monitoring presepsin:gelsolin ratio in control, non-septic and septic patients

A considerable difference was found in PSEP:GSN ratios between the control and non-septic patients at T1 (median: 1.7 vs. 9.9 ng/mg, $p < 0.001$), while septic patients showed significantly higher PSEP:GSN ratios than non-septic patients at T1 (median: 9.9 vs. 105.9 ng/mg, $p < 0.001$) and T3 (median: 9.6 vs. 116.7 ng/mg, $p < 0.001$). There was no significant change in the kinetics of PSEP:GSN ratios during follow-up regarding the non-septic (T1, T3) and septic (T1, T2, T3) patient groups (Fig 1A). The diagnostic performance of first-day PSEP:GSN ratios in sepsis was assessed using ROC analysis. All relevant data of the performed ROC analyses are presented in Table 4 and Table 5. For distinguishing all non-septic patients from septic patients, area under the curve (AUC) value of first-day PSEP:GSN ratio ($p < 0.001$) was found to be equally as good or slightly better than that of SOFA ($p < 0.001$), PCT ($p < 0.001$) and PSEP ($p < 0.001$) (Fig 1B, Table 4).

Figure 1.

Monitoring presepsin:gelsolin ratio in septic non-AKI and sepsis-related AKI patients

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

305 Sepsis-related AKI patients had significantly higher PSEP:GSN ratios than septic non-AKI
306 patients at T1 (median: 43.6 vs. 176.1 ng/mg, $p<0.001$), T2 (median: 27.5 vs. 145.1 ng/mg,
307 $p<0.001$) and T3 (median: 49.5 vs. 185.4 ng/mg, $p<0.05$) as well (Fig 2A). Considerably different
308 PSEP:GSN ratios were found between patients in AKI-1 and AKI-3 stage at T1 (median: 85.8 vs.
309 419.5 ng/mg, $p<0.05$) and T2 (median: 87.6 vs. 308.8 ng/mg, $p<0.05$), while a significant
310 difference was also observed between patients in AKI-2 and AKI-3 stage at T1 (median: 111.1 vs.
311 419.5 ng/mg, $p<0.05$) (Fig 2B). From 20 AKI-3 stage septic patients, 15 (75.0%) patients required
312 some form of RRT: 6 (40.0%) patients received intermittent hemodialysis (IHD) and 9 (60.0%)
313 patients received continuous renal replacement therapy (CRRT). For discerning all sepsis-related
314 AKI patients from septic patients without AKI, AUC values of first-day se-creatinine ($p<0.001$)
315 were superior to PSEP ($p<0.001$), PSEP:GSN ratio ($p<0.001$) and PCT ($p<0.05$) (Fig 2C, Table
316 4). Even better AUC values were calculated when distinguishing first-day septic non-AKI patients
317 from AKI-3 stage septic patients, yet se-creatinine (0.964; $p<0.001$) was still superior to
318 PSEP:GSN ratio (0.915; $p<0.001$).

Figure 2.

Usefulness of presepsin:gelsolin ratio regarding mortality prediction in sepsis

322 PSEP:GSN ratios were significantly lower in survivors compared with non-survivors at T1
323 (median: 80.6 vs. 322.7 ng/mg, $p<0.01$), T2 (median: 88.4 vs. 349.4 ng/mg, $p<0.05$) and T3
324 (median: 56.3 vs. 320.6 ng/mg, $p<0.01$) as well (Fig 3A). Regarding 10-day mortality prediction,
325 AUC values of first-day PSEP:GSN ratio ($p<0.01$) and PSEP ($p<0.05$) were slightly lower
326

327 compared with APACHE II (p<0.001), SAPS II (p<0.01) and SOFA (p<0.01) scores (Fig 3B,
 328 Table 4). AUC values for PCT (0.511) were not statistically significant.

330 **Figure 3.**

332 **Table 4. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of ICU patients.**

Variable	AUC (95% CI)	Standard error*	Sens. (%)	Spec. (%)	Cut-off value	p value
Non-Sepsis (n=38) vs. Sepsis (n=65)						
PSEP (pg/mL)	0.870 (0.803 - 0.937)	0.034	80.0	81.6	479.5	<0.001
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.933 (0.886 - 0.981)	0.024	92.3	81.6	16.3	<0.001
PCT (ng/mL)	0.930 (0.883 - 0.977)	0.024	89.2	81.6	2.35	<0.001
SOFA score	0.933 (0.887 - 0.978)	0.023	83.1	94.7	7.5	<0.001
Septic non-AKI (n=20) vs. Sepsis-related AKI (n=45)						
PSEP (pg/mL)	0.897 (0.820 - 0.974)	0.039	80.0	80.0	705.0	<0.001
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.782 (0.670 - 0.894)	0.057	84.4	65.0	53.6	<0.001
PCT (ng/mL)	0.679 (0.542 - 0.816)	0.071	60.0	60.0	10.1	<0.05
se-creatinine (µmol/L)	0.925 (0.858 - 0.992)	0.034	88.9	90.0	139.5	<0.001
Survivors (n=47) and non-survivors (n=18) in Sepsis (10-day mortality)						
PSEP (pg/mL)	0.683 (0.545 - 0.821)	0.071	72.2	59.6	1186.0	<0.05
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.719 (0.576 - 0.862)	0.073	72.2	70.2	161.2	<0.01
APACHE II score	0.784 (0.659 - 0.908)	0.063	77.8	78.7	21.5	<0.001
SAPS II score	0.778 (0.660 - 0.897)	0.061	72.2	76.6	49.5	<0.01
SOFA score	0.745 (0.619 - 0.827)	0.064	77.8	70.2	10.5	<0.01

333 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of admission laboratory and clinical
 334 parameters for distinguishing non-sepsis from sepsis and septic non-AKI from sepsis-related AKI,
 335 along with predicting 10-day mortality in sepsis. Abbreviations: AUC: area under the curve; 95%

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

336 CI: 95% Confidence interval; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity; ICU: intensive care unit; AKI:
337 acute kidney injury; PSEP: presepsin; PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio; PCT: procalcitonin;
338 APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score; SAPS II: Simplified Acute
339 Physiology Score II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score. *DeLong et al., 1988.

340 **Presepsin:gelsolin ratio in sepsis based on requirements of vasopressor support**

341 In contrast to septic patients with no vasopressor requirement, proportionately higher PSEP:GSN
342 ratios were found in septic patients with lower ($\leq 0.1 \mu\text{g/kg/min}$) and higher ($> 0.1 \mu\text{g/kg/min}$) doses
343 of norepinephrine requirement at T1 (median: 17.4 vs. 70.9 vs. 307.1 ng/mg, $p < 0.001$), T2
344 (median: 16.4 vs. 83.9 vs. 336.1 ng/mg, $p < 0.01$) and T3 (median: 19.1 vs. 54.5 vs. 249.1 ng/mg,
345 $p < 0.001$) (Fig 4A). Thus, patients with septic shock showed significantly increased PSEP:GSN
346 ratios compared with septic patients without septic shock at T1 (median: 59.2 vs. 317.8 ng/mg,
347 $p < 0.001$), T2 (median: 45.9 vs. 349.3 ng/mg, $p < 0.001$) and T3 (median: 53.2 vs. 254.1 ng/mg,
348 $p < 0.001$) (Fig 4B). Furthermore, septic patients needing vasopressor support longer than 5
349 consecutive days had significantly higher PSEP:GSN ratios than septic patients with shorter (≤ 5
350 days) vasopressor requirement at T1 (median: 66.7 vs. 247.4 ng/mg, $p < 0.001$), T2 (median: 54.9
351 vs. 323.1 ng/mg, $p < 0.001$) and T3 (median: 48.9 vs. 243.9 ng/mg, $p < 0.001$) as well (Fig 4C). For
352 distinguishing all patients with septic shock from patients without septic shock, AUC values of
353 first-day PSEP:GSN ratio ($p < 0.001$) were slightly superior to SOFA ($p < 0.001$), PSEP ($p < 0.001$)
354 and PCT ($p < 0.05$) (Fig 4D, Table 5). For discerning septic patients needing shorter (≤ 5 days) and
355 longer (> 5 days) vasopressor support, AUC values of first-day PSEP:GSN ratio ($p < 0.001$) were
356 superior to PSEP ($p < 0.001$) and SOFA ($p < 0.05$), while PCT (0.468) did not satisfy the criteria for
357 statistical significance (Fig 4E, Table 5).

1
2
3
4 359 **Figure 4.**
5
6
7 360

8
9 361 **Presepsin:gelsolin ratio in sepsis based on requirements of respiratory support**

10
11 362 Septic patients needing mechanical ventilation showed significantly increased PSEP:GSN ratios
12
13
14 363 compared with septic patients needing oxygen supplementation at T1 (median: 26.9 vs. 173.2
15
16 364 ng/mg, $p < 0.001$), T2 (median: 30.5 vs. 129.5 ng/mg, $p < 0.001$) and T3 (median: 25.4 vs. 198.5
17
18
19 365 ng/mg, $p < 0.001$) (Fig 5A). In contrast to septic patients with requirement of oxygen
20
21 366 supplementation, considerably higher PSEP:GSN ratios were found in septic patients needing
22
23
24 367 mechanical ventilation, especially if they also had moderate or severe stage ARDS at T1 (median:
25
26 368 26.9 vs. 94.2 vs. 554.8 ng/mg, $p < 0.01$), T2 (median: 30.5 vs. 89.1 vs. 567.3 ng/mg, $p < 0.01$) and
27
28
29 369 T3 (median: 25.4 vs. 58.6 vs. 273.6 ng/mg, $p < 0.01$) (Fig 5B). Furthermore, septic patients needing
30
31 370 mechanical ventilation longer than 5 consecutive days showed significantly higher PSEP:GSN
32
33
34 371 ratios than septic patients with shorter (≤ 5 days) mechanical ventilation requirement at T1 (median:
35
36 372 63.2 vs. 230.4 ng/mg, $p < 0.01$), T2 (median: 30.9 vs. 284.2 ng/mg, $p < 0.001$) and T3 (median: 39.2
37
38 373 vs. 241.5 ng/mg, $p < 0.001$) as well (Fig 5C). For distinguishing all patients needing oxygen
39
40
41 374 supplementation from patients needing mechanical ventilation, AUC values of first-day
42
43 375 PSEP:GSN ratio ($p < 0.001$) were slightly superior to SOFA ($p < 0.01$) and PSEP ($p < 0.05$), while
44
45
46 376 PCT (0.488) did not satisfy the criteria for statistical significance (Fig 5D, Table 5). For discerning
47
48 377 all septic patients needing shorter (≤ 5 days) and longer (> 5 days) mechanical ventilation, AUC
49
50
51 378 values of first-day PSEP:GSN ratio ($p < 0.01$) were superior to PSEP ($p < 0.01$) and SOFA ($p < 0.05$),
52
53 379 while PCT (0.480) did not satisfy the criteria for statistical significance (Fig 5E, Table 5).
54
55
56 380

57
58 381 **Figure 5.**
59
60
61
62
63
64
65

382

383 **Table 5. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of septic patients.**

Variable	AUC (95% CI)	Standard error*	Sens. (%)	Spec. (%)	Cut-off value	p value
Sepsis (n=38) vs. Septic shock (n=27)						
PSEP (pg/mL)	0.757 (0.638 - 0.877)	0.061	66.7	76.3	1618.5	<0.001
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.824 (0.720 - 0.927)	0.053	70.4	78.9	161.2	<0.001
PCT (ng/mL)	0.646 (0.513 - 0.779)	0.068	66.7	55.3	10.1	<0.05
SOFA score	0.818 (0.715 - 0.920)	0.052	70.4	76.3	10.5	<0.001
Shorter (≤ 5 days) (n=25) vs. longer (> 5 days) (n=29) vasopressor support in sepsis						
PSEP (pg/mL)	0.789 (0.666 - 0.912)	0.063	75.9	80.0	1618.5	<0.001
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.821 (0.705 - 0.937)	0.059	93.1	68.0	91.7	<0.001
SOFA score	0.698 (0.546 - 0.850)	0.077	89.7	56.0	9.5	<0.05
Oxygen supplementation (n=17) vs. mechanical ventilation (n=48) requirement in sepsis						
PSEP (pg/mL)	0.701 (0.570 - 0.832)	0.067	66.7	70.6	982.5	<0.05
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.814 (0.699 - 0.929)	0.059	72.9	70.6	68.8	<0.001
SOFA score	0.763 (0.612 - 0.914)	0.077	70.8	76.5	9.5	<0.01
Shorter (≤ 5 days) (n=17) vs. longer (> 5 days) (n=31) mechanical ventilation requirement in sepsis						
PSEP (pg/mL)	0.778 (0.635 - 0.921)	0.073	83.9	64.7	884.5	<0.01
PSEP:GSN ratio (ng/mg)	0.793 (0.655 - 0.931)	0.071	83.9	70.6	94.2	<0.01
SOFA score	0.712 (0.529 - 0.895)	0.093	87.1	58.8	9.5	<0.05

384 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of admission laboratory and clinical
385 parameters for distinguishing sepsis from septic shock along with differentiating shorter (≤ 5 days)
386 from longer (> 5 days) requirement of vasopressor support, while also discerning septic patients'
387 requirement of oxygen supplementation from mechanical ventilation and their shorter (≤ 5 days)
388 or longer (> 5 days) requirement of mechanical ventilation. Abbreviations: AUC: area under the
389 curve; 95% CI: 95% Confidence interval; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity; PSEP: presepsin;

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

390 PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio; PCT: procalcitonin; SOFA: Sequential Organ Failure
391 Assessment score. *DeLong et al., 1988.

392 **Correlations**

393 Quantitative data from all sample collection time points were used for calculating correlations.
394 PSEP:GSN ratio showed strong correlation ($p < 0.001$) with PSEP ($\rho = 0.924$). Moderate correlations
395 ($p < 0.001$) were found between PSEP:GSN ratio and se-urea ($\rho = 0.720$), se-creatinine ($\rho = 0.611$),
396 hs-CRP ($\rho = 0.573$), PCT ($\rho = 0.576$) and WBC ($\rho = 0.452$), along with APACHE II ($\rho = 0.759$), SAPS
397 II ($\rho = 0.743$) and SOFA ($\rho = 0.741$) clinical scores. PSEP:GSN ratio showed negative correlations
398 ($p < 0.001$) with se-TP ($\rho = -0.439$), se-albumin ($\rho = -0.667$), and GSN ($\rho = -0.853$). No further
399 associations were observed with other inflammatory or clinical parameters.

400 **Discussion**

401 The early diagnosis and effective therapy of sepsis are essential for a successful recovery.
402 However, the currently used biomarkers (hs-CRP, PCT) show several diagnostic and prognostic
403 limitations, hence a multi-marker approach including novel biomarkers may contribute to
404 achieving a more favorable outcome [8-10].

405 One of the main focuses of our study was to describe the time course of PSEP:GSN ratio among
406 non-septic and septic patients. Compared with controls, significantly elevated PSEP:GSN ratios
407 were found in non-septic and septic patients. First-day PSEP:GSN ratios showed good
408 performance compared with SOFA score, PCT and PSEP levels regarding the diagnosis of sepsis.
409 Compared with septic non-AKI patients, PSEP:GSN ratios were even higher in sepsis-related AKI
410 patients, especially in AKI-3 stage septic patients needing RRT. This tendency was the same when
411 investigating PSEP levels among control, non-septic and septic patients. In accordance with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

412 previous studies, our results show a similarly increasing tendency of PSEP levels in sepsis and in
413 sepsis-related AKI [21-28].

414 However, first-day se-creatinine had better performance than PSEP and PSEP:GSN ratio in the
415 diagnosis of sepsis-related AKI. As se-creatinine only reflects the decreased glomerular filtration
416 rate, our results suggest that PSEP:GSN ratio provides a more complex information regarding the
417 patients condition and the overall organ dysfunction during sepsis. To the best of our knowledge,
418 this is the first study to examine PSEP:GSN ratio in sepsis, therefore we did not have any other
419 study for reference in this field. Additional investigation with increased case numbers may clarify
420 the usefulness of PSEP:GSN ratio regarding the diagnosis of sepsis-related AKI.

421 There is a growing body of evidence indicating the further increase of PSEP levels as kidney
422 function decreases [27-29, 54]. Like several other inflammatory markers (e.g. IL-6, PCT), PSEP
423 also does not bind to carrier proteins in the circulation, thus it can be removed from the circulation
424 by different forms of RRT [28, 31-33]. Based on our results, a slightly decreasing tendency of
425 PSEP:GSN ratio was observed during follow-up in sepsis-related AKI patients needing RRT. We
426 are aware of the evidence that these procedures can effectively reduce the blood concentrations of
427 numerous inflammatory markers, thereby potentially causing falsely low biomarker levels during
428 RRT, thus limiting the prognostic value of these molecules in sepsis-related AKI [28, 30, 33].

429 Regarding sepsis-related hemodynamic instability, increasing PSEP:GSN ratios were in good
430 agreement with the dosage and the duration of vasopressor requirement in septic patients.
431 Moreover, PSEP:GSN ratios were also significantly higher in patients with septic shock than in
432 septic patients without shock. First-day PSEP:GSN ratios also showed superior performance
433 compared with SOFA score and PSEP levels regarding the diagnosis of septic shock and the length
434 of vasopressor requirement in sepsis. Regarding sepsis-related respiratory insufficiency,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

435 considerably elevated PSEP:GSN ratios were observed in patients needing mechanical ventilation
436 compared with patients needing oxygen supplementation. This increase was even more explicit in
437 mechanically ventilated patients with moderate ARDS, while higher PSEP:GSN ratios were also
438 associated with prolonged mechanical ventilation requirement in septic patients. First-day
439 PSEP:GSN ratios showed better performance than SOFA score and PSEP levels regarding the
440 requirement and duration of mechanical ventilation in sepsis. Our results suggest that PSEP:GSN
441 ratio could be a useful marker besides the routinely used SOFA score concerning the more accurate
442 assessment of hemodynamic and respiratory insufficiency in septic patients [6, 7].

443 Moderate correlations were observed between PSEP:GSN ratio and the conventional inflammatory
444 markers (hs-CRP, PCT). Regarding 10-day mortality data, PSEP:GSN ratios were considerably
445 elevated in non-survivors compared with survivors during follow-up, while the prognostic
446 performance of PSEP:GSN ratio was similar to widely used clinical scores (APACHE II, SAPS
447 II, SOFA). These results suggest that PSEP:GSN ratio could also be a useful marker regarding the
448 short-term mortality prediction of sepsis, yet the prognostic performance of PSEP levels was
449 markedly inferior compared with the conventional clinical prognostic scores. Therefore, our results
450 somewhat contradict the data available from several larger multi-center studies indicating better
451 performance of PSEP levels regarding mortality prediction [21-23, 26, 36].

452 As albumin has a variety of essential physiological functions in the circulation (e.g. maintaining
453 the plasma oncotic pressure, providing buffer capacity, transporting substances, scavenging free
454 radicals), decreasing albumin levels are often associated with malnutrition or inflammation.
455 Elevated CRP:albumin ratios, PCT:albumin ratios and Presepsin:albumin ratios – found mostly
456 due to hypoalbuminemia and increased inflammatory marker levels – were detected in several
457 catabolic conditions including sepsis, sepsis-related AKI, pancreatitis, coronary artery disease and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

458 different types of malignancies [34-41]. Since GSN also has a protective role by being an actin
459 scavenger protein, several studies reported decreasing serum GSN concentrations in various
460 clinical conditions (e.g. trauma, acute liver failure, myocardial infarction, sepsis) [45-47]. Our
461 previous study showed that the increase of serum actin was inversely proportional to the amounts
462 of GSN in the circulation which was associated with increased mortality rate [48]. As a result, we
463 also found significantly elevated PSEP:GSN ratios in septic patients, especially in sepsis-related
464 organ dysfunctions (AKI, hemodynamic instability, respiratory insufficiency, MODS).
465 Our study has several limitations. As far as we know, PSEP:GSN ratio was not investigated before
466 in sepsis, thus we aimed to be the first to explore this interesting field by conducting a small sample
467 size pilot study. We had limited capacities for consecutive patient recruitment, since our study was
468 performed as a single center study (16 bedded central ICU). Septic patients with severe organ
469 dysfunction were more frequently admitted to our ICU being a regional center for critical care.
470 Different sample sizes between control, non-septic and septic patient groups might reduce the
471 power of comparison, yet non-parametric tests (e.g. Mann-Whitney U test) could be used well with
472 unequal sample sizes. We are aware of the concern that outpatients are a difficult control group
473 for ICU patients, yet we aimed to establish a reference range for PSEP:GSN ratios in patients
474 without inflammation.

475 In the future, we should increase the number of critically ill patients due to the heterogeneity of
476 sepsis while also extending the sample collection period to 5-10 days in order to draw more
477 accurate conclusions. As there are no commercially available rapid diagnostic kits for GSN
478 quantification, the development of an efficient Point of Care test would facilitate the prompt
479 determination of PSEP:GSN ratio in routine clinical practice.

480 **Conclusions**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

481 The present study demonstrated the diagnostic and prognostic utility of PSEP:GSN levels among
482 control, non-septic and septic patients while also investigating the latter group based on the
483 occurrence of sepsis-related organ dysfunctions including AKI, hemodynamic instability,
484 respiratory insufficiency and MODS. Its diagnostic performance was superior in differentiating
485 oxygen supplementation vs. mechanical ventilation requirement and sepsis vs. septic shock
486 compared to other routinely used markers and scores (e.g. PSEP, PCT, SOFA) among septic
487 patients. Furthermore, its prognostic ability was also good regarding the length of vasopressor and
488 mechanical ventilation requirement in sepsis which could help clinicians in the more accurate
489 assessment of the patients' condition. PSEP:GSN ratio could yield valuable information regarding
490 the extent of inflammation and the simultaneous depletion of the patient's scavenger capacity
491 during sepsis. Further investigations with extended sampling periods and larger study populations
492 are warranted to clarify the importance of PSEP:GSN ratio in sepsis.

493 Declarations

494 **Ethics approval and consent to participate:** The study complied with the 7th revision of the
495 Helsinki Declarations (2013) and was approved by the Regional Research Ethics Committee of
496 the University of Pécs (no. 4327.316-2900/KK15/2011). The study protocol was registered
497 retrospectively at ClinicalTrials.gov (NCT05060679). Written informed consent was obtained
498 from all patients or their next-of-kin for the acquisition of blood samples and the inclusion of their
499 medical and treatment history within this work.

500 **Consent for publication:** Not applicable.

501 **Availability of data and materials:** All data generated or analyzed during this study are included
502 in this published article and its supplementary information files (See tables/figures in the Results
503 section and "Additional File 1.xlsx").

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

504 **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

505 **Funding:** The present research was funded by the 2020-4.1.1.-TKP2020 project (Thematic
506 Excellence Program 2020 - National Excellence Subprogram of the Hungarian Ministry for
507 Innovation and Technology) and partially by the Human Reproduction National Laboratory as part
508 of the “Establishment of National Laboratories 2020” program. This work was also supported by
509 the EFOP 3.6.1-16-2016-00004 project (Comprehensive Development for Implementing Smart
510 Specialization Strategies) of the University of Pécs, Hungary. Zoltán Horváth-Szalai was
511 supported by the University of Pécs, Medical School, Hungary grant (KA-2019-36). The funding
512 organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of
513 data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

514 **Authors’ contributions:** DR took responsibility for sample and data analysis along with drafting
515 the manuscript. PK was responsible for conceptualization and study design. ZH-Sz and BSz
516 participated in sample and data collection while providing assistance during blood sample analysis.
517 AM, GW, DM and TK were responsible for funding acquisition, approving data analysis and
518 revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

519 **Acknowledgements:** We express our special thanks for the invaluable help of the nurses and the
520 colleagues from every participating institute.

521 **Authors’ information:** ¹Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Medical
522 School, Ifjúság u. 13, H-7624 Pécs, Hungary. ²Department of Anesthesiology and Intensive
523 Therapy, University of Pécs, Medical School, Ifjúság u. 13, H-7624 Pécs, Hungary. ³János
524 Szentágothai Research Center, University of Pécs, Ifjúság u. 20, H-7624 Pécs, Hungary.

525 ⁴Department of Anesthesia, Intensive Care and Pain Medicine, Klinik Ottakring, Montleartstraße

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

526 37, A-1160 Vienna, Austria. ⁵Human Reproduction National Laboratory, University of Pécs,
527 Pécs, Hungary, Ifjúság u. 20, H-7624 Pécs, Hungary.

528 **Abbreviations**

529 ICU: intensive care unit; APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score;
530 SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
531 score; SSC: Surviving Sepsis Campaign; MODS: multiple organ dysfunction syndrome; ARDS:
532 acute respiratory distress syndrome; AKI: acute kidney injury; RRT: renal replacement therapy;
533 KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive
534 protein; PCT: procalcitonin; PSEP: presepsin; GSN: gelsolin; PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio.

535 **Supplementary information**

- 536 • **“Additional File 1.xlsx” – The anonymous dataset of 126 patients.** Additional clinical,
537 demographic and laboratory data of control, non-septic and septic patients.
- 538 • **“STROBE checklist.docx” – The completed version of STROBE checklist regarding this**
539 manuscript for reporting observational studies.

540 **References**

541 1. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global,
542 regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden
543 of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200-11.

544 2. Rhee C, Jones TM, Hamad Y, Pande A, Varon J, O'Brien C, et al. Prevalence,
545 Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care
546 Hospitals. *JAMA network open*. 2019;2(2):e187571.

547 3. Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Qu W, Georgescu C, et al. Epidemiology of severe
548 sepsis: 2008-2012. *Journal of critical care*. 2016;31(1):58-62.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *Jama*. 2017;318(13):1241-9.

5. Meyer N, Harhay MO, Small DS, Prescott HC, Bowles KH, Gaieski DF, et al. Temporal Trends in Incidence, Sepsis-Related Mortality, and Hospital-Based Acute Care After Sepsis. *Critical care medicine*. 2018;46(3):354-60.

6. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.

7. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive care medicine*. 2017;43(3):304-77.

8. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Critical care*. 2020;24(1):287.

9. Larsen FF, Petersen JA. Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *European journal of internal medicine*. 2017;45:46-50.

10. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2013;50(1):23-36.

11. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Critical care (London, England)*. 2019;23(1):374-.

12. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama*. 2005;294(7):813-8.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

572 13. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney
573 injury in sepsis. *Intensive care medicine*. 2017;43(6):816-28.

574 14. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet*. 2019;394(10212):1949-
575 64.

576 15. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work
577 Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International*
578 *Supplements*. 2012;2(1):1-138.

579 16. Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, et al. Evaluation of a
580 newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *Journal of infection and*
581 *chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2005;11(5):234-8.

582 17. Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Takahashi T, Furusako S. Presepsin (sCD14-ST):
583 development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of
584 presepsin in septic patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2011;49(5):937-9.

585 18. Nakamura M, Takeuchi T, Naito K, Shirakawa K, Hosaka Y, Yamasaki F, et al. Early
586 elevation of plasma soluble CD14 subtype, a novel biomarker for sepsis, in a rabbit cecal ligation
587 and puncture model. *Critical care*. 2008;12(2):P194.

588 19. Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Nakamura M, Takeuchi T, Hosaka Y, et al. The new
589 sepsis marker, sCD14-ST, induction mechanism in the rabbit sepsis models. *Critical care*.
590 2010;14(2):P19.

591 20. Gilbert DN. Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology.
592 *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(7):2325-9.

593 21. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S. Usefulness
594 of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2011;17(6):764-9.

22. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2012;18(6):891-7.

23. Ulla M, Pizzolato E, Lucchiari M, Loiacono M, Soardo F, Forno D, et al. Diagnostic and prognostic value of presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study. *Critical care*. 2013;17(4):R168.

24. Zhang X, Liu D, Liu Y-N, Wang R, Xie L-X. The accuracy of presepsin (sCD14-ST) for the diagnosis of sepsis in adults: a meta-analysis. *Critical care*. 2015;19(1):323.

25. Wu CC, Lan HM, Han ST, Chaou CH, Yeh CF, Liu SH, et al. Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis. *Annals of intensive care*. 2017;7(1):91.

26. Velissaris D, Zareifopoulos N, Karamouzou V, Karanikolas E, Pierrakos C, Koniari I, et al. Presepsin as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Sepsis. *Cureus*. 2021;13(5):e15019.

27. Nakamura Y, Ishikura H, Nishida T, Kawano Y, Yuge R, Ichiki R, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in patients with or without acute kidney injury. *BMC Anesthesiology*. 2014;14(1):88.

28. Nagata T, Yasuda Y, Ando M, Abe T, Katsuno T, Kato S, et al. Clinical impact of kidney function on presepsin levels. *PloS one*. 2015;10(6):e0129159.

29. Takahashi G, Shibata S, Fukui Y, Okamura Y, Inoue Y. Diagnostic accuracy of procalcitonin and presepsin for infectious disease in patients with acute kidney injury. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016;86(2):205-10.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

618 30. Honore PM, Jacobs R, Hendrickx I, De Waele E, Van Gorp V, Spapen HD. Presepsin
619 and sepsis-induced acute kidney injury treated with continuous renal replacement therapy: will
620 another promising biomarker bite the dust? *Critical care*. 2015;19:428.

621 31. Miyoshi M, Inoue Y, Nishioka M, Ikegame A, Nakao T, Kishi S, et al. Clinical
622 evaluation of presepsin considering renal function. *PloS one*. 2019;14(9):e0215791.

623 32. Nakamura Y, Hoshino K, Kiyomi F, Kawano Y, Mizunuma M, Tanaka J, et al.
624 Comparison of accuracy of presepsin and procalcitonin concentrations in diagnosing sepsis in
625 patients with and without acute kidney injury. *Clinica chimica acta; international journal of*
626 *clinical chemistry*. 2019;490:200-6.

627 33. Shimoyama Y, Umegaki O, Kadono N, Minami T. Presepsin and prognostic nutritional
628 index are predictors of septic acute kidney injury, renal replacement therapy initiation in sepsis
629 patients, and prognosis in septic acute kidney injury patients: a pilot study. *BMC nephrology*.
630 2021;22(1):219.

631 34. Ranzani OT, Zampieri FG, Forte DN, Azevedo LCP, Park M. C-Reactive
632 Protein/Albumin Ratio Predicts 90-Day Mortality of Septic Patients. *PloS one*.
633 2013;8(3):e59321.

634 35. Chen L, Wu X, Qin H, Zhu H. The PCT to Albumin Ratio Predicts Mortality in Patients
635 With Acute Kidney Injury Caused by Abdominal Infection-Evoked Sepsis. *Frontiers in*
636 *Nutrition*. 2021;8(179).

637 36. Kaplan M, Duzenli T, Tanoglu A, Cakir Guney B, Onal Tastan Y, Bicer HS.
638 Presepsin:albumin ratio and C-reactive protein:albumin ratio as novel sepsis-based prognostic
639 scores : A retrospective study. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2020;132(7-8):182-7.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

640 37. Deng TB, Zhang J, Zhou YZ, Li WM. The prognostic value of C-reactive protein to
641 albumin ratio in patients with lung cancer. *Medicine*. 2018;97(50):e13505.

642 38. Kaplan M, Ates I, Akpınar MY, Yuksel M, Kuzu UB, Kacar S, et al. Predictive value of
643 C-reactive protein/albumin ratio in acute pancreatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases
644 international : HBPD INT*. 2017;16(4):424-30.

645 39. Karabag Y, Cagdas M, Rencuzogullari I, Karakoyun S, Artac I, Ilis D, et al. Relationship
646 between C-reactive protein/albumin ratio and coronary artery disease severity in patients with
647 stable angina pectoris. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2018;32(7):e22457.

648 40. Miyamoto T, Fujitani M, Fukuyama H, Hatanaka S, Koizumi Y, Kawabata A. The C-
649 Reactive Protein/Albumin Ratio Is Useful for Predicting Short-Term Survival in Cancer and
650 Noncancer Patients. *Journal of palliative medicine*. 2019;22(5):532-7.

651 41. Zang Y, Fan Y, Gao Z. Pretreatment C-reactive protein/albumin ratio for predicting
652 overall survival in pancreatic cancer: A meta-analysis. *Medicine*. 2020;99(23):e20595.

653 42. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *The
654 New England journal of medicine*. 1992;326(20):1335-41.

655 43. Maiti S, Bamburg JR. Actin-Capping and -Severing Proteins. In: Lennarz WJ, Lane MD,
656 editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Waltham: Academic Press;
657 2013. p. 18-26.

658 44. Krebs J. Calcium | Calcium-Binding Proteins: Cytosolic (Annexins, Gelsolins, and C2-
659 Domain Proteins)☆. In: Jez J, editor. *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*.
660 Oxford: Elsevier; 2021. p. 621-9.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

661 45. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute
662 liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Critical care medicine*.
663 1997;25(4):594-8.

664 46. Dahl B, Schiodt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is
665 reduced in trauma patients. *Shock*. 1999;12(2):102-4.

666 47. Lee PS, Patel SR, Christiani DC, Bajwa E, Stossel TP, Waxman AB. Plasma gelsolin
667 depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PloS one*. 2008;3(11):e3712.

668 48. Horvath-Szalai Z, Kustan P, Muhl D, Ludany A, Bugyi B, Koszegi T. Antagonistic sepsis
669 markers: Serum gelsolin and actin/gelsolin ratio. *Clinical biochemistry*. 2017;50(3):127-33.

670 49. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update.
671 *Intensive care medicine*. 2018;44(6):925-8.

672 50. Force* TADT. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *Jama*.
673 2012;307(23):2526-33.

674 51. Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, Lakatos A, Christensen PH, Huber T, et al.
675 Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible
676 clinical utility in sepsis. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2018;32(3).

677 52. Horvath-Szalai Z, Kustan P, Szirmay B, Lakatos A, Christensen PH, Huber T, et al.
678 Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study. *Clinical chemistry*
679 *and laboratory medicine*. 2018;56(8):1373-82.

680 53. Okamura Y, Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of
681 presepsin (sCD14-ST). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*.
682 2011;412(23-24):2157-61.

1
2
3
4 683 54. Chenevier-Gobeaux C, Trabattoni E, Roelens M, Borderie D, Claessens Y-E. Presepsin
5
6 684 (sCD14-ST) in emergency department: The need for adapted threshold values? Clinica Chimica
7
8
9 685 Acta. 2014;427:34-6.

10
11 686

12
13
14
15 687 **Figure legends:**

16
17 688 **Figure 1. PSEP:GSN ratio in control, non-septic and septic patients.** PSEP:GSN ratios of
18
19 689 control, non-septic and septic patients during follow-up (A). Receiver operating characteristic
20
21 690 (ROC) curves of admission laboratory parameters for distinguishing non-sepsis from sepsis (B).
22
23
24 691 Time points: T1: within 12h after admission; T2: second day; T3: third day; Abbreviations: PSEP:
25
26 692 presepsin; PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio; PCT: procalcitonin; SOFA: Sequential Organ
27
28
29 693 Failure Assessment score. n: sample number. n.s.: not significant. ***p<0.001.

30
31
32 694 **Figure 2. PSEP:GSN ratio in sepsis-related AKI.** PSEP:GSN ratios of septic non-AKI and
33
34 695 sepsis-related AKI patients (A) during follow-up. PSEP:GSN ratios of the individual sepsis-related
35
36 696 AKI stages (B) during follow-up. Receiver operating characteristic (ROC) curves of admission
37
38
39 697 laboratory parameters for distinguishing septic non-AKI from sepsis-related AKI state (B).
40
41 698 Abbreviations: AKI: acute kidney injury; PSEP: presepsin; PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio;
42
43
44 699 PCT: procalcitonin. Time points: T1: within 12h after admission; T2: second day; T3: third day.
45
46 700 n: sample number. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

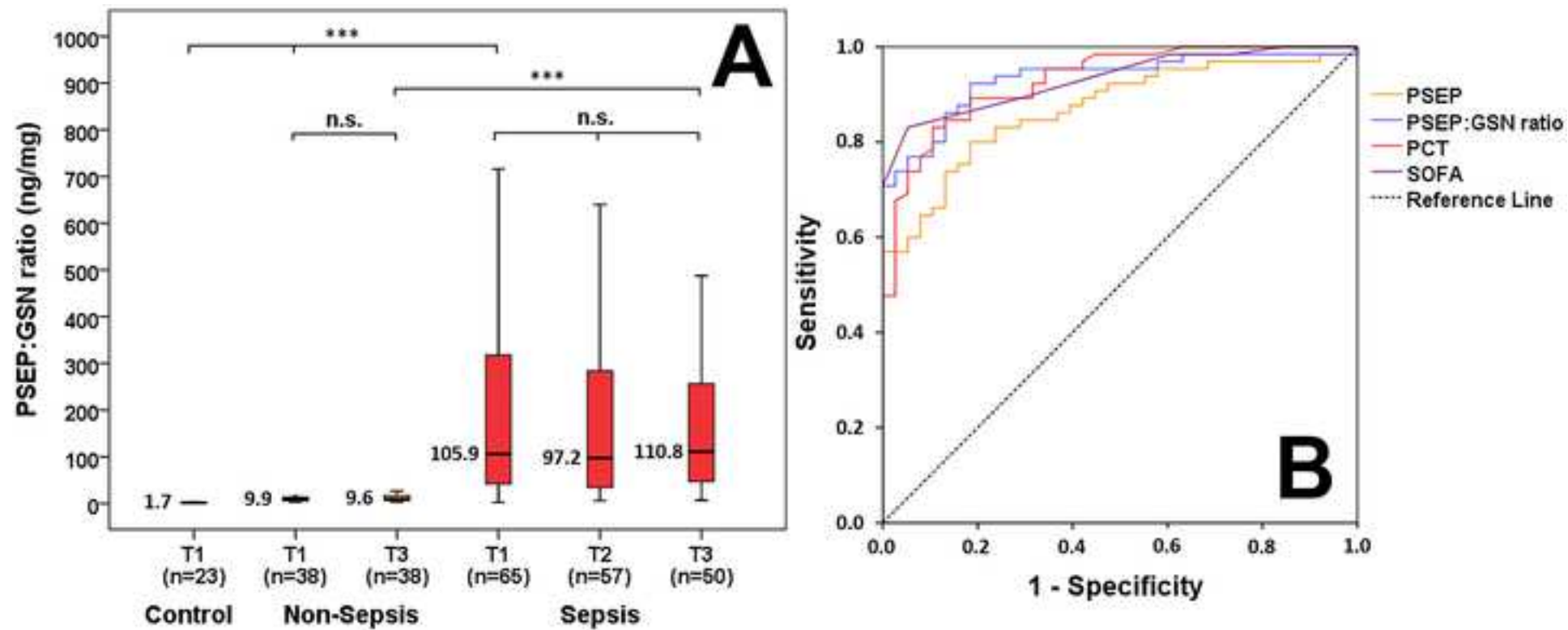
47
48
49 701 **Figure 3. Survival data and predictive power of PSEP:GSN ratio.** PSEP:GSN ratio in survivor
50
51 702 and in non-survivor septic patients based on 10-day mortality during follow-up (A). Receiver
52
53 703 operating characteristic (ROC) curves of admission parameters for predicting 10-day mortality in
54
55
56 704 sepsis (B). Time points: T1: within 12h after admission; T2: second day; T3: third day;
57
58
59 705 Abbreviations: PSEP: presepsin; PSEP:GSN: presepsin:gelsolin ratio; APACHE II: Acute

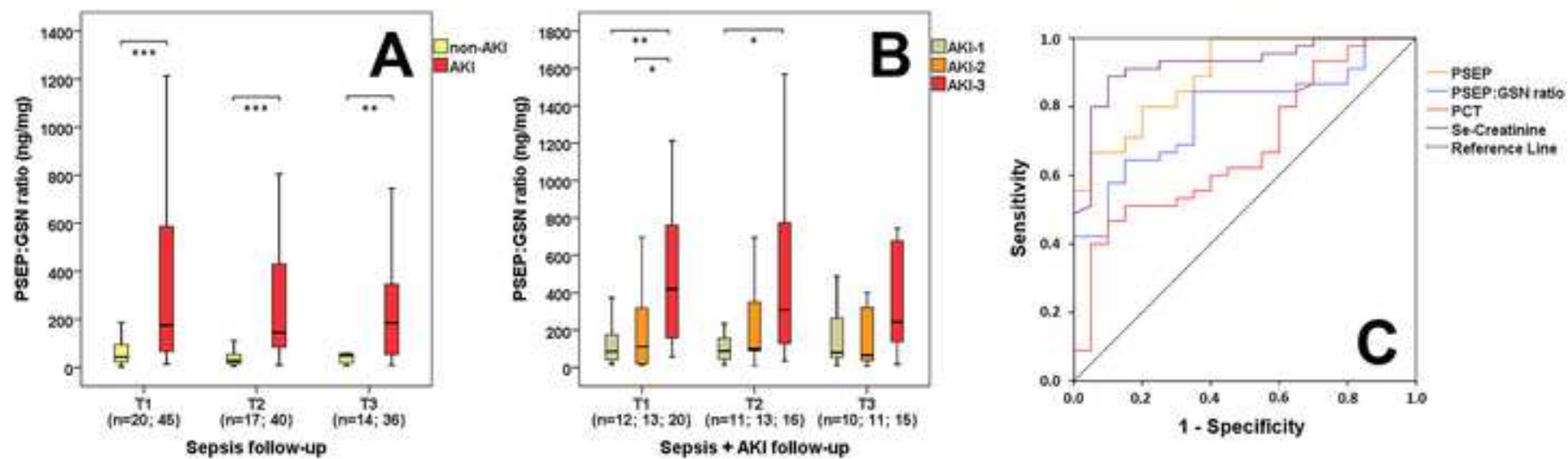
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

706 Physiology and Chronic Health Evaluation II score; SAPS II: Simplified Acute Physiology Score
707 II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score. n: sample number. *p<0.05; **p<0.01.

708 **Figure 4. PSEP:GSN ratio in septic patients based on vasopressor requirement.** PSEP:GSN
709 ratios of septic patients with different doses of vasopressor requirement during follow-up (A).
710 PSEP:GSN ratios of patients with sepsis and septic shock (B) during follow-up. PSEP:GSN ratios
711 of septic patients needing shorter (≤ 5 days) and longer (> 5 days) vasopressor support during
712 follow-up (C). Receiver operating characteristic (ROC) curves of admission parameters for
713 distinguishing sepsis from septic shock (D) along with discerning septic patients' shorter (≤ 5 days)
714 and longer (> 5 days) vasopressor requirement (E). Time points: T1: within 12h after admission;
715 T2: second day; T3: third day; Abbreviations: NE: norepinephrine; PSEP: presepsin; PSEP:GSN:
716 presepsin:gelsolin ratio; PCT: procalcitonin; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score.
717 n: sample number. n.s.: not significant. **p<0.01; ***p<0.001.

718 **Figure 5. PSEP:GSN ratio in septic patients based on requirements of respiratory support.**
719 PSEP:GSN ratios of septic patients with requirements of oxygen supplementation and mechanical
720 ventilation (A), with the latter group having ARDS (B) during follow-up. PSEP:GSN ratios of
721 septic patients having shorter (≤ 5 days) and longer (> 5 days) requirement of mechanical ventilation
722 during follow-up (C). Receiver operating characteristic (ROC) curves of admission parameters for
723 distinguishing septic patients needing oxygen supplementation from mechanical ventilation (D)
724 along with discerning septic patients' shorter (≤ 5 days) and longer (> 5 days) requirement of
725 mechanical ventilation (E). Time points: T1: within 12h after admission; T2: second day; T3: third
726 day; Abbreviations: ARDS: acute respiratory distress syndrome; PSEP: presepsin; PSEP:GSN:
727 presepsin:gelsolin ratio; PCT: procalcitonin; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score.
728 n: sample number. n.s.: not significant. **p<0.01; ***p<0.001.





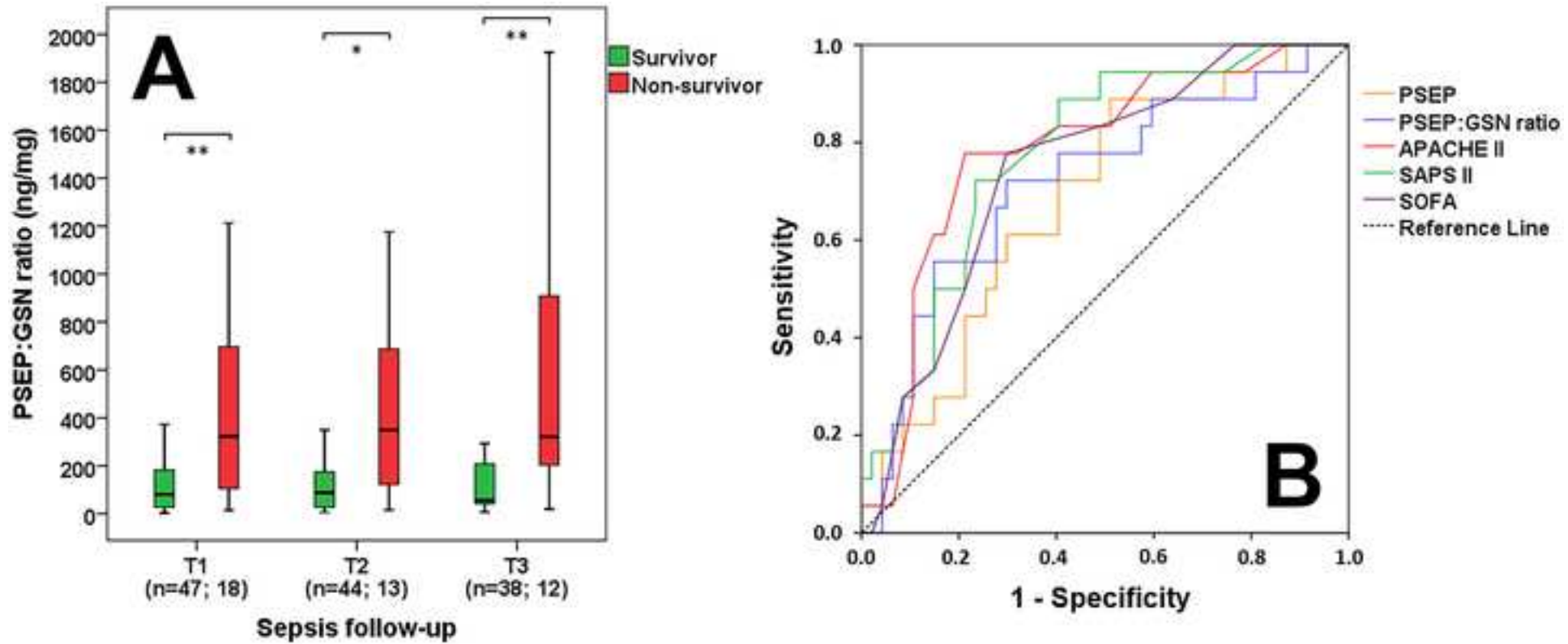
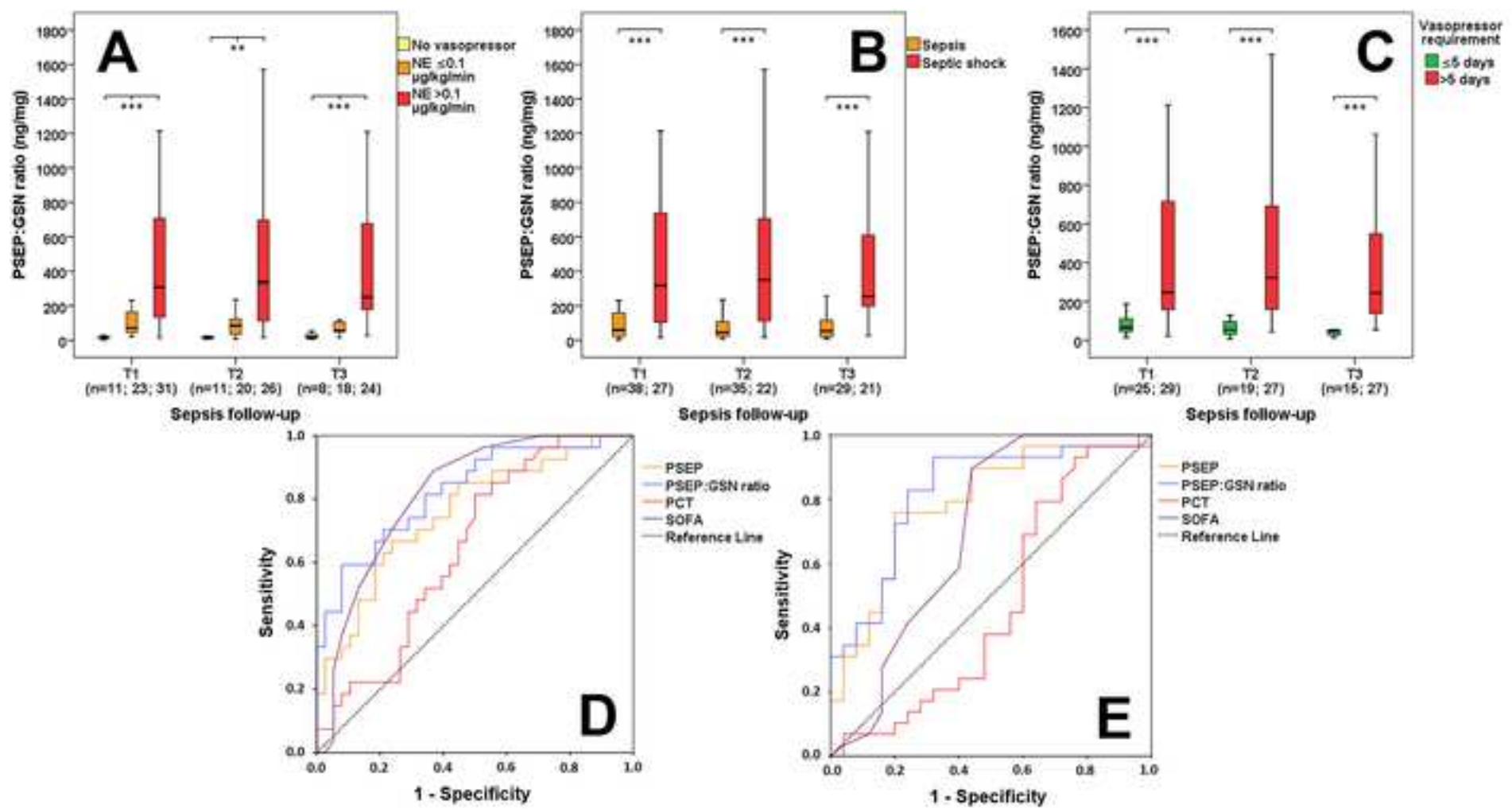
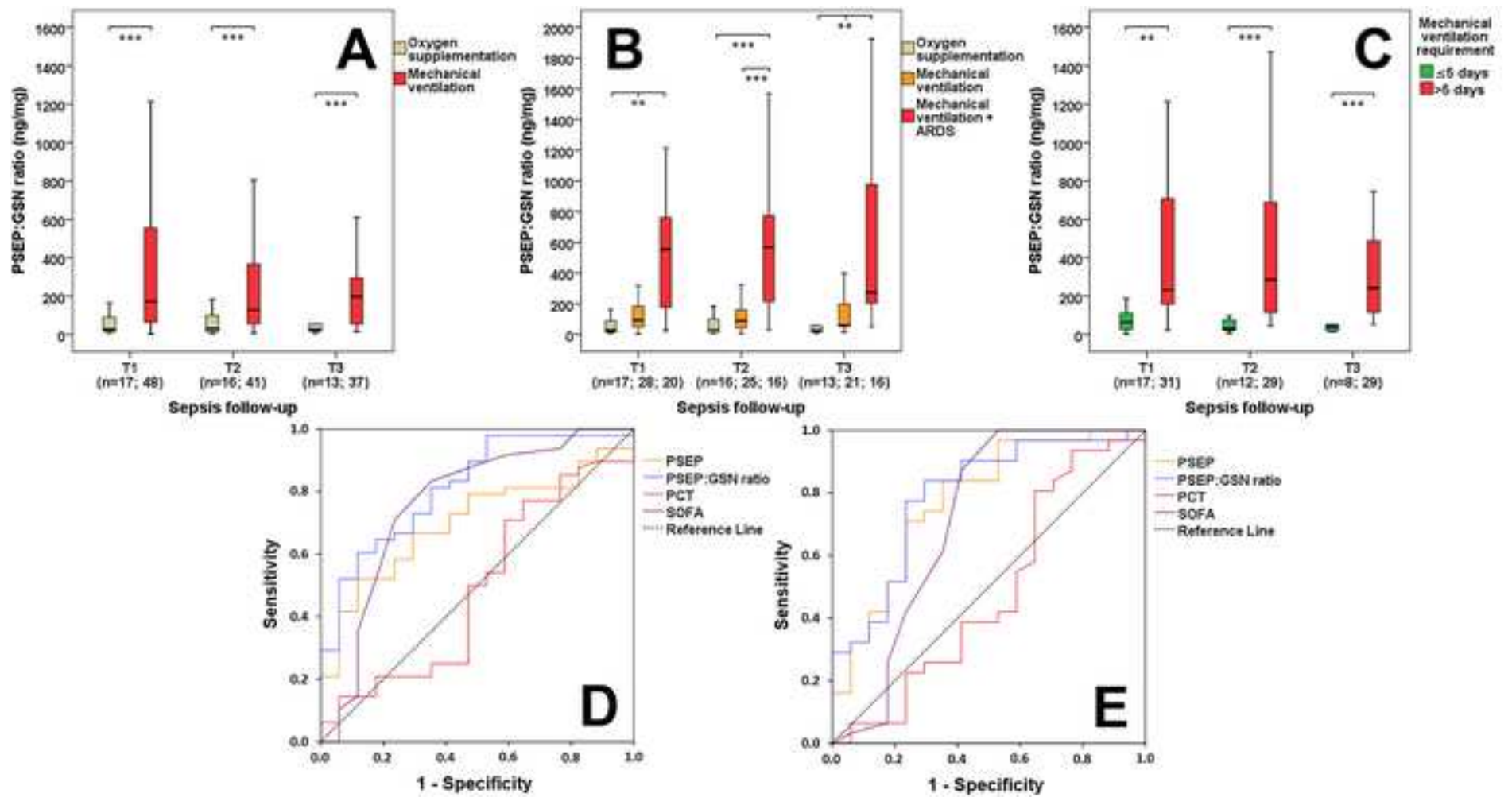
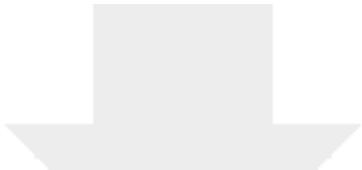



Figure 4








Click here to access/download
Supplementary Material
Additional File 1.xlsx





Click here to access/download
Supplementary Material
STROBE checklist.docx

