

Biomarkerek jelentősége a szepsziszhez társuló szervelégtelenségek diagnosztikájában és kimenetelében

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

I. Bevezetés

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. Először 1992-ben alkották meg az egységes Szepszis-1, majd 2001-ben a Szepszis-2 definíciókat, melyek a szervezetben zajló fertőzés miatt kialakuló ún. szisztémás gyulladással válaszreakció szindróma (SIRS) meglétére alapozták a szepszis diagnózisát. A 2016-ban frissített, és azóta is használatos Szepszis-3 definíciók viszont már az ún. Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score alapján a fertőzéshez társuló szervi diszfunkciók kialakulására helyezik a hangsúlyt a kórkép korai felismerése érdekében.

A szepszis korai diagnózisában – a szervezetben zajló gyulladást kiváltó infekció mikrobiológiai vizsgálatokkal történő megerősítéséig – a klinikai kép és a SOFA score használata mellett bizonyos laboratóriumi paraméterek (fehérvérsejtszám, nagy érzékenységű C-reaktív protein (hs-CRP), procalcitonin (PCT)) monitorozása nyújthat segítséget. A szepszis heterogenitása miatt viszont a SOFA pontrendszernek és a gyakran használt laboratóriumi markereknek is vannak korlátozó tényezői, így a szepszis és a szepszis-indukálta szervi elégtelenségek adekvát meghatározásához új, ígéretes szepszis biomarkerek monitorozása szükséges. Irodalmi adatok alapján már több, mint 200 (javarészt a szérumból mért) szepszis biomarkert azonosítottak, viszont még nem találtak olyan molekulát, mely minden szükséges kritériumnak megfelelne. A szepszis komplexitásából ugyanakkor valószínűsíthető, hogy több szepszis biomarker szimultán monitorozása eredményes lehet az effektív diagnózishoz és prognózisbecsléshez.

A szepszis miatt kialakuló masszív sejtkárosodás következtében számos gyulladással kapcsolatos paraméter (pl. presepsin) vagy egyéb intracelluláris fehérje (pl. aktin) juthat ki a keringésbe, illetve – a kórképben gyakori veseérintettség révén – a vizeletbe.

Az aktin egy 43 kDa molekulatömegű, globuláris szerkezetű ubikviter fehérje, melynek fő tulajdonsága a szál- illetve rostképzés, így a sejtek citoskeletonjának, illetve a mikrofilamentáris rendszernek egyik esszenciális alkotóeleme. Az aktin globuláris aktin monomer (G-aktin), vagy filamentáris aktin polimer (F-aktin) formában van jelen a sejtekben. A szervezetben fiziológiás körülmények között is zajló sejt turnover során a keringésbe jutó aktin az ún. aktin scavenger rendszer fehérjeihez (gelsolin, Gc-globulin) kötődve szállítódik, így a fehérjéhez kötött aktin

komplexek méretükénél fogva nem filtrálódnak a vese glomerulusaiban, ezért a vizeletben sem jelennek meg. Súlyos katabolikus állapotokban viszont a pusztuló sejtekből rövid idő alatt nagy mennyiségű aktin kerül az extracelluláris térbe, majd az aktin scavenger rendszer eliminációs kapacitása is kimerül, ezáltal az aktin nagyobb koncentrációban is bekerülhet a vizeletbe.

Eddig mindössze egy 2003-ban közölt vizsgálatban találtak emelkedett vizelet-aktin (u-aktin) szinteket vesetranszplantált betegeknél. Ennek kapcsán merült fel bennünk a kérdés, hogy szepszisben detektálható-e aktin a vizeletben.

A presepsin (PSEP) a CD14 molekula membránkötött formájából (55 kDa) keletkező szolúbilis N-terminális fragment (13 kDa). A membránhoz kötött forma főként a veleszületett immunitás sejtjeinek (makrofágok, monociták, neutrofil granulociták) felszínén expresszálódik, így a marker szérum szintje már a kórokozók felismerése után megemelkedik a szepszis korai szakaszában, ezért a jelenleg széleskörben elterjedt szepszis biomarkerekhez (hs-CRP, PCT) képest korábban emelkedő PSEP szintek várhatók. Az eddigi klinikai tanulmányokban a PSEP optimális szepsziszre vonatkoztatott cut-off értékét 400-600 pg/ml közötti plazma koncentrációknál határozták meg, míg a PCT cut-off értéke 0,5 ng/ml. Fontos irodalmi adat, hogy a molekula plazma szintje (egyelőre ismeretlen mechanizmussal) gombaszepszisben is emelkedik. A PSEP kicsi molekulatömege miatt a glomerulusokban szabadon filtrálódik, ezért súlyos vesekárosodás esetén a marker plazma koncentrációja a GFR csökkenésével fordítottan arányos változást mutat.

Az albumin fiziológiásan számos feladatot lát el a keringésben (pl. onkotikus nyomás fenntartása, transzport funkció, antioxidáns kapacitás), ezért súlyos katabolikus állapotokban gyakran csökkent szérum albumin koncentrációk várhatók. Ennek megfelelően számos gyulladásozó állapotban (pl. iszkémiás szívbetegség, pankreatitisz, szepszis, tumor) észleltek – a többnyire ellentétesen változó gyulladásozó marker és albumin szintekből kalkulált – emelkedett CRP:albumin, PCT:albumin vagy PSEP:albumin arányt. A gelsolin (GSN) aktin scavenger fehérjeként (82 kDa) egyfajta protektív funkciót lát el a keringésben, így kiterjedt gyulladásozó állapotokban (pl. trauma, akut májelégtelenség, miokardiális infarktus, szepszis) szintén csökkenő szérum GSN szinteket találtak. Egy korábbi intézetünkben folytatott vizsgálatban szintén csökkenő GSN koncentrációk mellett növekvő se-aktin szinteket detektáltak szeptikus betegeknél.

A fenti vizsgálatok eredményei alapján feltételeztük, hogy a PSEP és a GSN szinteket arányának változását érdemes lehet megvizsgálni szeptikus betegeknél.

II. Célkitűzések

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.

Első tanulmányunk céljai a következők voltak:

- Egy érzékeny kvantitatív Western blot technika kidolgozása az u-aktin detektálásához.
- Az u-aktin szintek monitorozása kontroll, szeptikus 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

Második 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 egyéneknél, valamint intenzív osztályon kezelt nem szeptikus és szeptikus betegeknél.
- 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
 - a PSEP:GSN arány diagnosztikus hatékonyságát szepszisben, szepszis-indukálta vesekárosodásban, alacsony és magas vazopresszor igényű szeptikus betegeknél, szeptikus sokkban, valamint noninvazív oxigén terápia és gépi lélegeztetést igénylő szeptikus betegeknél
 - a PSEP:GSN arány prognosztikus teljesítményét a szeptikus betegek vazopresszor és gépi lélegeztetési igényének időtartamát, valamint a szepszis kimenetelét illetően

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. 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.

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 (65 fő), valamint kiterjedt sebészeti beavatkozást 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. 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 betegeknek 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).

A szepszishez 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. Mindemelllett a szeptikus betegeket a szeptikus sokk (adekvát folyadékpótlás, vazopresszor igény, emelkedett laktát szint (> 2 mmol/l)) kialakulása alapján is csoportosítottuk.

A szepsziszhez társuló légzési elégtelenség kezelése szempontjából a szeptikus betegeket noninvaszív oxigén terápia- és gépi lélegeztetési igény 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 kialakulása szerint is tovább bontottuk a Berlini definíciók alapján.

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. 10-napos mortalitási adatok alapján a szeptikus betegeket túlélő és nem-túlélő csoportokra osztottuk.

A második vizsgálatunkban is krónikus betegségekkel rendelkező, a PTE KK Szemészeti Klinikán műtétre előjegyzett kontrollcsoporttól (23 fő) vettünk mintákat. A kontroll egyéneknél ugyanúgy az akut gyulladáshoz vezető 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

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. 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 szeptikus és nem 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 (etiléndiamin-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 aliqoutozás után a minták egy részét Laemmler mintapufferrel 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.

III.3. Rutin laboratóriumi vizsgálatok

A napi rutin vérvételek során mért paraméterek (összfehérje, albumin, karbamid, kreatinin, bilirubin, kreatin kináz (CK), hs-CRP, PCT, vérkép), továbbá a levett vizeletmintákból mért markerek (összfehérje, albumin, kreatinin) 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 szérum és vizelet paraméter 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. Az intézetünkben mért új, potenciális szepszis markerek (vizelet orosomucoid, vizelet CysC) meghatározását az intézetünkben kidolgozott automatizált turbidimetrián alapuló immunkémiai módszerekkel határoztuk meg.

III.5. Vizelet-aktin meghatározása Western blot technikával

A se-aktin szinteket Lee és mtsai., valamint munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján egy kvantitatív Western blot technikával határoztuk meg. Ezen eljárást az alább leírt módon az u-aktin szintek kimutatásához adaptáltuk.

Fehérje elektroforézis denaturáló közegben

A korábban centrifugált, hőkezelt és Laemmlí mintapufferrel hígított denaturált vizeletminták Western blot tálal történő analíziséhez először egy egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk SDS-t és béta-merkaptó-etanol tartalmozó közegben (SDS PAGE) Laemmlí szerint. Páztánként 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 gél futtatásakor.

Az elektroforézis után zajlott a gélek transzferálása 0,2 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra, szendvics rendszerben. A transzferálás 20 percig, 0,8 mA/cm²-rel, ún. semi-dry módszerrel zajlott. A nitrocellulóz membrán szabad kötőhelyeinek blokkolását 5%-os tejes tweenes TBS oldattal végeztük, egy éjszakán át +4 °C-on.

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. 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.

Az immunreakció előhívása erősített kemilumineszcenciás (ECL) technikával történt. Ehhez egy femto érzékenységű kemilumineszcens reagenssel kezeltük a nitrocellulóz membránt. A keletkező fényjelek detektálásához egy digitális CCD (charge coupled device) kamerát tartalmazó képalkotó rendszert és értékelő szoftvert használtuk. A minták denzitometriás értékelésekor a vizeletminták szummációs fényintenzitását az ismert koncentrációjú belső standard hígítási sor fényjeleihez viszonyítottuk, majd a jelintenzitások arányaiból visszszámolva meghatároztuk az egyes minták u-aktin koncentrációját. Belső standardként egy egészséges egyén szérum mintájának 3 pontos felező hígítási sorozatát használtuk, melynek aktin szintjét korábban egy ismert koncentrációjú, nyúl harántcsíkt izom preparátumból készített standard hígítási sorral határoztuk meg.

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 (méréstartomány: 20 – 20,000 pg/ml). A szérum GSN szinteket egy, az intézetünkben kidolgozott és a Cobas 8000/c502 moduljának nyitott fejlesztői csatornájára adaptált automatizált turbidimetrián alapuló immunkémiai módszerrel határoztuk meg. Ezen markerekből számoltuk ki a második tanulmányunkban vizsgált hányadost, a Presepsin:gelsolin (PSEP:GSN) arányt.

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 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

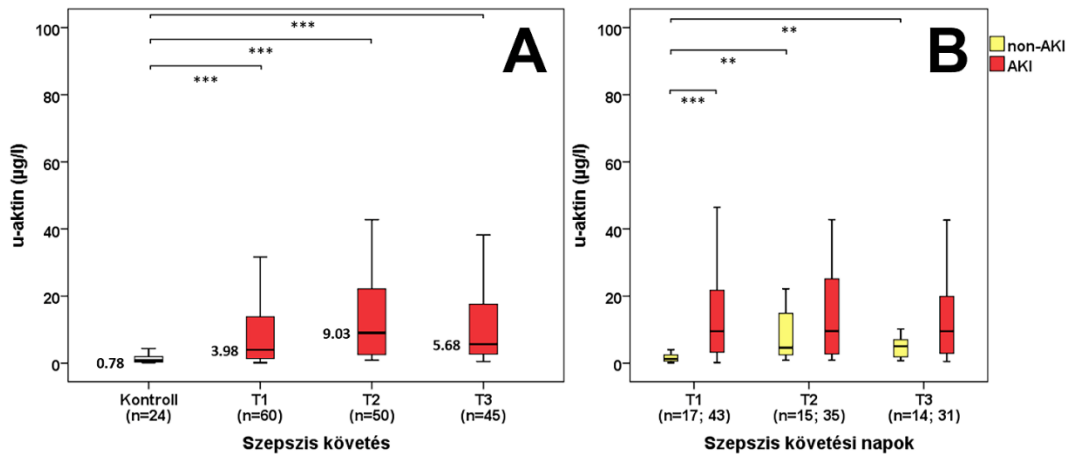
Első tanulmányunkba 24 egészséges kontroll egyént, 17 szeptikus és 43 szepszis-indukálta AKI beteget vontunk be. A vizsgált betegcsoportok eltértek ($p < 0,05$) a kor, a nem és némely alapbetegségek tekintetében. Jelentős különbségeket találtunk ($p < 0,05$) a kontroll, szeptikus és szepszis-indukálta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

A szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegek összehasonlítása

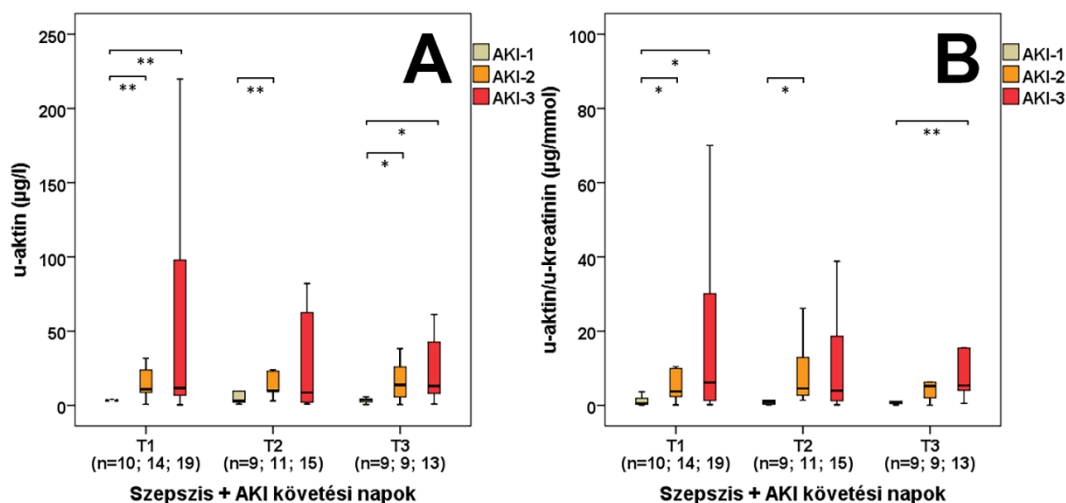
A vizsgálatunkba bevont 60 szeptikus beteg fontosabb terápiás szükségletei a következők voltak: 22 ápoltnál noninvazív oxigén terápia, 38 érintettnél gépi lélegeztetés (medián Horowitz index: 221,2 Hgmm), 47 betegnél hidrokortizon támogatás, valamint 51 érintettnél vazopresszor igény merült fel, emellett 30 betegnél találtunk emelkedett laktát szinteket (> 2 mmol/l) a követés során. A szepszis-indukálta AKI csoportban 18 betegnél (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 találtunk a szepszis-indukálta AKI betegeknél, és a szepszishez társuló MODS is gyakrabban fordult elő az utóbbi csoportban (69,8%) az előbbihez képest (53,0%) (7. táblázat a teljes Ph.D. értekezésben).

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 ($p=0,584$) és harmadik ($p=0,608$) napján, viszont 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 ($p<0,001$) és harmadik ($p<0,001$) napján (1A. ábra). 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 ($p=0,368$) és harmadik ($p=0,220$) napján (1B. ábra). A szepszis-indukálta AKI betegek esetében az AKI stádiumokkal arányosan változó első napi u-aktin szinteket találtunk (T1 medián: 3,16 vs. 10,78 vs. 11,55 $\mu\text{g/l}$, $p<0,01$), míg ez a különbség a követés második ($p<0,01$) és harmadik ($p<0,05$) napján is fennmaradt (2A. ábra). Az AKI stádiumokkal arányosan emelkedő tendencia az u-aktin értékek vizelet-kreatininre történő vonatkoztatása után is markáns volt mind az első napon (medián: 0,47 vs. 3,74 vs. 6,16 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $p<0,05$), mind a második ($p<0,05$) és harmadik ($p<0,01$) napon (2B. ábra).



1. ábra. U-aktin szintek kontroll és szeptikus (A), valamint szeptikus és szepszis-indukálta AKI betegeknél. n: mintaszám. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.



2. ábra. 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. Az első napi u-aktin szintek diagnosztikus hatékonyságát ROC analízissel végeztük. A szeptikus-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 $\mu\text{g/l}$ (szenzitivitás: 86,0%, specificitás: 82,4%); se-kreatinin: 111 $\mu\text{mol/l}$ (szenzitivitás: 90,7%, specificitás: 76,5%).

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 orosomucoiddal ($\rho = 0,367$), valamint a CysC-vel ($\rho = 0,434$). Emellett még az u-aktin szintek gyenge korrelációt ($p < 0,01$) mutattak a se-aktinnal ($\rho = 0,272$), valamint a fehérvérsejtszámmal ($\rho = 0,223$).

IV.2. Presepsin:gelsolin arány szepszisben és szepszissel 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 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 (8. táblázat a teljes Ph.D. értekezésben).

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.

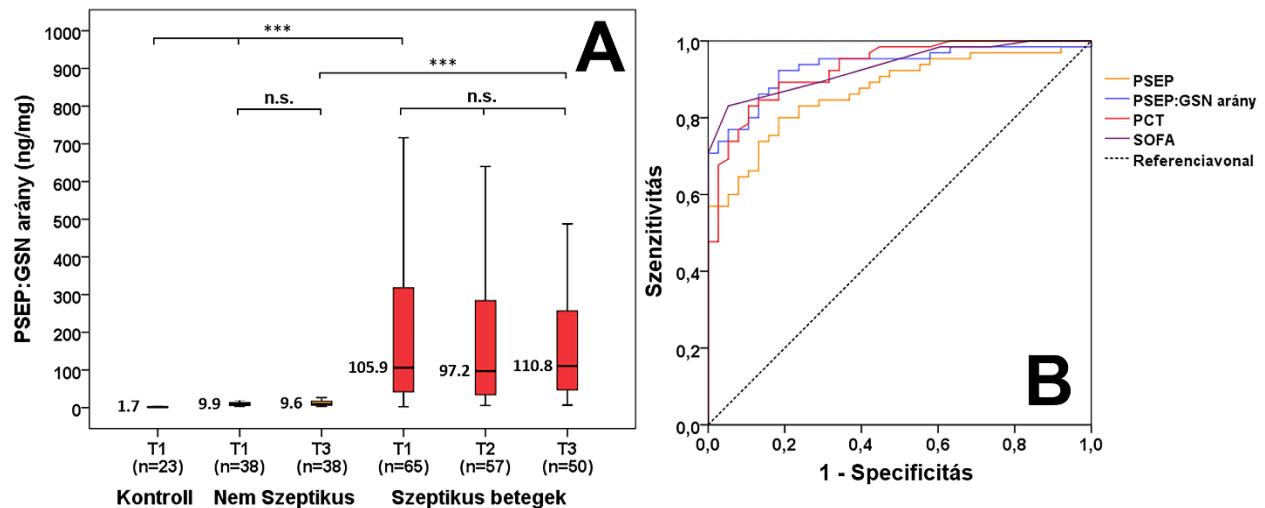
A szeptikus és szepszissel társult többszervi szervelégtelen betegek összehasonlítása

A vizsgálatunkba bevont 65 szeptikus beteg fontosabb terápiás szükségletei a következők voltak: 17 ápoltnál noninvazív 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 szeptikus 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 szeptikus betegeket tovább bontottuk a szepszissel társult többszervi elégtelenség (MODS) előfordulása alapján (2 vagy több vitális szervrendszer elégtelensége). A szeptikus (24 fő) és a szepszis-indukálta MODS (41 fő) betegek 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 (9. és 10. táblázat a teljes Ph.D. értekezésben).

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

Jelentős emelkedést észleltünk a PSEP:GSN arányt illetően a kontroll, nem szeptikus és szeptikus betegcsoportok között (T1 medián: 1,7 vs. 9,9 vs. 105,9 ng/mg, $p < 0,001$), viszont a marker kinetikáját tekintve nem tapasztaltunk szignifikáns változást a nem szeptikus (T1, T3) és szeptikus (T1, T2, T3) betegekben (3A. ábra). Az első napi PSEP:GSN arány diagnosztikus és prognosztikus hatékonyságát ROC analízissel végeztük. A nem szeptikus és szeptikus betegek elkülönítése ($p < 0,001$) során 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 ($p < 0,001$) (3B. ábra) (11. táblázat a teljes Ph.D. értekezésben).



3. ábra. PSEP:GSN 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 betegekben

A vesekárosodás nélküli szeptikus betegekhez képest jelentősen magasabb PSEP:GSN arányt észleltünk a szepszis-indukálta AKI betegekben a követés első (medián: 43,6 vs. 176,1 ng/mg, $p < 0,001$), második ($p < 0,001$) és harmadik ($p < 0,05$) napján. A szepszis-indukálta AKI betegekben is az AKI stádiumokkal arányosan emelkedő PSEP:GSN arányokat találtunk a követés első napján (medián: 85,8 vs. 111,1 vs. 419,5 ng/mg, $p < 0,05$), míg ez a különbség a második napon ($p < 0,05$)

is megmaradt. Összesen 20 AKI-3 stádiumú szeptikus beteg közül 15 (75%) érintettnél merült fel valamilyen RRT igény, így ebben a csoportban összesen 9 (60%) betegnél intermittáló hemodialízisre (IHD), míg 6 betegnél (40%) folyamatos vesepótló kezelésre (CRRT) volt szükség. 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:GSN arány ($p<0,001$), valamint a PCT ($p<0,05$).

A presepsin:gelsolin arány hasznossága a szeptikus betegek mortalitás becslésében

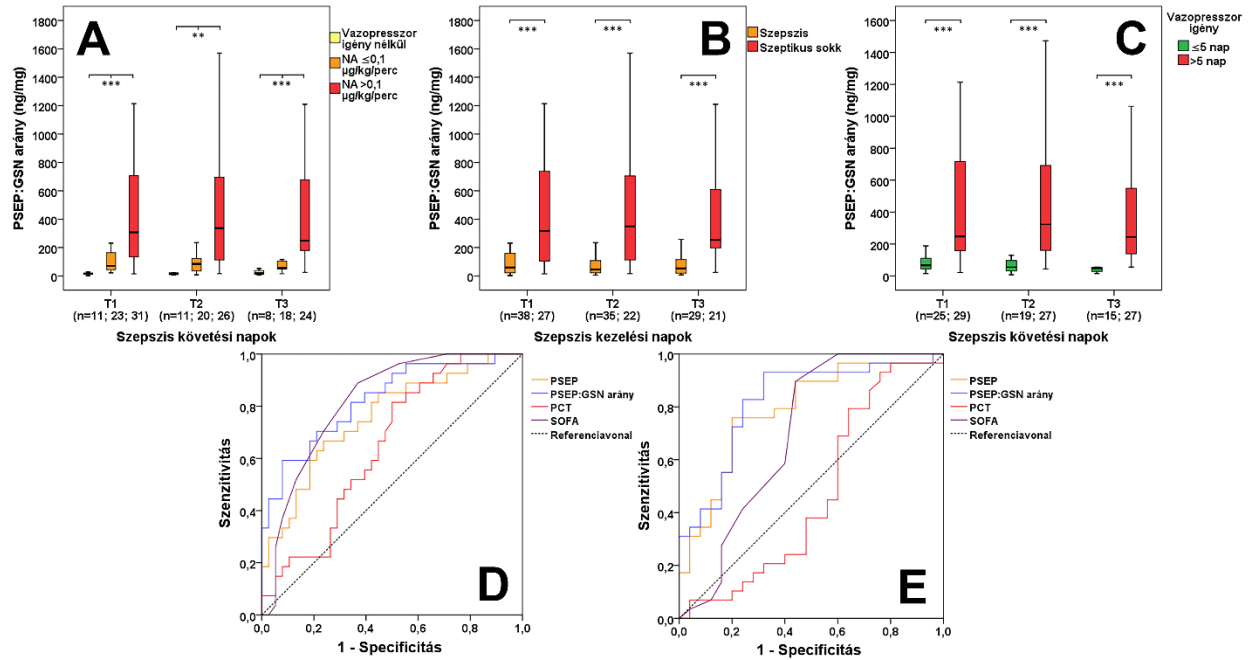
A szeptikus betegek 10-napos mortalitási adatait elemezve a PSEP:GSN arányban jelentős különbséget találtunk a túlélők és nem túlélők között a követés első (medián: 80,6 vs. 322,7 ng/mg, $p<0,01$), második ($p<0,05$) és harmadik ($p<0,01$) napján. A túlélő és nem túlélő szeptikus betegek differenciálása 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 ($p<0,05$). Egyebekben a PCT AUC értéke (0,511) nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

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 és magas dózisu 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 ($p<0,01$) és harmadik ($p<0,001$) napján (4A. 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 ($p<0,001$) és harmadik ($p<0,001$) napján (4B. ábra). Emellett az elhúzódó vazopresszor támogatásra szoruló szeptikus betegekben szignifikánsan magasabb PSEP:GSN arányt detektáltunk a rövidebb vazopresszor igényű betegekhez viszonyítva a követés első (medián: 66,7 vs. 247,4 ng/mg, $p<0,001$), második ($p<0,001$) és harmadik ($p<0,001$) napján. (4C. 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 ($p<0,05$) (4D. ábra). 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 (4E. ábra) (12. táblázat a teljes Ph.D. értekezésben).

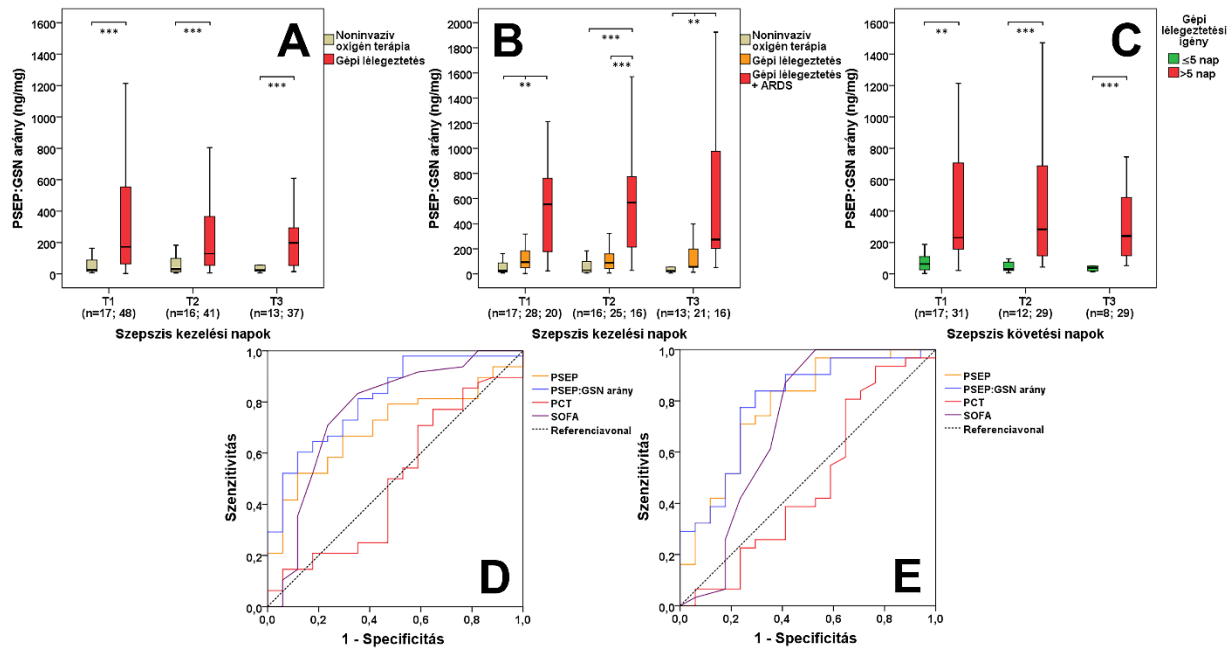


4. ábra. PSEP:GSN arányok összevetése septicus betegekben vazopresszor igény mennyisége (A), valamint a septicus sokk kialakulása (B) és a vazopresszor támogatás időtartama (C) alapján. A septicus betegek ROC analízissel történő differenciálása a septicus sokk kialakulása (D), valamint a vazopresszor 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 sepszis-indukálta légzési elégtelenségben

A noninvazív oxigén terápiaiban részesülő septicus betegekhez képest jelentősen emelkedett PSEP:GSN arányokat találtunk a gépi lélegeztetésre szoruló septicus betegeknél a követés első (medián: 26,9 vs. 173,2 ng/mg, $p<0,001$), második ($p<0,001$) és harmadik ($p<0,001$) napján (5A. ábra). Az utóbbi csoportot a (legalább) közepsúlyos 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 ($p<0,01$) és harmadik ($p<0,01$) napján (5B. ábra). Emellett a tartósabb gépi lélegeztetési igényű septicus betegekben szignifikánsan magasabb PSEP:GSN arányt észleltünk a rövidebb ideig gépi lélegeztetésre szoruló betegekhez viszonyítva a követés első (medián: 63,2 vs. 230,4 ng/mg, $p<0,01$), második ($p<0,001$) és harmadik ($p<0,001$) napján. (5C. ábra). A noninvazív oxigén terápiaiban részesülő és a gépi lélegeztetett septicus

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 (5D. ábra). 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 (5E. ábra).



5. ábra. PSEP:GSN arányok összehasonlítása szeptikus betegekben a noninvazív oxigén terápia és a gépi lélegeztetési igény (A), valamint a (legalább) közép súlyos 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. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Korrelációk

A második vizsgálatunk során végzett korrelációs vizsgálatunkban 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 szérumban lévő 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.

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.

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). A csökkenő scavenger fehérje koncentrációkon kívül több vizsgálatban emelkedő se-aktin szinteket találtak, amit korábban egy intézetünkben végzett kutatás keretében is igazoltak szepszis betegekben.

Első tanulmányunkban a vizeletet választottuk vizsgálati anyagként, 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 eddig nem 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.

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. A korábban Kwon és mtsai. által végzett kutatással ellentétben viszont mi a kontroll egyének vizeletében is (alacsony koncentrációban) ki tudtunk mutatni az aktint. 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 gyulladási 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 diszkrpanciát tapasztaltak a natív koncentrációkhoz és a súlyossághoz képest. Így végül arra a következtetésre jutottak, hogy vesekárosodás esetén a mért értékek vizelet kreatininre vonatkoztatása félrevezető lehet.

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. Mivel a szérumban CK és myoglobin 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.

Fiziológiai 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 és 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.

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. 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.

Mivel a szeptikus kórfolyamat előrehaladtával a konvencionális gyulladási 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.

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. Számos kisméretű gyulladási markerhez (pl. IL-6, PCT) hasonlóan a PSEP sem kötődik fehérjéhez a keringésben, így különféle RRT metodikákkal 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.

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. Mivel jelen tanulmányunkban a natív PSEP szintek nem voltak statisztikailag szignifikánsak a szeptikus betegek mortalitás becslésében, ez némileg ellentmond a PSEP irodalomban közölt kedvezőbb prognosztikus teljesítményének tükrében.

Mivel az albumin fiziológias körülmények között számos esszenciális feladatot lát el a keringésben (pl. onkotikus nyomás fenntartása, puffereles, transzport funkció, antioxidáns kapacitás), ezért súlyos katabolikus állapotokban gyakran csökkent szérum albumin koncentrációk láthatók. Ennek megfelelően számos gyulladáso állapotban (pl. iszkémiás szívbetege, pankreatitisz, szepszis, tumoros megbetege) észleltek – a többnyire ellentétesen változó inflammációs marker és albumin szintekből kalkulált – emelkedett CRP:albumin, PCT:albumin és PSEP:albumin arányt. A GSN is – mint aktin scavenger protein – a szervezet fiziológias 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). Emellett az intézetünkben korábban folytatott vizsgálat során szintén csökkenő GSN koncentrációk mellett növekvő se-aktin szinteket detektáltak szeptikus betegeknel, ráadásul a markánsan csökkenő GSN szintek hatékonynak mutatkoztak az intenzív osztályos mortalitás prognosztikájában. Ennek megfelelően mi is jelentősen emelkedett gyulladáso 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 szervelegtelenésekben, 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 alapbetegegek tekintetében. Intézetünk egy regionális centrumként működik a kritikus állapotú betegek ellátása szempontjából, ezért feltételezhető, hogy súlyos állapotú szeptikus betegek aránylag 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. Mivel a szeptikus betegek főként ügyeleti időben kerültek felvételre, ezért az osztályos felvétel és a másnap reggeli első mintavételi időpont között eltelt időszakban különbségek adódhattak. Az intenzív osztályon kezelt szeptikus betegek és az egészséges kontroll egyének összehasonlítása az eltérő körülmények miatt szintén korlátozó tényező, ugyanakkor szeretnénk volna egy kisebb „referencia tartományt” meghatározni olyan betegeknél, akiknél nem állt fenn akut gyulladásozó állapot mind az u-aktin, mind a PSEP:GSN arány tekintetében.

A vizsgálataink során szepszisben 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 szepszis-indukálta vesekárosodásban jól hasznosulhat. Jelenleg a PSEP szintek egy már kereskedelmi forgalomban elérhető POCT módszerrel meghatározhatók, emellett a szérum 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 betegeknel.
- A szepszis-indukálta AKI csoportban, kiváltképp a veseótló kezelést igénylő (de nem anuriás) betegeknel 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 diagnózisát, valamint a szepszis-indukálta hemodinamikai és légzési elégtelenség súlyossági fokának és prognózisának pontosabb megítélését.

Vizsgálatunk eredményeit összegezve:

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

technikával detektálhatók, így a két biomarkerből képzett hányados – a PSEP:GSN arány – rapidan és hatékonyan meghatározható.

- Az egészséges kontroll egyénekhez képest számottevő növekedést észleltünk a PSEP:GSN arányokban az intenzív osztályon kezelt nem szeptikus és szeptikus betegeknel.
- 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 betegeknel, 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 szepsziszhez 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. 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/posztterek:

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/poszterek:

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 Intenzív Randevű (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

VIII. 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.