Vizelet orosomucoid, mint gyulladásos biomarker szepszisben

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Kustán Péter

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezetők:

Prof. Dr. Kőszegi Tamás, egyetemi tanár, Laboratóriumi Medicina Intézet

Dr. Mühl Diána, egyetemi docens, Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

PÉCS

2017

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK ..... **I**

ÁBRAJEGYZÉK ..... **III**

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE ..... **IV**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ..... **V**

I. BEVEZETÉS **1**

I.1. SZEPSZIS 1

I.1.1. A szepszis fogalomköre 1

I.1.2. A szepszis epidemiológiája és etiológiája 6

I.1.3. A szepszis patomechanizmusa 7

I.1.4. A szepszis diagnosztikája, biomarkerek 11

I.1.5. A szepszis kezelésének alapelvei 15

I.2. OROSOMUCOID 17

I.2.1. Genetikai polimorfizmus 17

I.2.2. Fehérjeszerkezet 19

I.2.3. Glikoziláció 20

I.2.4. Biológiai funkció 22

I.2.5. Szérum ORM kórképekben 24

I.2.6. Vizelet ORM kórképekben 25

II. CÉLKITŰZÉSEK **27**

III. ANYAG ÉS MÓDSZER **28**

III.1. MÓDSZER VALIDÁLÁS AUTOMATIZÁLT VIZELET OROSOMUCOID MÉRÉSEKHEZ 28

III.1.1. Reagensek, készülék és módszer beállítások 28

III.1.2. Validálási protokoll 29

III.2. VIZSGÁLT CSOPORTOK, MINTAGYŰJTÉS 31

III.2.1. Referencia csoport 31

III.2.2. Illesztett kontroll csoport 32

III.2.3. Intenzív osztályon kezelt betegcsoportok 32

III.2.4. Nyitott szívműtéten átesett betegek 33

III.3. MINTÁK FELDOLGOZÁSA, KEZELÉSE 35

III.4. RUTIN LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK 36

III.4.1. Vérminták laboratóriumi vizsgálata 36
III.4.2. Vizelet vizsgálatok 38
III.5. STATISZTIKAI ELEMZÉSEK 39
IV. EREDMÉNYEK 40
IV.1. MÓDSZER VALIDÁLÁS 40
IV.2. REFERENCIA TARTOMÁNY MEGHATÁROZÁSA 43
IV.3. ILLESZTETT KONTROLL CSOPORT VIZSGÁLATA 44
IV.4. INTENZÍV OSZTÁLYON KEZELT BETEGCSOPORTOK VIZSGÁLATA 46
IV.5. SZÍVMŰTÖTT BETEGEK VIZSGÁLATA 53
V. MEGBESZÉLÉS 58
V.1. MÓDSZER VALIDÁLÁS 58
V.2. REFERENCIA INTERVALLUM 59
V.3. KRÓNIKUS BETEGSÉGEK HATÁSA: ILLESZTETT KONTROLL CSOPORT 60
V.4. INTENZÍV OSZTÁLYON KEZELT BETEGCSOPORTOK: SIRS ÉS SZEPSZIS 61
V.5. U-ORM SZINTEK MONITOROZÁSA SZÍVMŰTÖTT BETEGEKNÉL 64
V.6. VIZSGÁLATAINK KORLÁTAI 68
VI. ÖSSZEGZÉS 69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 71
IRODALOMJEGYZÉK 72
PUBLIKÁCIÓS LISTA 82

ÁBRAJEGYZÉK

1. Ábra: Szepszis-3 definíciók 5
2. Ábra: A szepszis patomechanizmusa 10
3. Ábra: Az orosomucoid aminosavsorrendje 19
4. Ábra: A cobas 8000 automata 37
5. Ábra: Kalibrációs (A) és dózis válasz (B) görbe az u-ORM mérésekhez 40
6. Ábra: Funkcionális szenzitivitás (A) és linearitás (B) 41
7. Ábra: Az u-ORM/u-CREAT szintek emelkedése az illesztett kontroll csoportban ... 44
8. Ábra: Felvételi u-ORM/u-CREAT diagnosztikus értéke szepszisben 49
9. Ábra: U-ORM/u-CREAT szintek túlélő és nem-túlélő betegeknél szepszisben 50
10. Ábra: U-ORM/u-CREAT szintek AKI-ban 51
11. Ábra: Orosomucoiduria (A) és albuminuria (B) szisztémás gyulladás során 52
12. Ábra: Gyulladásos paraméterek monitorozása szívműtétet követően 56

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. Táblázat: A SIRS diagnosztikus kritériumai 2
2. Táblázat: A szepszis diagnosztikus kritériumai 3
3. Táblázat: A súlyos szepszis kezelésének algoritmusa 15
4. Táblázat: Sorozaton belüli és sorozatok közti pontatlanság és valódiság vizsgálata . 42
5. Táblázat: U-ORM stabilitás vizsgálatok 42
6. Táblázat: U-ORM referencia tartományok az egészséges egyéneknél 43
7. Táblázat: A referencia csoport és a kontroll csoport adatai 45
8. Táblázat: Intenzív osztályon kezelt betegek demográfiai adatai 46
9. Táblázat: Intenzív osztályon kezelt betegek klinikai és mikrobiológiai adatai 47
10. Táblázat: Intenzív osztályon kezelt betegek laboratóriumi adatai felvételkor 48
11. Táblázat: Szívműtött betegek demográfiai és műtét előtti laboratóriumi adatai 53
12. Táblázat: Szívműtött betegek klinikai adatai 54
13. Táblázat: Gyulladásos paraméterek monitorozása szívműtét után 57

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AKI: ..... Acute Kidney Injury (akut vese sérülés)

APACHE: ..... Acute Physiology And Chronic Health Evaluation

APTI: ..... Aktivált Parciális Tromboplasztin Idő

APP: ..... Acute Phase Protein (akut fázis fehérje)

AUC: ..... Area Under the Curve (görbe alatti terület)

AVR: ..... Aortic Valve Replacement (aorta billentyű beültetés)

CABG: ..... Coronary Artery Bypass Grafting (koszorúér áthidaló műtét)

CARS: ..... Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome (kompenzatórikus gyulladásellenes válaszreakció szindróma)

CLR: ..... C-típusú Lektin Receptor

CRP: ..... C-Reaktív Protein

CV: ..... Coefficient of Variation (variációs koefficiens)

DAMP: ..... Damage-Associated Molecular Pattern (sérüléshez társuló molekuláris mintázat)

FiO_2: ..... Fraction of Inspired Oxygen (belélegzett levegő oxigénfrakciója)

GCS ..... Glasgow Coma Scale

HMGB-1: ..... High-Mobility-Group Box 1

hsCRP: ..... high sensitivity C-Reactive Protein (nagy érzékenységű C-reaktív protein)

IL: ..... Interleukin

INR: ..... International Normalised Ratio

ITO: ..... Intenzív Terápiás Osztály

KDIGO: ..... Kidney Disease: Improving Global Outcomes

LOD: ..... Limit Of Detection (kimutatási határ)

LOQ: ..... Limit Of Quantification (meghatározási határ)

LPS: ..... Liopoliszacharid

MAP: ..... Mean Arterial Pressure (artériás középnyomás)

MODS: ..... Multi Organ Dysfunction Syndrome (több szervi elégtelenség)

NLR: ..... Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) Like-Receptor (NOD-szerű receptor)

OR: ..... Odds Ratio (esély hányados)

ORM: ..... Orosomucoid

$PaCO_2$: ..... Artériás Parciális Széndioxid Tenzió

PAMP: ..... Pathogen-Associated Molecular Pattern (patogénhez társuló molekuláris mintázat)

PaO_2: ..... Artériás Parciális Oxigéntenzió

PCR: ..... Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)

PCT: ..... Prokalcitonin

PET: ..... Particle Enhanced Turbidimetry (partikulumok által erősített turbidimetria)

PRR: ..... Pattern Recognition Receptor (mintázat felismerő receptor)

qSOFA: ..... quick Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment

RLR: ..... Retinoic Acid-Inducible Gene I (RIG-I) Like Receptor (RIG-I-szerű receptor)

ROC: ..... Receiver Operating Characteristic

RRT: ..... Renal Replacement Therapy (vesepótló kezelés - dialízis)

SAPS: ..... Simplified Acute Physiology Score

SD: ..... Standard Deviation (szórás)

se-CYSC: ..... szérum Cisztatin C

SIRS: ..... Systemic Inflammatory Response Syndrome (szisztémás gyulladásos válaszreakció szindróma)

SLe^X: ..... Szialil Lewis X

SOFA: ..... Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment

SPSS: ..... Statistical Package for the Social Sciences

suPAR: ..... soluble urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

TLR: ..... Toll-like Receptor

TNF-α: ..... Tumor Nekrózis Faktor- α

u-ALB: ..... vizelet Albumin

u-CREAT: ..... vizelet Kreatinin

u-TP: ..... vizelet Totál Protein (összfehéje)

VDRE: ..... Vitamin D response element (D-vitamin válasz-régió)

WBC: ..... White Blood Cell Count (fehérvérsejtszám)

95% CI: ..... 95% Confidence Interval (95%-os konfidencia intervallum)

I. BEVEZETÉS

I.1. SZEPSZIS

A világszerte vezető morbiditású és mortalitású kórképek (kardiovaszkuláris, daganatos és fertőzéses megbetegedések) összefüggésbe hozhatók a szervezet gyulladásos aktivitásával. A szisztémás gyulladás gyakran vezet súlyos szövődményekhez. A kórképek közül kiemelendő a szepszis, mely már az ókorban ismert jelenség volt, és még napjainkban is az orvostudomány egyik legnagyobb kihívása, jelentős egészségügyi, társadalmi és gazdasági probléma.

A szepszis heterogén, komplex klinikai szindróma, változó etiológiai háttérrel, súlyossággal és prognózissal. A kimenetel szempontjából döntő a korai diagnózis, melyben nagy segítséget nyújtanak a laboratóriumi vizsgálatok. A szepszis markerek vizsgálata intenzíven kutatott terület, különösen előnyös olyan paraméterek elemzése, melyek a betegeknek nem jelentenek megterhelést (non-invazívan nyerhetők), és a gyulladásos állapot valós idejű monitorozására alkalmasak.

I.1.1. A szepszis fogalomköre

Hippokratész feljegyzései révén már az ókori görög kultúrából is fellelhetőek írásos bizonyítékok a szepszisről, és a későbbi évszázadok során is számos feljegyzés született a vérmérgezéssel kapcsolatban [1, 2]. Mindezek ellenére azonban a nemzetközileg elfogadott és széles körben használt fogalomrendszert csak mintegy 25 évvel ezelőtt, 1991-ben rögzítették [3]. A szepszis, illetve a hozzá kapcsolódó állapotok, valamint szervi diszfunkciók fogalmainak és diagnosztikus kritériumainak felülvizsgálata – minimális változtatásokkal - 2001-ben történt meg [4]. A negyed évszázadon át használt definíciórendszer alapján a szeptikus kórfolyamat elemei klinikai és kórélettani szempontból egy súlyosság szerinti kontinuumot alkotnak. Ezek az állapotok a szisztémás gyulladásos válaszreakció szindróma (SIRS), a szepszis, a súlyos szepszis, a szeptikus sokk és a több szervi elégtelenség (MODS) [3, 4], melyeket az alábbiakban röviden ismertetek, mivel vizsgálataink során is ezt a fogalomrendszert alkalmaztuk.

A **SIRS** nem-specifikus gyulladásos folyamatot jelöl, mely infekciók következtében, de - fertőzés hiányában - egyéb károsító tényezők hatására (nagy műtétek, égés, trauma, pancreatitis, egyéb szövetsérülés, ischaemia) is kialakulhat. A SIRS diagnózisának kimondásához az 1. Táblázatban foglalt tünetek közül legalább kettőnek teljesülnie kell.

1. Táblázat: A SIRS diagnosztikus kritériumai [3]

1.	**Maghőmérséklet**	**>38°C** vagy **<36°C**
2.	**Szívfrekvencia**	**>90/perc**
3.	**Légzési frekvencia** vagy **$PaCO_2$**	**>20/perc** vagy **<32 Hgmm**
4.	**Fehérvérsejtszám**	**>12 000/µl** vagy **<4 000/µl** vagy **>10%** éretlen sejt

A négy tünetből kettő teljesülése esetén SIRS-ről beszélünk. $PaCO_2$: artériás parciális széndioxid tenzió

Szepszisről – a vizsgálataink során használt definíciók szerint – akkor beszélhetünk, ha a SIRS hátterében infekció áll. Az infekció mikrobiológiai vizsgálattal igazolt, vagy klinikai jelek, laborparaméterek, képalkotó vizsgálatok eredményei alapján feltételezett is lehet. A SIRS kritériumainak teljesülésén túl a 2. Táblázatban szereplő – más okkal nem magyarázható - jelek segíthetik a szepszis diagnózisának felállítását.

Súlyos szepszis esetén a fennálló szepszishez társuló szervi diszfunkció, szöveti hipoperfúzió vagy szepszis-indukálta hipotenzió van jelen.

A **szeptikus sokk** megfelelő folyadékpótlás ellenére fennálló szepszis-indukálta hipotenzió, amelyhez hipoperfúziós zavar vagy szervdiszfunkció társul.

Több szervi elégtelenség kettő vagy több szervrendszerben (keringés, légzés, kiválasztás, májműködés, központi idegrendszer) fellépő akut működési zavart jelöl.

2. Táblázat: A szepszis diagnosztikus kritériumai [4]

Infekció (bizonyított vagy gyanújelek miatt feltételezett)
Általános jellemzők: - láz (maghőmérséklet >38,3°C) - hipotermia (maghőmérséklet <36°C) - szívfrekvencia >90/perc vagy >2 SD az életkornak megfelelő referencia érték felett - tachipnoe (>30/perc) - tudatzavar - jelentős ödéma vagy pozitív folyadékegyenleg (>20 ml/kg 24 óra alatt) - hiperglikémia (plazma glükóz >7,7 mmol/l) nem diabéteszes betegnél
Gyulladásos jellemzők: - leukocitózis (fehérvérsejtszám >12 000/µl) - leukopenia (fehérvérsejtszám <4 000/µl) - normál fehérvérsejtszám >10% éretlen alakkal - plazma C-reaktív protein >2 SD a referencia tartomány felső határa felett - plazma prokalcitonin >2 SD a referencia tartomány felső határa felett
Hemodinamikai jellemzők: - artériás hipotenzió (szisztolés vérnyomás <90 Hgmm, MAP <70 Hgmm, vagy >40 Hgmm szisztolés vérnyomásesés felnőttekben vagy <2 SD az életkornak megfelelő referencia érték alatt) - kevert vénás oxigénszaturáció >70% - szív-index >3,5 l/min/m^2
Szervi diszfunkciós jellemzők: - artériás hipoxaemia (PaO_2/FiO_2 <300) - akut oliguria (vizelet kiválasztás <0,5 ml/kg/óra) - akut kreatinin emelkedés (48 órán belül ≥44,2 µmol/l) - alvadási rendellenességek (INR >1,5 vagy APTI >60 másodperc) - ileus (hiányzó bélhangok) - thrombocytopenia (vérlemezkeszám <100 000/µl) - hiperbilirubinaemia (plazma összbilirubin > 70 µmol/l)
Szöveti perfúziós jellemzők: - hiperlaktátémia (>3 mmol/l) - csökkent kapilláris újratelődés

SD: standard deviaton (szórás), MAP: mean arterial pressure (artériás középnyomás), PaO_2: artériás parciális oxigéntenzió, FiO_2: fraction of inspired oxygen (belélegzett levegő oxigénfrakciója), INR: international normalised ratio, APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő

A fent részletezett kritériumrendszer az elmúlt 25 év kutatási eredményei és klinikai tapasztalatai alapján 2016-ban lényeges átalakításokon esett át [5]. Az új - Szepszis-3 – fogalomrendszer a korábbitól sok szempontból különbözik.

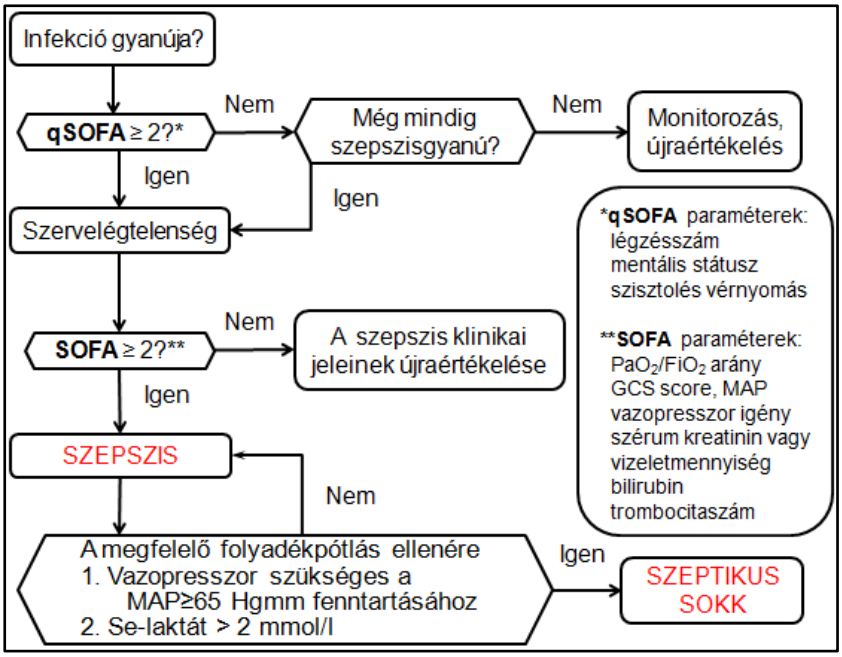
Az új definíciók szerint a szepszis: infekcióra adott, diszregulált gyulladásos válasz, mely következtében életet veszélyeztető szervdiszfunkció alakul ki.

Az egyszerűbb és gyorsabb terápiás döntéshozatal érdekében a szepszis diagnosztikus algoritmusába bekerült a betegágy mellett elvégezhető egyszerűsített, qSOFA (quick Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment) pontrendszer is. A qSOFA elemei a tudatzavar, a hipotenzió (szisztolés vérnyomás <100 Hgmm) és a hiperventilláció (>22/perc), melyek vizsgálata segítséget nyújt a prognózisbecslésben (1. Ábra). Emellett további előnye, hogy laboratóriumi paraméterek mérését nem igényli, így gyorsan reprodukálható.

Ezenfelül a SOFA (Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment) pontrendszer legalább 2 ponttal történő akut emelkedése is szükséges a szepszis diagnózisához, a szervelégtelenségek megítéléséhez.

További újítás, hogy a SIRS, illetve a súlyos szepszis fogalma kikerült a Szepszis-3 definíciókból, a szeptikus sokk pedig a szepszis magas mortalitású alcsoportja lett, keringési és szöveti anyagcsere rendellenességekkel (1. Ábra) [5].

1. Ábra: Szepszis-3 definíciók [5]



SOFA: Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment, qSOFA: quick SOFA, MAP: mean arterial pressure (artériás középnyomás), PaO_2: artériás parciális oxigéntenzió, FiO_2: fraction of inspired oxygen (belélegzett levegő oxigénfrakciója), GCS: Glasgow Coma Scale

A Szepszis-3 fogalomrendszer előnyei ellenére, jelen tanulmányunk során a korábbi definíciókat alkalmaztuk, hiszen vizsgálataink tervezése és kivitelezése alatt ezek használata volt nemzetközileg elfogadott.

I.1.2. A szepszis epidemiológiája és etiológiája

A szepszis egy komplex kórfolyamat, mely jelenleg is az intenzív terápiás osztályok (ITO) egyik legnagyobb kihívása. A modern antibiotikus és fejlett szervtámogató kezelések ellenére a súlyos szepszis mortalitási aránya napjainkban is közel 30% [6]. A magas halálozási mutatók mellett a kezelési költségek miatt is világszerte komoly egészségügyi problémát jelent [7].

A szepszis a kórházi felvételek csaknem 2%-áért tehető felelőssé. Kiemelendő adat, hogy az esetek közel fele intenzív terápiát igényel, így a súlyos szepszis az intenzív osztályos felvételek több mint 10%-áért felelős [8]. A szepszis előfordulása legjellemzőbb a hatodik évtizedben, és hajlamosító tényezői közé tartoznak a tumoros betegségek, immundeficiencia, krónikus szervelégtelenségek, iatrogén okok és genetikai tényezők, mint a férfi nem, a negrid rassz és azon génpolimorfizmusok, amelyek az immunitást szabályozzák [8]. A szepszis azonban nemcsak a felnőtt populációt érinti, hanem a csecsemő és gyermekkori halálozás egyik jelentős oka is, fejlődő országokban a mortalitás elérheti akár a 60-80%-ot is [9].

Epidemiológiai felmérések szerint többen halnak meg a szepszishez társuló szövődményekben, mint szívinfarktusban, vagy emlő- és vastagbélrákban összesen [10]. Világszerte növekvő esetszámot regisztrálnak, azonban az elmúlt évtizedekhez képest valamelyest csökkenő mortalitás figyelhető meg, továbbá a kórházi kezelés átlagos időtartama is csökkent [11, 12]. Az emelkedő incidencia magyarázható a társadalom elöregedésével, a krónikus betegségek gyakoriságával, növekvő invazív beavatkozások, kemoterápia és immunszupresszív kezelések alkalmazásával. A csökkenő mortalitás pedig a legújabb kezelési elvek sikerességének, az intenzív terápia és a diagnosztikai lehetőségek fejlődésének köszönhető [13].

Hazánkban 2005-ben, 2010-ben és 2015-ben végeztek felméréseket a szepszis incidenciáját és mortalitását tekintve. A szepszis auditok során az ITO-ra került szeptikus betegek számának jelentős növekedését figyelték meg. A vizsgálatok folyamán az infekcióval összefüggő összesített mortalitás 30%-ra csökkent, míg

a szeptikus sokkos betegek halálozási aránya 49% volt 2015-ben. A 10 év adatait összevetve, az ápolási napok számában és a több szervi elégtelenség előfordulásában érdemi változás nem történt [14].

A kórokozókat tekintve, nemzetközi adatok szerint a szepszis kialakulásáért közel 90%-ban különböző baktériumok tehetők felelőssé. A Gram-negatív fertőzések valamivel gyakrabban fordulnak elő, mint a Gram-pozitív eredetű infekciók, azonban a Gram-pozitív esetek száma az utóbbi évtizedekben növekvő tendenciát mutat. Egyre nagyobb számban kerül felismerésre a gomba okozta szeptikus állapot is (~10%), azonban az infekcióforrás sok esetben (~30%) még ma is azonosítatlan marad [8]. Számos esetben kevert fertőzéssel is találkozhatunk, továbbá lényeges adat, hogy a nozokomiális fertőzések, így a multirezisztens kórokozók által kiváltott vérmérgezések incidenciája emelkedik. A 2015-ben hazánkban végzett vizsgálat azt mutatta, hogy a kórokozók aránya átalakult, a Gram-negatív fertőzések száma növekszik (56%), és a Gram-pozitív infekciók ritkábban fordulnak elő (36%) [14].

Összességében az esetek körülbelül felében légúti infekció felelős a szepszis kialakulásáért, ezt követik az urogenitális traktus fertőzései, és a hasűri infekciók, de bármely más lokalizációjú gócból is kialakulhat szepszis [8].

I.1.3. A szepszis patomechanizmusa

A kórokozók behatolását első vonalban a különböző mechanikai védőtényezők akadályozzák meg; ide tartozik a bőr, a tápcsatorna, a légutak és a húgyutak nyálkahártyája, valamint az ezek által kiválasztott antimikrobiális anyagok (defenzinek, lizozim, stb.). Második vonalban, a szervezetbe kerülő mikroorganizmusok ellen, a gyors védekezést a veleszületett immunrendszer biztosítja (természetes ölősejtek, fagociták, granulociták, stb.). Harmadik védvonalként a szerzett immunrendszer (limfociták) is aktiválódik.

A veleszületett immunitás sejtjei, a mintázat felismerő receptoraik (PRR) révén képesek felismerni a mikroorganizmusokra jellemző, patogénhez társuló molekuláris mintázatokat (PAMP). Léteznek sejtfelszíni PRR-ek, mint a Toll-

like receptorok (TLR) és a C-típusú lektin receptorok (CLR), és ismertek az intracelluláris PRR-ek, mint a retinsav-indukálta gén - szerű receptorok (RLR) és a nukleotid oligomerizációs domén - szerű receptorok (NLR), melyek a különböző konzervált struktúrák azonosításáért felelősek [15]. Ilyenek a liopopoliszacharid (LPS) a Gram-negatív baktériumok felszínén, vagy a Gram-pozitív sejtfalalkotó lipoteicholsav [16].

A PRR-ek képesek endogén struktúrákat, ún. sérüléshez társuló molekuláris mintázatokat (DAMP) is felismerni, melyek masszív sejtkárosodás (nagy műtétek, trauma, égés, ischaemia) során jelennek meg. Feltehetően a DAMP-ok főként a nekrotizáló sejtek mitokondriumaiból származnak (HMGB-1, mitokondriális DNS-ek). A DAMP a PAMP-pal azonos módon - kötődve a PRR-ekhez - képes aktiválni az immunrendszert [17].

A PAMP ill. DAMP struktúrák megkötése után az aktivált receptor-komplexek jelátviteli kaszkádokat indítanak be, ezzel fokozzák a gyulladásos válaszban résztvevő gének transzkripcióját (2. Ábra). A patogének eliminálása érdekében fokozódik a gyulladásos mediátorok, pro- és anti-inflammatorikus citokinek (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), kemokinek, interferonok, akut fázis fehérjék termelése. A stimulus hatására 30-90 percen belül aktiválódik a gyulladásos kaszkád. Aktiválódnak az endothel sejtek, leukociták, valamint a vérlemezkék, fokozódik az adhéziós molekulák (szelektinek) expressziója, a fagociták extravazációja. További citokinek, lipid-mediátorok, vazoaktív anyagok (hisztamin, bradikinin), nitrogén-monoxid, reaktív oxigéngyökök felszabadulása indul el [16, 18].

A szerzett immunválasz sejtjei is aktiválódnak, a CD4+ T-limfociták egy része 1-es típusú helper sejtté differenciálódik, mely fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatok és a citokintermelés felerősítésében, a memóriasejt-képződésben, valamint a CD8+ citotoxikus T-sejtek aktiválása révén a celluláris immunválasz kialakításában. A limfocita populáció másik hányada a humorális immunválaszt aktiválja, valamint anti-inflammatorikus mediátorokat termel (IL-4, IL-10, IL-13) [16, 19].

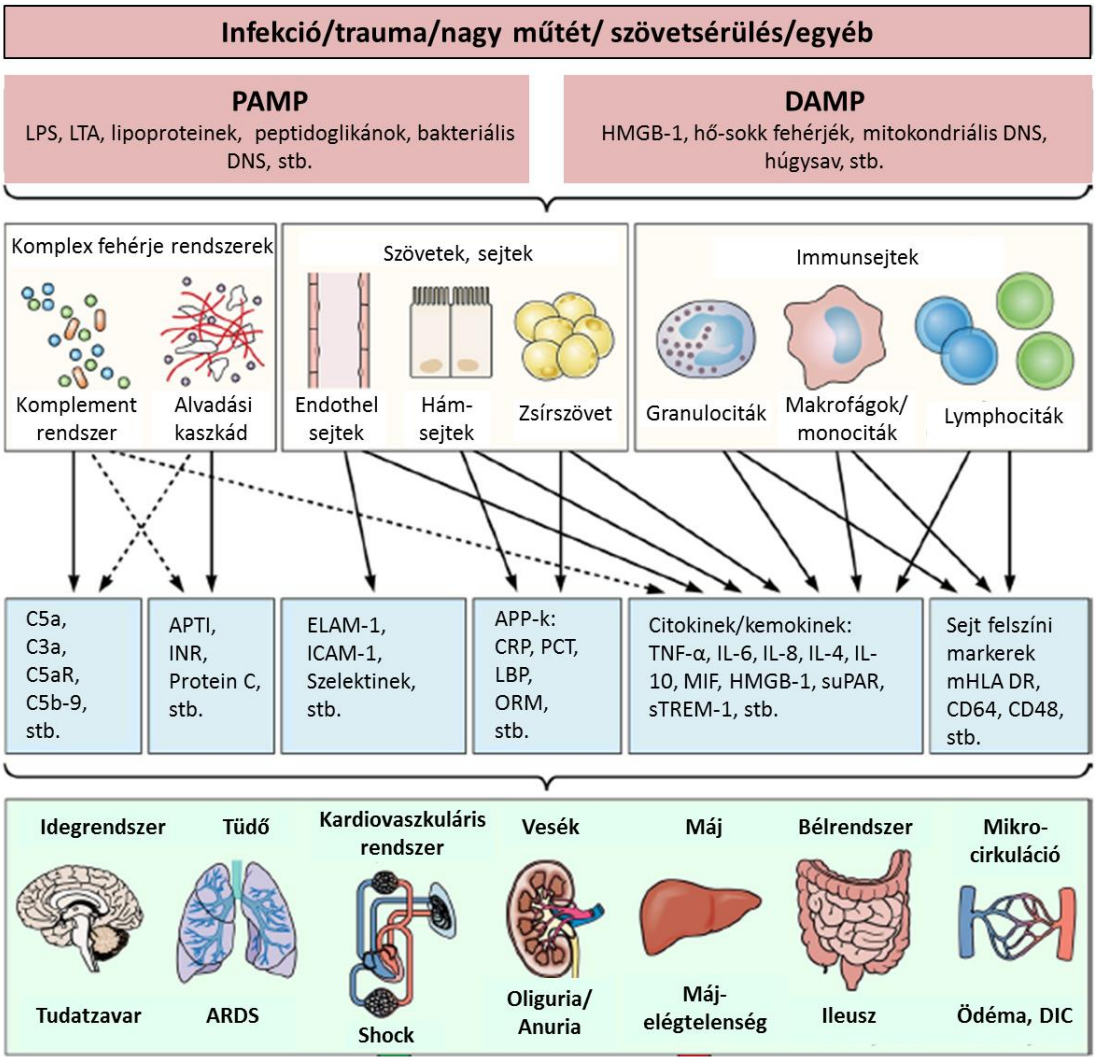
Ha felborul az egyensúly a pro- és anti-inflammatorikus folyamatok között, a gyulladásos folyamat generalizálódhat. A pro-inflammatorikus citokinek felelősek az akut fázis reakció létrejöttéért, melynek során a gazdaszervezet lázzal, emelkedett fehérvérsejtszámmal reagál [1, 20].

A túlzott mértékű nitrogén-monoxid termelés és egyéb vazoaktív anyagok hatására vazodilatáció alakul ki, az endothel diszfunkció és a glycocalix károsodás hatására fokozódik a permeabilitás, mely hemodiamikai elégtelenséghez vezet. A reaktív oxigéngyökök és a kiszabadult lizoszómális enzimek károsítják a sejteket, szöveteket, a szívizom kontraktilis funkciója romlik, mely további vérnyomáseséshez vezet. A fokozott koaguláció, mikrotrombus képződés hatására a szöveti ischaemia súlyosbodik. Megváltozik a szervezet anyagcseréje is hiperglikémia, hiperlaktátémia, megnövekedett protein katabolizmus és inzulinrezisztencia alakulhat ki [1, 21]. Gyakorlatilag minden szervrendszer elégtelen működésével számolhatunk szepszisben (2. Ábra).

A szervi diszfunkciók patogenezise multifaktoriális és nem teljesen tisztázott, azonban bizonyos, hogy létrejöttében a mikrocirkuláció romlása, szöveti hipoperfúzió, hipoxia és a következményes mitokondriális elégtelenség meghatározó tényezők [16].

A szepszisre jellemző gyulladásos válasz feltételezhetően annak az eredménye, hogy a pro-inflammatorikus mediátorok túlzott mennyiségben vannak jelen, és a kompenzatórikus gyulladásellenes válasz (CARS), amely a túlzott mértékű gyulladást hivatott ellensúlyozni, nem képes megfelelő mértékű immunszupressziót elérni. Ha a fertőzés során az anti-inflammatorikus mediátorok jutnak túlsúlyra, a CARS fokozódik, és immunparalízis jön létre, így lehetővé válik opportunista infekciók fellángolása is, ami növeli a szepszis késői halálozását [21].

2. Ábra: A szepszis patomechanizmusa [18]



Reinhart K. és mtsai. alapján magyarra fordítva. PAMP: pathogen-associated molecular pattern, DAMP: damage-associated molecular pattern, LPS: lipopolysaccharide, LTA: lipoteichoic acid, HMGB-1: high-mobility-group box 1, APP: acute phase protein, APTI: aktivált parciális thromboplastin idő, INR: international normalized ratio, ELAM-1: endothelial leukocyte adhesion molecule, ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1, CRP: C-reactive protein, PCT: prokalcitonin, LBP: LPS-binding protein, ORM: orosomucoid, MIF: macrophage migration inhibitory factor, suPAR: soluble urokinase type plasminogen activator receptor, sTREM-1: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1, mHLA-DR, monocytic human leukocyte antigen DR, ARDS: acute respiratory distress syndrome, DIC: disseminated intravascular coagulation.

I.1.4. A szepszis diagnosztikája, biomarkerek

A szepszis korai felismerése és elkülönítése a SIRS egyéb formáitól rendkívül fontos, ugyanis az időben elkezdett specifikus kezelés döntő jelentőségű a kimenetel szempontjából [22, 23], azonban a diagnózis gyakran nehézkes, hiszen a klinikai kép és a tünetek sokszor nem elég specifikusak.

A szepszis diagnózisához a mikrobiológiai vizsgálatok elvégzése elengedhetetlen. Szepszis gyanúja esetén, az első 3 órán belül a mikrobiológiai mintavételnek meg kell történnie. Hemokultúra vételén túl, mintát szükséges venni minden feltételezhető fertőzésforrásból, mint például kanülökből, vizeletből, liquorból, sebekből, légúti váladékból vagy egyéb testváladékokból [23]. A mikrobiológiai vizsgálatok eredményeire azonban legalább 24-48 órát kell várni, és sok esetben a kórokozó azonosítása sikertelen.

Napjainkban már számos új lehetőség kínálkozik a mikrobiológiai tenyésztésen túl a kórokozók azonosítására [24-26]. Különböző molekuláris biológiai módszerekkel (hibridizációs technikák, polimeráz láncreakció (PCR)) akár egyszerre több különböző patogén azonosítása is lehetséges [26]. A molekuláris technikák mellett a tömegspektrometriás azonosítás (MALDI-TOF MS) is egyre szélesebb körben terjed [25]. A tömegspektrometriát akár PCR-ral is lehet kombinálni, így potenciálisan minden kórokozó nagyon szenzitíven és specifikusan, nukleinsavak alapján azonosítható [25]. Ezeknek az új módszereknek a hátránya, hogy meglehetősen drágák, és megfelelő infrastruktúrát és személyzeti hátteret igényelnek, valamint a kolonizációt és a valós infekciót okozó ágens elkülönítése nehézkes. Ezek a technikák jelenleg még nem helyettesíthetik a mikrobiológiai tenyésztéseket, annak ellenére, hogy jóval rövidebb idő alatt (8 óra) megbízható eredményt szolgáltathatnak.

A mikrobiológiai vizsgálatok eredményéig a klinikai döntéshozatalt különböző paraméterek monitorozása segíti. A diagnózis felállításának elősegítésén kívül, bizonyos biomarkerek alkalmasak lehetnek a prognózis és a szervi diszfunkciók kifejlődésének előrejelzésére, valamint az antibiotikus terápia megtervezésére, továbbá a kezelésre adott válasz értékelésére [27]. Az elmúlt néhány évtizedben

számos, közel 200 különböző szepszis marker vizsgálatáról számoltak be [28]. A lehetséges biomarkerek nagy része a szepszis során kialakuló gyulladásos válasz mediátorai közé tartozik. A legújabb diagnosztikus irányelvek már magukba foglalják a szérum prokalcitonin (PCT) és C-reaktív protein (CRP) mérését szepszis gyanújakor, azonban ezek sem minden igényt kielégítő molekulák, így a szepszis markerek kutatása napjainkban is intenzíven folyik.

A PCT meghatározása jelenleg a szepszis diagnosztikus kritériumainak egyik alapfeltétele [4, 23]. A kemokinként ismert PCT a calcitonin hormon előanyaga, 116 aminosavból álló molekula, mely alkalmas a bakteriális és az egyéb eredetű fertőzések egymástól való elkülönítésére, továbbá negatív prediktív értékét bakteriális szepszis kizárásában 99%-osnak ítélik [28]. Gyulladásos folyamatok hatására a PCT a májban és a polimorfonukleáris sejtekben is termelődhet. Bakteriális fertőzések során 4-6 órán belül emelkedik a szérum PCT szint, és 24 órán belül eléri a maximumát, mely megfelelő kezelés mellett csökkenni kezd, köszönhetően az 1 napos féléletidejének [18]. Szérumszintje a SIRS nem fertőzéses formáiban a diagnosztikus küszöbérték 3-4-szerese, szepszis során 5-10-szerese lehet. Súlyos szepszisben és szeptikus sokkban koncentrációja akár a küszöbérték több százszorosára is emelkedhet [20]. Magasabb PCT értékek nagyobb mortalitással mutatnak összefüggést. Hasznosnak tűnik a PCT szintek monitorozása is, a csökkenő kinetika ugyanis az antibiotikus terápia sikerességét jelezheti [29]. Vírus és gomba infekciók esetén azonban a szérum PCT szintek nem, vagy csak mérsékelten emelkednek, valamint emelkedése belgyógyászati eredetű szepszis során elmarad a műtétek után megfigyelt értékektől. Második, vagy többedik szeptikus állapot során a PCT emelkedése kisebb. Masszív sejtkárosodással járó folyamatokban (súlyos sérülések, nagy műtétek, stb.) markánsan emelkedett PCT szintek figyelhetőek meg [30]. Jelenleg a PCT tűnik a legideálisabb szepszis markernek, így új fejlesztésként megjelentek a betegágy mellett végezhető PCT gyorstesztek is, ezzel gyorsítható a diagnózis meghozatala [31].

A másik, elterjedten használt paraméter a CRP, melynek meghatározását szepszisben szintén nemzetközi ajánlások írják elő, kiegészítve a PCT méréseket

[4, 23]. A CRP egy akut fázis fehérje, akut stimulusok hatására a májban termelődik, feladata az opszonizáció, a komplement rendszer aktiválása [18]. A szérum CRP szintek számos akut és krónikus gyulladásos folyamatban emelkednek. A PCT-nél lassabban emelkedik, a maximális értékeket 48 órán belül éri el, így a szeptikus betegek aktuális állapotát nem tükrözi megfelelően [32]. Magasabb szérum CRP értékek esetén nagyobb a rizikó szervelégtelenség és a halál bekövetkeztének [29]. Minden korlátja ellenére a CRP jelenleg is széleskörűen használt szisztémás gyulladásos marker.

A citokinek, mint biológiai válaszmódosítók, a szepszis kulcs mediátorai, azonban klinikai alkalmazhatóságukról megoszlanak a vélemények alacsony diagnosztikus specificitásuk és magas anyagi vonzatuk miatt. Mind a pro-inflammatorikus IL-6, mind az anti-inflammatorikus IL-10 emelkedése összefüggést mutatott a súlyossággal és a mortalitással szepszisben [33]. Az IL-1β, IL-8, TNF-α szérum koncentrációi is növekednek szepszis, súlyos szepszis, szeptikus sokk során, ezen kívül összefüggésben állnak a szervi diszfunkció kialakulásával és a mortalitással. A citokin szintek változása rövid féléletidejük miatt azonban nem áll összefüggésben a szeptikus kórfolyamat időbeli lefolyásával.

A presepsin (sCD14) egy újabb lehetőség a szepszis diagnosztikában. A presepsin a CD14 ko-receptor keringő formája, melynek az LPS felismerésben van szerepe. Nagy esetszámú multicentrikus vizsgálattal igazolták, hogy szepszisben a presepsin plazma szintje két órán belül megemelkedik, és jól alkalmazható a bakteriális szepszis nem-bakteriálistól való elkülönítésében [34]. Tanulmányok alapján továbbá, a presepsin szintek jó korrelációt mutatnak a szepszis súlyosságával, kimenetelével, és segítséget nyújthatnak az antibiotikus terápia hasznosságának megítélésében [35, 36].

Ugyancsak ígéretes eredmények láttak napvilágot a suPAR (soluble urokinase-type plasminogen activator receptor) alkalmazásával kapcsolatban [37]. A suPAR jó indikátora lehet az állapot súlyosságának, valamint szérumszintje a szervelégtelenségekkel korrelált kritikus állapotú betegeknél [38]. Alacsony

specificitása miatt a suPAR sokkal értékesebb prognosztikus markerként, mint diagnosztikusként.

A fent említett biomarkereken túl egyéb molekulák, CD-markerek, akut fázis fehérjék, receptorok használhatóságát és szepszisben betöltött szerepét is vizsgálták. A hatékonyabb diagnózis alkotáshoz, prognózis becsléshez, betegellátáshoz a paraméterek kombinált alkalmazására van szükség, a szepszis komplexitásából és heterogenitásából adódóan, egyetlen marker meghatározása nem elégséges [28]. A laboratóriumi diagnosztika tárháza azonban segítséget nyújthat a klinikusoknak a gyors döntéshozatalban, a különböző labortesztek használata mind a szepszis, mind a szervelégtelenségek felismeréséhez nélkülözhetetlen.

A szepszis súlyosságának és mortalitásának becslésére önálló markerek - jelen tudásunk szerint - nem alkalmasak, ezért különböző, több paraméteres pontrendszereket fejlesztettek ki [39]. A pontszám kiszámítása során használt értékek között szerepelnek különböző laboratóriumi (kálium, kreatinin, bilirubin, stb.) és élettani (vérnyomás, testhő, stb.) paraméterek, életkor, komorbiditások, és szükséges terápiás beavatkozások. A legelterjedtebb pontrendszerek az APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation), a SAPS (Simplified Acute Physiology Score) és a SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment). Kombinációjukkor egyértelműen javul a prognosztikus hatékonyság [39], jóllehet kiszámításuk időigényes, a napi rutin során sok esetben nehézkes a használatuk. Mindezek mellett a Szepszis-3 definíciórendszer és a legújabb ajánlások a SOFA pontrendszer meghatározását írják elő a szepszis diagnózisához és a szervelégtelenségek felismeréséhez, ezzel segítik a magas mortalitású kórállapot azonosítását [5].

I.1.5. A szepszis kezelésének alapelvei

Terjedelmi okokból csak rövid összefoglalást adunk a szepszis kezelésének alapelveiről.

A SIRS-es betegeknél a kiváltó kórokok ellátása az elsődleges feladat, valamint fontos az esetleges infekciók folyamatos keresése, mivel a szepszis korai felismerése kiemelt jelentőségű.

Súlyos szepszis és szeptikus sokk esetén az időben - 1 órán belül - megkezdett terápia jelentősen javítja a túlélési esélyeket. Nemzetközi ajánlások szerint a feltételezett infekciónak megfelelő, mielőbbi *ex juvantibus*, széles spektrumú antimikrobiális (baktérium, gomba, vírus ellenes) szer adása javasolt, melyet a tenyésztések eredményeinek megfelelően egy ún. deeszkalációs terápia követ. Amennyiben a mikrobiológiai mintavétel nem jár jelentős (>45 perc) időveszteséggel úgy az antimikrobiális szer indítása előtt szükséges azt elvégezni. Szintén az első három órán belül szükséges a folyadékpótlás megkezdése (3. Táblázat).

3. Táblázat: A súlyos szepszis kezelésének algoritmusa [23]

Az első 3 órán belül elvégzendő feladatok: 1. szérum laktát szint meghatározása 2. hemokultúra vétele az antibiotikum adását megelőzően 3. széles spektrumú antibiotikum adása 4. 30 ml/kg krisztalloid infúzió adása, hipotenzió vagy >4mmol/l feletti laktát szint esetén
Az első 6 órán belül elvégzendő feladatok: 5. vazopresszor alkalmazása folyadékra nem reagáló betegeknél, ≥65 Hgmm-es MAP fenntartása 6. perzisztáló hipotenzió (szeptikus sokk) vagy >4mmol/l feletti laktát szint esetén a folyadékstátusz és a szöveti perfúzió újraértékelése: • **vagy:** o fókuszált vizsgálatok megismétlése (vitális jelek, pulzus, kapilláris újratelődés. bőrtünetek, fizikális vizsgálat) • **vagy az alábbiak közül 2 elvégzése:** o centrál vénás nyomás mérése o centrál vénás oxigén szaturáció mérése o ágymelletti szívultrahang elvégzése o volumen válaszkészség megítélése 7. Laktátszint mérésének ismétlése

A Surviving Sepsis Campaign 2012 ajánlásai alapján.

A szepszis további kezelésének alapelvei közé tartoznak a fertőzés fókuszának megszüntetése és a szükséges szervtámogató kezelések is (intravénás folyadékpótlás és vazopresszor terápia, légzéstámogatás, diuretikus vagy szükség esetén vesepótló kezelés, vérkészítmények adása, szedáció és fájdalomcsillapítás, trombózis profilaxis, gyomorfekély prevenció).

A szepszis kezelésének további részletezése meghaladja a dolgozat kereteit és témáját, ezért a részletes leírásától eltekintünk, és csak utalunk a megjelent ajánlásokra [22, 23, 40], melyeket betegeink kezelése során követtünk.

I.2. OROSOMUCOID

Az orosomucoid (ORM), vagy más néven α-1 savanyú glikoprotein egy jelentős, pozitív akut fázis fehérjeként (APP) számon tartott szérum glikoprotein. Habár már 1950-ben azonosították, és azóta számos funkcióját leírták, a pontos biológiai szerepe még ma is tisztázatlan [41, 42]. Az ORM egy 41-43 kDa molekulatömegű fehérje, tömegének közel felét szénhidrát láncok alkotják, így kialakítva a különleges molekulaszerkezetét, melynek egyedi tulajdonságait és funkcióit köszönheti. APP-ként az ORM szérum szintje akut stimulusok hatására megemelkedik, a fehérje részt vesz a gyulladásos folyamatok szabályozásában, ismert anti-inflammatorikus és immunmoduláló szerepe is [43]. Emellett a keringésben jelentős transzport funkciókkal, ligand kötő tulajdonságokkal rendelkezik, ezáltal képes befolyásolni bizonyos gyógyszerek farmakokinetikáját [44]. Újabb vizsgálatok világítottak rá az anyagcsere szabályozásában betöltött szerepére [45]. A gyulladás okozta szövetkárosodás csökkentésével az ORM hozzájárul a homeosztázis fenntartásához.

I.2.1. Genetikai polimorfizmus

Az orosomucoidot kódoló gének struktúrája és nukleotid szekvenciája ma már jól ismert, és bizonyos homológiát mutat a legtöbb fajban. A humán ORM gének vizsgálata során, az APP génekre jellemző, nagyfokban konzervált DNS szekvenciát figyeltek meg, mely az akut fázis reakcióban játszhat szerepet [46].

A humán ORM két szomszédos lókusz (ORM1, ORM2) által kódolt gének terméke, melyek a humán genomban a 9-es kromoszóma hosszú karján helyezkednek el egymástól 3,3 kilobázis távolságra (9q32). A gének nagymértékű homológiát mutatnak, 6 exont és 5 intront tartalmaznak, egymástól mindössze 32 nukleotid szubsztitúcióban különböznek. Mindkét lókusz 183 aminosav tartalmú fehérjeláncot kódol, melyek közt 21 aminosav különbség található [47, 48].

Genetikai vizsgálatok során az ORM gének jelentős polimorfizmusát figyelték meg. Yuasa és mtsai. 57 különböző allélt írtak le, 27 különböző ORM1 és 30

ORM2 allélt, melyek valószínűleg az ORM gének mutációiból alakultak ki [49]. A négy leggyakoribb allél az ORM1*F1, ORM1*F2, ORM1*S és az ORM2*M. Az ORM1 gén alléljai (F1, F2, S) feltehetően a 20-as és 156-os aminosavat kódoló pozícióban végbement nukleotid kicserélődésből keletkeztek (adenin→guanin), mely eltérő aminosav szubsztitúciókat eredményezett [50]. Valószínűsíthető, hogy az ORM1*S az ősi allél melyből a többi származik. Populációs vizsgálatok során feltárásra került, hogy Európában, Nyugat-Ázsiában és Észak-Afrikában a leggyakoribb allél az ORM1*F2 [51].

Genetikai vizsgálatok alapján az ORM gének öröklődése autoszomális jellegű, ko-domináns expresszióval [52]. A genetikai lókuszok, valamint a számos ORM allél felelős az expresszált fehérjelánc heterogenitásáért.

Feltehetően a szérum ORM koncentrációja nincs genetikai kontroll alatt, ezt inkább az akut stimulusok befolyásolják. Különböző gyulladásos folyamatok, sérülések, műtétek, bakteriális infekciók hatására a gének expressziója fokozódik, az ORM szintek a szérumban és lokálisan is megemelkednek [53]. Eltérő adatok vannak arra vonatkozóan, hogy melyik gén transzkripciójának terméke a fő komponens a cirkuláló ORM keverékben, ám valószínűsíthető, hogy gyulladásos folyamatok hatására az ORM1 lókusz íródik át aktívabban.

Az orosomucoid főként a májban szintetizálódik, de a gének extrahepatikus expresszióját is leírták. Számos sejt képes ORM szintézisre és szekrécióra (endothel sejtek, polimorfonukleáris sejtek, leukociták, tumor sejtek, stb.). Konstitutív ORM génexpressziót figyeltek meg további szövetekben, szervekben is (vese, tüdő, prosztata, zsírszövet) [54].

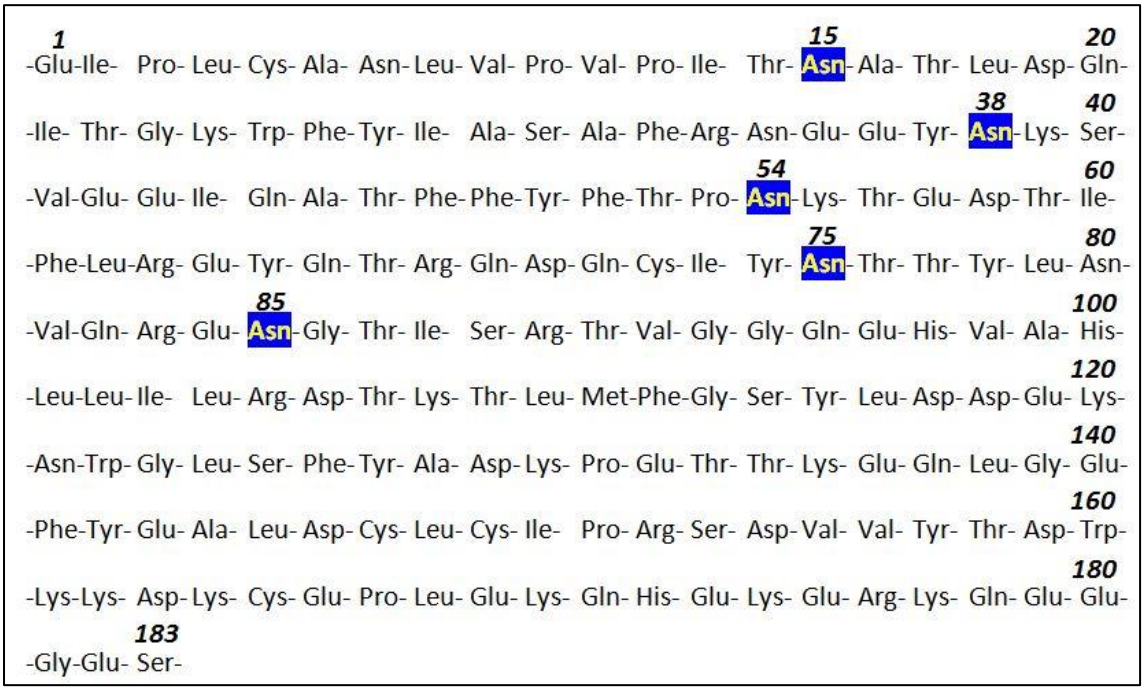
A génexpresszió és az ORM szintézis fő stimulátorai a gyulladásos mediátorok, IL-1, IL-6, TNF-α és glükokortikoidok. Akut stimulus hatására megnő az ORM szintézis, 24 órán belül emelkedik a szérum orosomucoid koncentráció, és az ORM megjelenik a különböző testfolyadékokban is [55]. A magas ORM szintekhez feltehetően nemcsak a hepatociták által termelt, hanem a lokálisan, leukociták, endothel sejtek által szintetizált ORM is hozzájárul, és így a gyulladásos fókuszban is emelkedik az ORM szint [43, 56].

I.2.2. Fehérjeszerkezet

Az ORM aminosavsorrendje már közel 50 éve ismert [57]. A fent említett genetikai polimorfizmus az aminosavsorrendben eltérő szubsztitúciókat eredményez, mely a keringő ORM heterogenitásának egyik magyarázata.

Az ORM egy 201 aminosav hosszúságú prekurzor proteinből hasad le. A keletkező, 183 aminosavból álló polipeptidláncot két diszulfid híd stabilizálja az 5-147 és 72-165 pozíciójú ciszteinek között (3. Ábra) [58].

3. Ábra: Az orosomucoid aminosavsorrendje [58]



A kékkel kiemelt, 15, 38, 54, 75, 85 pozíciójú aszparaginok (Asn) jelölik a fehérje glikozilációs helyeit. Az aminosavsorrend elérhető a Swiss-Prot adatbázisban (http://www.uniprot.org/uniprot/P02763).

Az ORM másodlagos és harmadlagos szerkezetét vizsgáló tanulmányok alapján a humán ORM 15% α-hélixet, 41% β-redőt, 12% β-hurkot és 24% rendezetlen struktúrát tartalmaz [59]. A szerkezetben található magas β-redő arány, valamint a savas és hidrofób részek magyarázhatják az ORM diverz ligand kötési képességét. Feltételezett, hogy alkalikus, bázikus és szteroid kötő helyeket is tartalmaz a fehérjelánc [60].

A fehérjelánc zsírsavaktól, koleszterintől és foszfolipidektől mentes, ám öt glikozilációs helyet tartalmaz, ahol a szénhidrátláncok N-glikozidos kötéssel

kapcsolódnak az aszparaginokhoz (15, 38, 54, 75, 85 pozíció, 3. Ábra). A fehérjelánchoz kapcsolódó, változatos N-glikánok jelentős mikroheterogenitást eredményeznek. Az ORM proteinláncán foszforilációs helyek is találhatók, habár ez a módosulás még nem ismert részleteiben [61].

A keringő ORM számos izoforma keveréke, mely köszönhető egyrészt a genetikai polimorfizmusnak (aminosav szekvencia eltérései), másrészt a különböző glikozilációs formáknak.

I.2.3. Glikoziláció

A glikoziláció az egyik legfontosabb és leggyakoribb poszttranszlációs protein módosulás, mely a fehérjeszerkezet megváltozásával funkcióbeli és metabolikus különbségekhez vezethet. Emellett a glikoprotein felszínén lévő oligoszacharidok a sejtek közötti kommunikációban és adhézióban játszanak szerepet [62].

Az orosomucoid az egyik legkiterjedtebben glikozilált szérumfehérje, - elnevezése is erre utal - a molekulatömegének 45%-át szénhidrát láncok teszik ki. Ráadásul az ORM az egyike azon kevés glikoproteineknek, amelyek komplex bi-, tri- és tetra-antennáris glikán struktúrákat is tartalmaznak [63].

A glikoziláció során a polipeptidlánc aszparaginjainak aminocsoportjához kovalens kötéssel kapcsolódnak az N-acetil-glükózaminnal induló, különböző oligoszacharid oldalláncok. Már a peptidlánc szintézise alatt, az endoplazmatikus retikulumban megkezdődik a glikoziláció (kotranszlációs módosulás). A folyamat a terminális sziálsav kötődésével a Golgi-apparátusban fejeződik be [61].

Az ORM komplex oligoszacharidjainak felépítésében N-acetil-glükózamin és monoszacharidok (mannóz, galaktóz, fukóz) vesznek részt, a láncok végein pedig sziálsav (N-acetil-neuraminsav) található [54, 61].

Az ORM fehérjeláncán jellegzetes csoportok, ún. szialil Lewis X (SLe^X) struktúrák vannak jelen. Ezek a négy monoszacharidból felépülő struktúrák a szelektin típusú adhéziós molekulák ligandjai, fontos szerepet játszanak a sejt felismerésben, a sejtek egymáshoz való kapcsolódásában és a leukocita

extravazációban. Az ORM SLe^X csoportjai révén számos sejthez képes kötődni (endothel, leukociták, stb.) [54, 64, 65].

Az ORM peptidláncához kapcsolódó glikánok összetétele (sziálsav, fukóz tartalma), szerkezete, elágazottsága jelentősen különbözhet, ami a fehérje mikroheterogenitásáért felelős. Ez a variabilitás számos, megközelítően 12-20 különböző glikoformát eredményez [54].

Az ORM egyedi fizikokémiai tulajdonságait a glikoziláció jelentősen befolyásolja. A nagy mennyiségű - 10-12% körüli - sziálsav tartalomnak köszönheti savas tulajdonságait, rendkívül negatív töltését, mely miatt az ORM kiemelkedően alacsony izoelektromos ponttal rendelkezik (pI:1-3,8). Különösen jól oldódik vízben és egyéb poláris oldószerekben, valamint savakban is [61].

A glikoziláció az ORM eliminációját is befolyásolja. Az ORM féléletideje a keringésben körülbelül 5 nap [55], azonban a terminális sziálsavmentes protein turnovere mindössze 2 perc, ugyanis ezt a struktúrát specifikus májbeli receptorok (aszialo-glikoprotein receptor) ismerik fel és eliminálják a keringésből [61, 66].

A szénhidrátláncok nemcsak az ORM tulajdonságait befolyásolják, de a biológiai funkcióit is. A glikoziláció képes befolyásolni a ligand kötődést és az immunmoduláló aktivitást is [56, 67, 68].

Patológiás állapotokban az ORM glikánjainak összetételében és antennaszámában is változások következhetnek be, melyek összefüggésben állhatnak a betegségek progressziójával. A különböző glikoformák alkalmasak lehetnek diagnosztikus ill. prognosztikus markerként [68].

Akut fázis reakciók során megfigyelték a bi-antennáris glikánok, a fukoziláció és a SLe^X csoportok mértékének növekedését [69]. Krónikus gyulladásos folyamatokban [70], daganatos megbetegedésekben [71], diabetes mellitusban [72] szintén erősebben fukozilált bi-antennáris glikánok megjelenését írták le. Reumatoid arthritiszben a betegség progressziójával párhuzamosan nőtt a bi- ill. tetra-antennáris oligoszacharidok túlsúlya [73]. Daganatos megbetegedésekben

összefüggést találtak a rossz prognózis, a metasztázisok megjelenése és az ORM fukozilációjának ill. elágazásainak növekedése közt [74].

I.2.4. Biológiai funkció

Az ORM széleskörű funkciókkal rendelkezik, fontos szerepet játszik a szervezet homeosztázisában.

Az ORM az ún. lipocalin fehérjecsalád tagja, azon belül az immunocalinokhoz tartozik. A lipocalinok heterogén fehérjék, melyek közös tulajdonsága a lipofil anyagok megkötése és transzportja. A közös szerkezeti tulajdonságuk, hogy specifikus sejtfelszíni receptor kötőhelyek és makromolekula kötőhelyek is találhatók a felszínükön, valamint ún. lipocalin-zsebet tartalmaz a struktúrájuk, mely felelős a káros lipofil molekulák megkötéséért és ezek neutralizálásáért [75]. Emellett az immunocalinok (α-1-microglobulin, glycodelin, neutrophil gelatinase-asszociált lipocalin, orosomucoid, stb.) az immunrendszer szabályozásában játszanak fontos szerepet. Az immunocalinok a szervezet nem-specifikus védőrendszerének tagjai, az immunválasz kiterjedtségét képesek befolyásolni [76].

Újabb vizsgálatok alapján az ORM szerepet játszik az anyagcsere folyamatok szabályozásában is [45, 77]. Felismerésre került, hogy az ORM képes javítani a glukóz anyagcserét, adipocitákban fokozta a glükóz felvételt, enyhítette a hiperglikémia indukálta inzulin rezisztenciát, és a TNF-α mediált lipolízist [78].

I.2.4.1. Ligand kötés és transzport funkció

Az albumin és a lipoproteinek mellett az ORM az egyik legfontosabb nem-specifikus transzport protein a keringésben. A különleges struktúrájának köszönhetően több, mint 300 gyógyszermolekula kötési és szállítási képességét írták le, és ismertek endogén ligandjai is [44].

A legfontosabb endogén ligandjai a hisztamin, szerotonin, trombocita aktiváló faktor, melatonin, biliverdin és a szteroid hormonok [56]. Az ösztradiol hét lehetséges kötőhelyen képes kapcsolódni az ORM fehérjeláncához [79]. Szérum

fehérjékkel is interakcióba lép, bizonyították többek közt a plazminogén aktivátor inhibitor 1-es típusához (PAI-1) történő kötődését [80, 81].

A fizikokémiai tulajdonságai (magas sziálsav tartalom) miatt az ORM inkább pozitív töltésű, bázikus (propranolol, tamoxifen, dipyridamol, stb.) és neutrális (diazepam, carbamazepin, stb.) molekulákat transzportál, de savas karakterű gyógyszerek kötődését is leírták (fenobarbitál, retinolsav) [44, 56]. Az ORM a specifikus szállító fehérjéje a vanilloidoknak is (kapszaicin, resininfenatoxin), struktúráján egy vanilloid kötő alegységet találtak [82].

Az akut fázis reakció során emelkedő szérum ORM koncentráció jelentősen befolyásolhatja egyes gyógyszerek szabad plazmaszintjét, farmakokinetikáját. Az ORM genetikai variánsai, valamint glikoformjai is eltérő gyógyszerkötő affinitással rendelkezhetnek, így az ORM jelentősen befolyásolhatja a gyógyszerhatástant. Krónikus mieloid leukémia kezelése alatt kialakuló imatinib rezisztenciáért az emelkedett ORM szintek miatt fellépő farmakokinetikai változásokat teszik felelőssé [84, 85]. Továbbá az antivirális terápia (saquinavir, ritonavir és indinavir) hatástalansága hátterében is az emelkedett ORM szintek miatt bekövetkező csökkent szabad hatóanyag koncentráció feltételezhető [86].

Az ORM képes exogén toxikus ágensek megkötésére is (LPS), ezzel nem-specifikus védő mechanizmust biztosít a káros behatásokkal szemben [83].

I.2.4.2. Immunmodulátoros szerep

Az ORM egy jelentős akut fázis fehérje, így szérumszintje mind akut mind krónikus gyulladásokban, tumorokban emelkedik [43]. Az ORM számos anti-inflammatorikus és immunmoduláló aktivitását leírták. Csökkenti a gyulladásos válasz potenciálisan káros hatásait, melyhez feltételezhetően a gyulladásos szövetben történő lokális ORM szintézis (leukociták, endothel sejtek, szövetek) is hozzájárul.

In vitro tanulmányok kimutatták, hogy az ORM valamennyi immunsejt aktivitását képes befolyásolni. Gátolja a leukocita adhéziót és extravazációt, csökkenti a neutrofil aktivációt, kemotaxist és migrációt, valamint a szuperoxid

szabadgyökök képződését [43]. Feltehetően az ORM SLe^X csoportjai révén az endothel sejtek felszínén expresszálódó E-szelektinekhez kötődik, ezáltal kompetitíven gátolja a gyulladt területen akkumulálódó granulocitákat, és a további extravazációt [87, 88].

Az ORM részt vesz a D-vitamin mediált makrofág deaktivációban is. Egy D-vitamin válasz-régió (VDRE) van jelen az ORM1 gén promóter szakaszán, így a D-vitamin indukálhatja az ORM szintézist, mely gátolja a monociták pro-inflammtorikus citokin (TNF-α, IL-6) expresszióját, és fokozza a makrofág deaktivációt [89].

Az ORM reverzibilisen képes gátolni a limfocita proliferációt, csökkenti az IL-2 szintézist, valamint anti-komplement aktivitása és trombocita aggregációt gátló hatása is ismert. Leírták antiapoptotikus hatását is, valamint az ORM képes fokozni a fibroblaszt proliferációt, ezáltal segítheti a sebgyógyulást [43].

Állatkísérletek során kimutatták az ORM protektív tulajdonságait különböző gyulladásos állapotokban, sokkban, szepszisben [90-92]. Igazolták, hogy az ORM fontos szerepet tölt be a kapilláris permeabilitás szabályozásában, növeli az endothel sejtek negatív töltését és közreműködik a glycocalix fenntartásában, ezáltal részt vesz és a vitális szervek perfúziójának megtartásában. Az ORM közvetlenül is képes kapcsolatba lépni az endothel sejtekkel, valamint gátolja a hisztamin és a bradikinin hatásait [93-97].

Az ORM antimikrobiális aktivitását is leírták, ORM-el kezelt egerekben alacsonyabb bakteriémiát figyeltek meg, és szignifikánsan javult az állatok túlélése [90]. Az ORM képes az LPS-sel interakcióba lépni, az ORM-LPS komplex közvetlenül aktiválja a makrofágokat, ezáltal csökkenti az LPS direkt toxicitását [83].

I.2.5. Szérum ORM kórképekben

A szérum orosomucoidot (se-ORM) számos betegségben vizsgálták. Az ORM referencia tartománya szérumban 0,5-1,2 g/l, mely akut fázis reakciók során,

gyulladásos folyamatokban és malignus daganatokban 2-3-szorosára emelkedik [54].

A se-ORM klinikai használhatóságáról megoszlanak a vélemények, mivel nem-specifikus és nem kellően szenzitív gyulladásos marker.

Krónikus gyulladásos állapotok közül reumatoid arthritiszben vizsgálva, a CRP mellett legjobban használható aktivitási markerként írták le az emelkedett se-ORM koncentrációkat [98].

Daganatok közül kolorektális karcinómában a se-ORM szintjének szignifikáns emelkedését figyelték meg [99]. Előrehaladott prosztata rákban alkalmas lehet a daganatos folyamat monitorozására, hasonlóan a PSA-hoz [100].

Újabb klinikai kutatások során kiderült, hogy a se-ORM szintek segíthetnek az anyagcserezavarok felderítésében elhízott betegeknél [101].

Gyulladásos bélbetegségekben ideális markerként tartják számon a se-ORM emelkedését, mely előre jelezheti a relapszusokat, és aktivitási markerként is használható [102, 103].

Újabb eredmények alapján az emelkedett se-ORM szintek szepszisben is prognosztikus értékkel bírhatnak [104, 105].

I.2.6. Vizelet ORM kórképekben

Míg a szérum ORM kutatások száma magas, addig csak néhány kutatócsoport foglalkozott a vizelet ORM (u-ORM) szintek feltérképezésével. Az ORM molekulaméreténél fogva a glomerulusokban filtrálódhat, az egészséges egyének vizeletében is megtalálható, azonban a vizeletben való megjelenéséért felelős faktorok és mechanizmusok még nem tisztázottak.

Az emelkedett u-ORM szinteket 2-es típusú cukorbetegségben a kardiovaszkuláris mortalitás erős rizikófaktoraként írták le, összefüggésbe hozták a fennálló krónikus gyulladásos állapottal és az endothel diszfunkcióval [106-109].

Újabb vizsgálatok alapján az u-ORM korai markere lehet a szívelégtelenségnek is [110]. Ischaemiás szívbetegségben az orosomucoidot a proteinuria meghatározó komponenseként írták le, valamint emelkedett u-ORM ürítést találtak akut koronária szindrómában is [111].

Leukocita proliferációval járó betegségekben a szérumban és a vizeletben is magasabb ORM szinteket mértek [112].

Korábbi vizsgálatok pre-eclampsiában az u-ORM korai, fokozott ürítését bizonyították, így a szűrővizsgálatokban ígéretes szerepet tölthet be [113, 114].

Emelkedett u-ORM koncentrációt találtak hólyag tumoros betegeknél, a daganat kiterjedtségével, előrehaladottságával hozták összefüggésbe az u-ORM értékeket [115, 116].

Autoimmun betegségekben is fokozott u-ORM kiválasztást figyeltek meg. SLE-ben a lupus nephritis progressziójával korreláltak a magasabb u-ORM szintek [117], míg reumatoid arthritiszben a betegség aktivitásával mutattak ki összefüggést [118].

Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az u-ORM szintek emelkedése nem-specifikus, azonban monitorozása számos betegség esetén ígéretes lehet. Az eredmények azt sugallják, hogy az u-ORM potenciális markere a gyulladásos folyamatoknak, és kiegészítő információval szolgálhat a napi klinikai gyakorlat számára is.

A fent említett bíztató adatok ellenére, nem érhető el automata mérési mód u-ORM meghatározáshoz. A korábbi vizsgálatok különböző bonyolult labortechnikákat igénylő módszerekkel zajlottak (radiális immundiffúzió, ELISA, western blot), azonban ezek egyike sem alkalmas a rutin diagnosztikára.

A rutin klinikai gyakorlat gyors, megbízható, precíz és érzékeny automatizált mérési eljárást igényel, mellyel az u-ORM klinikai hasznosíthatósága is megítélhető.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja volt a vizelet orosomucoid szintek feltérképezése akut gyulladásos folyamatokban. Vizsgálni kívántuk, hogy az u-ORM alkalmas-e a szisztémás gyulladás súlyosságának megítélésére. Mivel nincs elérhető rutin eljárás az u-ORM meghatározásokhoz, így szükséges volt egy automata módszer beállítására méréseink elvégzéséhez.

Tanulmányunk céljai a következők voltak:

- Automatizált u-ORM mérési módszer kidolgozása, analitikai validálása.
- Referencia tartomány megállapítása egészséges egyének vizsgálata alapján.
- Az u-ORM szintek feltérképezése akut gyulladásban nem szenvedő, de különböző krónikus betegségekkel rendelkező egyéneknél. Ezzel vizsgálni kívántuk, hogy az alapbetegségek befolyásolják-e az u-ORM kiválasztást.
- Az u-ORM szintek vizsgálata intenzív osztályon kezelt súlyos szeptikus betegeknél. Azt feltételeztük, hogy az u-ORM egy korai markere a súlyos gyulladásnak, így szeptikus betegeknél vizsgálni kívántuk az u-ORM szintek:
    - Diagnosztikus értékét,
    - Időbeli lefolyását,
    - Prediktív értékét a kimenetelt illetően,
    - Összefüggését a súlyossággal és a szervelégtelenségekkel,
    - Összefüggését egyéb laborparaméterekkel.
- Az u-ORM kinetikájának monitorozása műtét indukálta szisztémás gyulladásos állapotban. Feltételezéseink szerint az u-ORM gyorsan és érzékenyen jelezheti a műtét utáni gyulladásos aktivitás mértékét. Szívműtött betegeknél vizsgálni kívántuk az u-ORM szintek:
    - Műtét előtti értékét, és hogy ez különbözik-e az egészséges egyénekétől, ill. összefüggésbe hozható-e társbetegségekkel,
    - Időbeli lefutását a műtét utáni időszakban,
    - Összefüggését a műtét utáni gyulladásos válasz mértékével és klasszikus gyulladásos paraméterekkel.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III.1. MÓDSZER VALIDÁLÁS AUTOMATIZÁLT VIZELET OROSOMUCOID MÉRÉSEKHEZ

III.1.1. Reagensek, készülék és módszer beállítások

Mivel az u-ORM meghatározásokhoz nem volt elérhető gyors és automatizált mérési mód, mely jól alkalmazható a napi gyakorlatban, ezért az u-ORM mérésekhez egy latex partikulumok által erősített turbidimetriás (PET) módszert dolgoztunk ki és adaptáltunk a cobas 8000 automata c502 moduljára (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország). Ehhez az applikációhoz nyitott fejlesztői csatornát használtunk.

Az u-ORM meghatározása nyúlban termeltetett anti-humán orosomucoid immunpartikulumokat tartalmazó reagenssel (ref. no. OA504, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánia) és a hozzá tartozó Reakciós pufferrel (ref. no. PO1812, Dako) történt. Az antigén- antitest- puffer- arányokat a módszer validálás alatt optimalizáltuk.

Figyelembe véve, hogy nincs elérhető kalibrátor és kontroll elegy vizelet minták ORM tartalmának meghatározásához, így se-ORM mérésekhez is alkalmazott oldatok megfelelő hígításait használtuk. A kalibrációkhoz (788 mg/l ORM tartalmú) Protein Standard SL for BN II Systems kalibrátor (ref. no. OQIM13, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Németország) hígításait alkalmaztuk, míg kontrollként az N/T Protein Control SL/L kontroll anyag (ref. no. OQIN13, Siemens) 2 különböző hígítását (4,13 és 0,83 mg/l) használtuk. Minden hígítás a kalibrátorok, kontrollok és minták esetében is steril fiziológiás sóoldattal (154 mmol/l NaCl) történt. Ugyancsak fiziológiás sóoldatot használtunk vak mintaként a kalibrációkhoz.

A reakció detektálása 546 nm-es hullámhosszon történt. Kétlépcsős végpontos (two-point end) mérési módot alkalmaztunk, delta abszorbancia számítással (az immunpartikulumok bemérése után, a 38. és a 70. mérési pontra kapott abszorbció különbség). A kalibrátor/kontrol/minta térfogata 7 µl, az

immunpartikulum reagens mennyisége 40 µl és a reakció puffer 130 µl volt. A módszerhez 6 pontos kalibrációt alkalmaztunk, (vak és 5 különböző kalibrátor hígítás) melyhez spline görbe-illesztést használtunk. A reakció 37 °C-on zajlott 10 percig.

III.1.2. Validálási protokoll

A módszer validálási protokollt az Eurachem Guideline ajánlásai alapján állítottuk össze [119]. Az analitikai határokat 30 független vak mérés (fiziológiás sóoldat) abszorbancia adataiból határoztuk meg, melyekből átlagot, szórást (SD) és variációs koefficienst (CV%) számoltunk. A kimutatási határt (limit of detection, LOD) az átlag + 3 SD, míg a meghatározási határt (limit of quantification, LOQ) az átlag + 10 SD értékekből számoltuk ki. A kapcsolódó koncentrációkat a megfelelő abszorbancia adatokból „cubic spline" algoritmussal az Origin Pro8 szoftver (Origin Lab Corporation, Northampton, USA) segítségével számoltuk vissza.

A módszer funkcionális szenzitivitása egy vizelet minta 5 pontos hígításából került meghatározásra (0,025-0,390 mg/l), melyekből 5 egymást követő napon, 2 parallel mérést végeztünk. A funkcionális szenzitivitást annál a legalacsonyabb koncentrációnál határoztuk meg, ahol a CV% elérte a 20%-ot.

A linearitást egy vizelet minta 10 lépcsős hígítási sorának 2 parallel méréséből ítéltük meg (0,10-4,68 mg/l).

A sorozaton belüli (intra-assay) és a sorozatok közti (inter-assay) precizitás megítéléséhez a PreciControl ClinChem Multi 2 (PC2, ref. no. 05117216 190, Roche) 845 mg/l ORM koncentrációjú anyag négy különböző hígítását használtuk. A sorozaton belüli pontatlanságot a hígítások ugyanazon a napon történő 10 párhuzamos mérésével határoztuk meg, míg a sorozatok közti pontatlansághoz 2 parallel mérést végeztünk 10 egymást követő napon. A mérési valódiságot ugyanezekből a hígításokból állapítottuk meg, a mért és a névleges értékekből kiszámítva és %-ban kifejezve.

Stabilitás vizsgálatokhoz 5 vizeletmintát (0,52-4,11 mg/l) választottunk ki, melyeket konzerváló szer hozzáadása nélkül teszteltünk. A mintákat centrifugálás után szétosztottuk, és additívum nélkül hűtőszekrényben 2-8 °C-on, lefedve tároltuk 10 napig. Az u-ORM koncentrációkat a mintavételt követően, majd a harmadik, ötödik, nyolcadik és tizedik napokon mértük. Az u-ORM stabilitását fagyasztás-olvasztási ciklusok során is teszteltük. A mintákat -70 °C-ra fagyasztottuk, majd 37 °C-on kiolvasztottuk, és u-ORM koncentrációkat 5 egymást követő ciklus során vizsgáltuk.

III.2. VIZSGÁLT CSOPORTOK, MINTAGYŰJTÉS

Vizsgálataink az „Új biomarkerek vizsgálati lehetőségei szeptikus betegeknél” című klinikai tanulmány keretében zajlottak, melyek elvégzéséhez a PTE Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyével rendelkeztünk (4327.316-2900/KK15/2011). A vizsgálatokat az engedélyezett protokolloknak megfelelően, a 2008-as Helsinki Deklarációban foglalt etikai ajánlások betartásával végeztük el. Minden résztvevőt tájékoztattunk a kutatások részleteiről, valamint a mintavételt és a vizsgálati protokollt illetően. Ezután minden résztvevőtől, ill. akadályoztatása esetén a hozzátartozóktól, valamint gyermekek esetén a szülőtől is írásos beleegyezést kaptunk a vizsgálatban történő önkéntes részvételről.

III.2.1. Referencia csoport

Az új, turbidimetriás u-ORM mérési módszerünkhöz referencia tartomány megállapítására volt szükség, melyhez több életkori csoportba tartozó egészséges egyéneket vizsgáltunk. Az ún. „Referencia csoport” tagjai (n=72) részben üzemorvosi vizsgálatra érkezők, részben egyetemi dolgozók és hallgatók, valamint egészséges tizenéves fiatalok voltak. Egészségesnek tekintettük azt a személyt, akinek nem volt ismert krónikus betegsége, nem szedett rendszeresen gyógyszert, valamint a mintavételkor nem volt panasza, sem akut betegségre utaló tünete.

Ezek alapján kizárási kritérium volt bárminemű gyulladás (fehérvérsejtszám (WBC), hsCRP és klinikai tünetek alapján), krónikus betegség (orvosi kartonok alapján) és a beleegyezés hiánya.

A csoport tagjaitól csak egyszeri vér- és vizelet mintavétel történt. Egyidejűleg nyert vénás vérmintákat és spontán ürített középsugár vizeletet elemeztünk.

III.2.2. Illesztett kontroll csoport

A különböző krónikus betegségek u-ORM kiválasztásra gyakorolt hatását alapbetegségekkel rendelkező, az intenzív osztályon kezelt betegekhez korban, nemben és egészségügyi problémákban is illeszkedő egyének bevonásával vizsgáltuk. Az „illesztett kontroll csoport" tagjai (n=30) részben üzemorvosi vizsgálatra érkezők, részben pedig a PTE KK Szemészeti Klinika vizsgálatra érkező ambuláns betegei voltak.

A csoport tagjainál kizárási kritériumok voltak az akut gyulladásos állapotok (WBC, hsCRP és klinikai tünetek alapján), a krónikus vesebetegség (orvosi dokumentáció, továbbá a szérum kreatinin (se-CREAT) és cisztatin C (se-CYSC) alapján), valamint a beleegyezés hiánya.

A csoport tagjaitól csak egyszeri vér- és vizelet mintavétel történt. Egyidejűleg nyert vénás vérmintákat és spontán középsugár vizeletet elemeztünk.

III.2.3. Intenzív osztályon kezelt betegcsoportok

Vizsgálataink során a PTE KK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetben kezelt SIRS-es (n=13) és súlyos szeptikus betegektől (n=43) vettünk mintákat.

Mivel anyaggyűjtésünk 2014. január és 2015. december között folyt, így az akkor érvényben lévő definíciókat és ajánlásokat alkalmaztuk tanulmányunk során [4, 23]. SIRS megállapításához az 1. Táblázatban foglaltak közül 2 vagy több kritérium teljesülése volt szükséges. Csak negatív hemokultúrájú betegek kerültek bevonásra a SIRS csoportba. A súlyos szepszis diagnosztikus kritériumát jelentették a SIRS-hez társuló mikrobiológiailag igazolt vagy gyanított fertőzés, emelkedett PCT szintek (>2 ng/ml bakteriális szepszis esetén), és legalább egy szervdiszfunkció, mely szepszis következtében alakult ki. A mikrobiológiai vizsgálatok a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetben történtek.

Az intenzív osztályon kezelt betegek esetén kizárási kritérium volt a krónikus vesebetegség, az uroszepszis és a beleegyezés hiánya.

A kritikus állapotú betegeknél követéses vizsgálatot folytattunk, a súlyos szeptikus betegek esetén az első minta a felvételt/ klinikai diagnózist követő 24 órán belül történt, majd az azt követő második, harmadik és ötödik napon. SIRS betegek esetén a mintavételt csak az első és második napon tudtuk elvégezni, mivel ők rövidebb intenzív osztályos felügyeletet igényeltek.

A SIRS-es és súlyos szeptikus betegektől a behelyezett artériás kanülből vettünk vérmintát, és a hólyag katéterből sterilen nyertünk vizeletet a vizsgálatainkhoz.

A felvételt követően a szepszis súlyosságát és a mortalitási valószínűséget a SAPS II [120], az APACHE II [121] és a SOFA [122] pontrendszerek alapján becsültük meg. 28 napos mortalitási adatok alapján a szeptikus betegeket túlélő és nem-túlélő csoportokra osztottuk.

A kialakult szervelégtelenségek közül az akut vese sérülést (AKI) a 2012-es KDIGO klasszifikáció alapján határoztuk meg [123]. A se-CREAT szintek mellett az AKI kimondását se-CYSC mérésekkel erősítettük meg, ahogy korábban mások is [124, 125]. Emelkedett se-CYSC értékekkel (≥0,3 mg/l emelkedés 48 órán belül, vagy ≥ 1,5x emelkedés a kiindulásihoz képest) vagy csökkent vizelet kiválasztással (<0,5 ml/kg/h 6 órán át) jellemzett betegek kerültek az AKI csoportba.

A kritikus állapotú betegek kezelése az érvényben lévő nemzetközi ajánlások szerint történt [23].

III.2.4. Nyitott szívműtéten átesett betegek

A műtét indukálta szisztémás gyulladás hatását szívműtött betegek monitorozásával vizsgáltuk. A PTE KK Szívgyógyászati Klinikán 2015. november és 2016. július között elektív, on-pump szívműtéten átesett betegeket vontunk be vizsgálatunkba (n=38).

A szívműtött betegeknél az akut vagy krónikus gyulladásos folyamatok, autoimmun betegségek, tumor, fertőzés, vesebetegség, akut koronária szindróma és a szívműtétet megelőző operatív beavatkozások jelentettek kizárási

kritériumokat, így szerettük volna kiküszöbölni ezen faktorok u-ORM szintekre gyakorolt hatását.

A szívműtött betegeknél követéses vizsgálatot folytattunk, az első mintavétel a műtét előtti napon történt, majd a műtét utáni első, harmadik és ötödik napon vettünk egyidejűleg vénás vér- és spontán ürített középsugár vizeletmintákat.

III.3. MINTÁK FELDOLGOZÁSA, KEZELÉSE

A vérmintákat zárt rendszerű (Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) vérvételi csövekbe vettük a napi rutin vérvételek alkalmával, így kutatásunk nem jelentett újabb megterhelést a betegeknek. Szérum esetén alvadásgátlót nem tartalmazó (natív) csöveket használtunk. A vizeletmintákat műanyag mintavételi csövekbe gyűjtöttük.

Centrifugálás után (1500g, 10 perc) a szérum és vizelet mintákat további felhasználásig szétporciózva -70 °C-on tároltuk.

A napi rutinméréseket kiegészítve, szérum mintáinkból gyulladásos paramétereket (hsCRP, PCT, se-ORM) és vesefunkciós markereket (se-CREAT, se-CYSC) mértünk. A vizeletmintákból automata módszerekkel összfehérjét, kreatinint, albumint és az általunk kidolgozott eljárással orosomucoidot határoztunk meg. Mivel nem gyűjtött, random vizeletmintákat elemeztünk, így az ajánlások alapján az u-ORM értékeket vizelet kreatininre (u-CREAT) vonatkoztattuk, hogy kiküszöböljük a vizelet mennyiség/töménység befolyásoló hatását [110]. Továbbá az u-ORM szinteket vizelet összfehérjére (u-TP) vonatkoztatva is kifejeztük, ezzel vizsgáltuk az u-ORM részarányát és relatív változásait a vizelet fehérjék közt. Ezek alapján az u-ORM adatokat nemcsak mg/l-es koncentrációban, de mg/mmol-ban u-ORM/u-CREAT-ként és %-os arányban (u-ORM/u-TP) is megadtuk.

III.4. RUTIN LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK

A napi rutin vérvételek során mért paraméterek közül csak a vizsgálatunkban kiemelt szerepet játszó gyulladásos paraméterek (WBC, hsCRP, PCT, se-ORM), valamint a vesefunkciós markerek (se-CREAT és se-CYSC) meghatározási módját kívánom ismertetni. Ezeken felül a tanulmányunk során használt rutin vizeletvizsgálatokat (összfehérje, kreatinin, albumin) mutatom be. Minden mérés a PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet akkreditált (NAH-1-1553/2016) laboratóriumában történt, rutin diagnosztikában használt, automatizált mérési módszerekkel.

III.4.1. Vérminták laboratóriumi vizsgálata

Fehérvérsejtszám (WBC): Vérkép vizsgálatok során mind a fehérvérsejtek, a vörösvértestek és a trombociták elkülönítése áramlásos citometriás optikai módszerrel történt K_2-EDTA véralvadásgátlót tartalmazó csövekből ADVIA 2120 hematológiai automatán (Siemens, Erlangen, Németország). Referencia tartományok: Vörösvértest: 3,9-6 T/l, WBC: 4-10 G/l, Trombocita szám: 140-440 G/l, Hemoglobin: 120-175 g/l, Haematokrit: 34,1-51%, (nemek és életkor szerinti tartományokat nem részleteztem).

A C-reaktív protein (hsCRP) mérés elve: Nagy érzékenységű - latex szemcsékkel erősített immunturbidimetriás C-reaktív protein meghatározás, mely során a minta CRP molekulái agglutinálnak a CRP elleni monoklonális antitestekkel fedett latex szemcsékkel. Az antitest-antigén komplex mennyiségét az automata turbidimetriásan határozza meg. A mérések szérum mintákból a cobas 8000/c702 modulon történtek (Roche). Referencia tartomány: <5 mg/l.

A szérum prokalcitonin (PCT) méréseket cobas e411 automatán (Roche) végeztük, szendvics elvű elektrokemilumineszcenciás immunkémiai módszerrel. Referencia tartomány: <0,5 ng/ml.

A szérum orosomucoid (se-ORM) mérések cobas Integra 400 plus automatán zajlottak (Roche) turbidimetriás immunkémiai vizsgálattal. Referencia tartomány: 0,5-1,2 g/l.

Szérum kreatinin (se-CREAT) meghatározása a Jaffé módszeren alapuló, korrigált, kinetikus kolorimetriás vizsgálattal történt. Alkalikus közegben a kreatinin pikrinsavval borostyán színű komplexet képez, melyet fotometriásan detektálunk. A méréseket cobas 8000/c702 automata analizátoron végeztük (Roche). Referencia tartományok: férfiak: 62-106 µmol/l, nők: 44-80 µmol/l.

Szérum cisztatin C (se-CYSC): Latex szemcsékkel növelt érzékenységű immunkémiai turbidimetriás vizsgálati eljárás, mely során a humán cisztatin C agglutinál a szemcsék felszínehez kötött antitestekkel, az aggregátumok 546 nm-en turbidimetriásan detektálhatóak. A se-CYSC értékeket cobas 8000/c502 modulon mértük (Roche). Referencia tartomány: 0,61-0,95 mg/l.

4. Ábra: A cobas 8000 automata

III.4.2. Vizelet vizsgálatok

Vizelet összfehéje (u-TP) mérés során benzetónium-klorid reagál a fehérjékkel bázikus közegben, és a megváltozott turbiditást lehet detektálni. A méréseket cobas 8000/c502 analizátoron végeztük el. Referencia tartomány: <150 mg/l (random vizelet minták esetén).

A vizelet kreatinin (u-CREAT) mérés elve megegyezik a szérum kreatinin meghatározásával (Jaffé reakció), csak a hígítás mértéke eltérő. A mintákat cobas 8000/c702 modulon mértük. Referencia tartomány: férfiak: 3,45-22,9 mmol/l, nők: 2,47-19,2 mmol/l.

A vizelet albumin (u-ALB) mérés elve: A humán albumin elleni poliklonális (birka) antitestek reakcióba lépnek az albuminnal, antigén-antitest komplexek jönnek létre, és az agglutináció után a komplexek mennyisége mérhető. Az u-ALB méréseket turbidimetriás immunkémiai vizsgálattal végeztük cobas 8000/c502 automatán. Referencia tartomány: <20mg/l (<2,26 mg/mmol).

III.5. STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

Statisztikai analízisekhez az SPSS (Statistical Package for the Social Sciences for Windows) statisztikai elemző szoftver 22-es verzióját használtuk (IBM Corporation, New York, USA).

Normalitás vizsgálat után (Shapiro-Wilk teszt), változóink nem normál eloszlást mutattak, így nem-paraméteres teszteket alkalmaztunk az elemzések során. A csoportok összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet (2 csoport), illetve több csoport vizsgálata estén Kruskal Wallis tesztet használtunk. A követés alatti változásokat Wilcoxon teszttel (2 nap), ill. Friedman próbával (több nap) vizsgáltuk. A paraméterek diagnosztikus hatékonyságát és prediktív értékét ROC (receiver operating characteristic) görbével vizsgáltuk, melyet a görbe alatti területtel (AUC ROC) jellemeztünk. Továbbá többváltozós logisztikus regressziós analízist végeztünk a változók klinikai hatásának megítélésére, melyet esély hányadossal (OR) és a hozzátartozó 95% konfidencia intervallumokkal (95% CI) szemléltettünk. A korrelációs elemzésekhez Spearman tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzések során a $p<0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

A folytonos változók esetén a medián és interkvartilis (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel, valamint a módszerhez tartozó referencia tartományt az u-ORM, u-ORM/u-CREAT és u-ORM/u-TP esetén 2,5-97,5 percentilisként írtuk le.

IV. EREDMÉNYEK

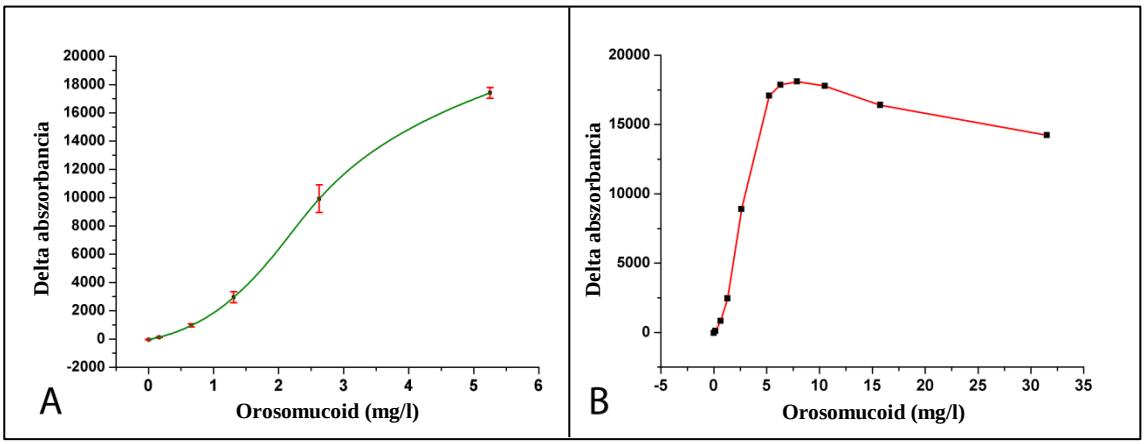
IV.1. MÓDSZER VALIDÁLÁS

Az u-ORM meghatározásokhoz a kalibrált tartományt 0,16-5,25 mg/l közt állítottuk be. A 22 független kalibrációból nyert egyesített kalibrációs görbe az 5/A Ábrán látható. Széles koncentráció tartomány (0,1-31,5 mg/l) vizsgálata során megfigyelt szűk biztonsági zóna és a görbe visszahajlása miatt (5/B Ábra), az 5,25 mg/l feletti u-ORM koncentrációjú mintákat hígítani kellett. Az alsó kalibrátor (0,16 mg/l) alatti mintákat azonban a kvantifikálási határig megbízhatóan lehetett mérni. Az analitikai határok értékeire kielégítően alacsony koncentrációkat kaptunk (LOD=0,02 mg/l, LOQ=0,08 mg/l).

A módszer funkcionális szenzitivitását 0,03 mg/l értéknél határoztuk meg (6/A Ábra). A mérések megfelelő linearitást mutattak (R^2=0,999) a 0,10-4,68 mg/l tartományon belül (6/B Ábra).

A sorozaton belüli és a sorozatok közti pontatlanság is minden vizsgált szinten 5,0 CV% alatt volt, továbbá a mérési valódiság vizsgálata során is 95,69-102,51% közötti eredményeket kaptunk. (4. Táblázat).

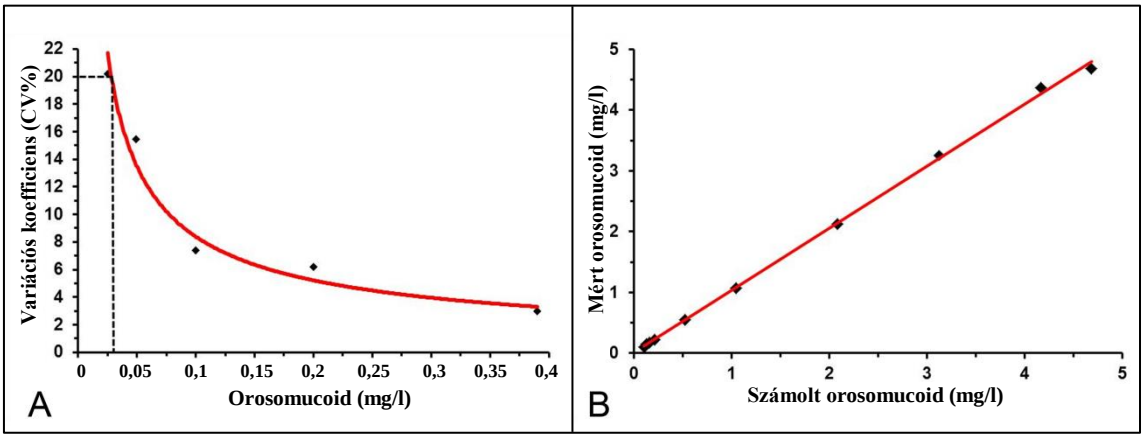
5. Ábra: Kalibrációs (A) és dózis válasz (B) görbe az u-ORM mérésekhez



A: 6 pontos kalibrációs görbe a 0-5,25 mg/l közötti tartományban spline görbe-illesztéssel. Az ábra 22 független kalibráció átlag ±szórás értékeit szemlélteti.

B: Dózis-válasz görbe 0,1-31,5 mg/l között

6. Ábra: Funkcionális szenzitivitás (A) és linearitás (B)



A: A funkcionális szenzitivitást 0,03 mg/l értéknél határoztuk meg (szaggatott vonal)

B: A linearitás vizsgálata 0,10-4,68 mg/l között (a mérések átlagait szemléltettük). A regressziós egyenes (y = bx + a) egyenlete: y = 1,021 x + 0,015; R^2 = 0,999.

Stabilitás vizsgálatok

A hűtőszekrényben 2-8 °C-os tárolás során 10 nap alatt nem találtunk különbségeket az u–ORM visszanyerhetőségében, a vizelet minták u-ORM koncentrációja meglehetősen stabil maradt (97,2-109,2%). Továbbá nem találtunk szignifikáns csökkenést az u-ORM koncentrációkban az egymást követő fagyasztás-olvasztás ciklusok során. Még az ötödik ciklus után is kielégítő maradt az u-ORM visszanyerhetősége, ahogy azt az 5. Táblázat szemlélteti.

4. Táblázat: Sorozaton belüli és sorozatok közti pontatlanság és valódiság vizsgálata

Névérték, mg/l	Sorozaton belül (n=10)			Sorozatok között (n=20)		
	Átlag±SD, mg/l	Pontatlanság CV%	Valódiság, %	Átlag±SD, mg/l	Pontatlanság CV%	Valódiság, %
3,86	3,73±0,08	2,01	96,70	3,83±0,13	3,50	99,24
2,11	2,06±0,01	0,45	97,98	2,17±0,04	1,77	102,51
0,64	0,62±0,01	1,92	95,69	0,63±0,03	4,29	98,31
0,30	0,30±0,01	4,44	100,71	0,30±0,01	4,55	100,18

SD: szórás, CV%: variációs koefficiens

5. Táblázat: U-ORM stabilitás vizsgálatok

Kiindulási koncentráció, mg/l	Tárolás 2-8 °C-on				Fagyasztás-olvasztás ciklusok				
	3.nap %	5.nap %	8.nap %	10.nap %	1. ciklus, %	2. ciklus, %	3. ciklus, %	4. ciklus, %	5. ciklus, %
4,11	98,4	103,6	105,7	109,2	106,3	108,3	109,5	111,7	112,9
3,61	99,1	101,5	102,4	106,6	105,5	106,7	106,4	105,3	104,6
2,74	98,9	100,5	103,0	105,8	104,6	105,7	104,2	104,5	103,6
1,23	97,2	98,8	99,1	107,9	106,3	108,2	109,4	112,6	113,1
0,52	104,5	98,8	-*	-*	104,5	104,8	102,0	107,6	110,0

Az u-ORM szinteket a kiindulási koncentrációra vonatkoztattuk, és %-ban fejeztük ki.

*: technikai okok miatt (alacsony mintatérfogat) a mintát nem tudtuk mérni

IV.2. REFERENCIA TARTOMÁNY MEGHATÁROZÁSA

A vizsgálatunkban résztvevő 72 egészséges - referencia egyénből 3 életkori csoportot alkottunk: 10-20, 21-40, 41-60 éves korosztály.

Az u-ORM szintek tekintetében nem találtunk szignifikáns különbségeket az egészséges egyének korcsoportjai között, ezért közös referencia tartományt határoztunk meg 10-60 év között (6. Táblázat). A spontán vizelet minták vizsgálata alapján a következő referencia intervallumokat állapítottuk meg (medián (2,5-97,5 percentilesek)): u-ORM: 0,69 (0,13-2,96) mg/l; u-ORM/u-CREAT: 0,08 (0,01-0,24) mg/mmol; u-ORM/u-TP: 1,00 (0,21-3,58) %.

Nem volt szignifikáns különbség a nők és a férfiak között az u-ORM/u-CREAT –ként kifejezett értékek esetén a 3 életkori csoportban. Ugyanakkor, a 41-60 év közti férfiaknál magasabb u-ORM koncentrációkat (p=0,034) és u-ORM/u-TP részarányt (p=0,023) figyeltünk meg, szemben ezen korcsoporton belüli nőkkel (férfiak: 1,30 (0,78-2,65) mg/l és 2,29 (1,66-3,58) % vs nők: 0,49 (0,20-1,10) mg/l és 0,62 (0,48-1,57) %).

6. Táblázat: U-ORM referencia tartományok az egészséges egyéneknél

	Korcsoport 1	**Korcsoport 2**	**Korcsoport 3**	**p érték**	**Összesített csoport**
elemszám, n	30	19	23	-	72
nők, n (%)	13 (43,3)	9 (47,4)	15 (65,2)	-	37 (51,4)
életkor, évek	14 (10-18)	29 (21-39)	51 (40-58)	-	23 (10-58)
u-ORM, mg/l	0,56 (0,10-2,96)	0,71 (0,25-2,30)	0,76 (0,14-2,64)	ns	0,69 (0,13-2,96)
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,09 (0,02-0,19)	0,07 (0,01-0,35)	0,08 (0,02-0,24)	ns	0,08 (0,01-0,24)
u-ORM/u-TP, %	0,91 (0,21-2,34)	1,09 (0,24-3,24)	1,36 (0,32-4,32)	ns	1,00 (0,21-3,58)

A csoportok összehasonlításához Kruskal Wallis tesztet használtunk. A folytonos változók esetén a medián (2,5-97,5 percentilis) értékeket tüntettük fel, kivéve az életkort, ott medián (min-max). ns: nem szignifikáns

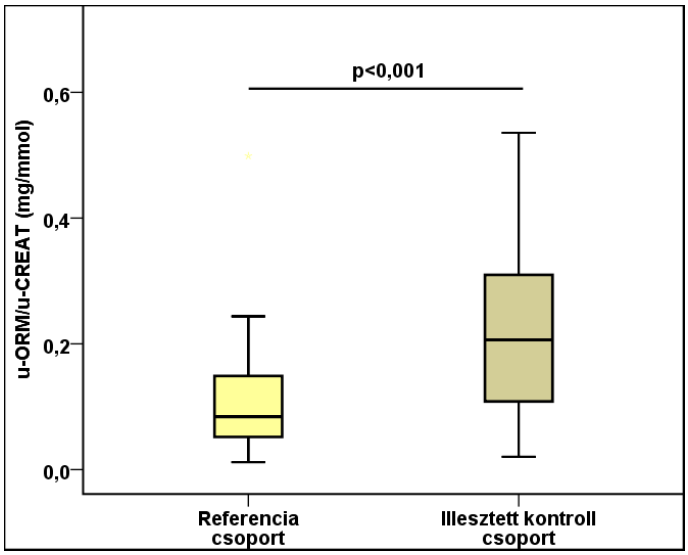
IV.3. ILLESZTETT KONTROLL CSOPORT VIZSGÁLATA

Az intenzív osztályon kezelt kritikus állapotú betegekhez illesztett kontroll csoport (30 fő) tagjai a referencia egyéneknél idősebb, különböző alapbetegségektől szenvedő (hipertónia, diabetes, COPD, stb.), gyógyszereket szedő egyének voltak.

Megfigyeltük, hogy az illesztett kontroll csoport u-ORM kiválasztása magasabb, mint az egészségeseké ($p<0,001$), 2-3-szoros emelkedést tapasztaltunk az u-ORM/u-CREAT szintek tekintetében az egészséges - referencia egyénekhez képest (7. Ábra és 7. Táblázat). Ugyancsak magasabb hsCRP szinteket találtunk ($p=0,03$), ám a se-ORM értékek nem különböztek a két csoport között.

Az illesztett kontroll csoporton belül a férfiak és nők között nem találtunk különbségeket az u-ORM szintek tekintetében, valamint nem volt különbség a különböző alapbetegségekkel rendelkező egyének u-ORM/u-CREAT értékeiben sem. Továbbá a vesefunkciós paramétereik is a referencia tartományon belül mozogtak.

7. Ábra: Az u-ORM/u-CREAT szintek emelkedése az illesztett kontroll csoportban



7. Táblázat: A referencia csoport és a kontroll csoport adatai

	Referencia egyének	Illesztett kontrollok	p érték
elemszám, n	72	30	-
nők, n (%)	37 (51,4)	14 (46,7)	-
életkor, évek	23 (14-45)	58 (49-69)	<0,001
WBC, G/l	6,5 (4,5-7,9)	6,7 (5,5-8,2)	ns
hsCRP, mg/l	0,6 (0,3-1,5)	1,0 (0,5-2,2)	0,03
se-ORM, g/l	0,8 (0,6-0,9)	0,8 (0,7-0,9)	ns
se-CREAT, µmol/l	64 (55-75)	73 (66-81)	0,005
se-CYSC, mg/l	0,8 (0,7-1,0)	0,9 (0,9-1,0)	ns
u-TP, mg/l	60 (30-80)	60 (50-90)	ns
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0,51 (0,25-1,71)	0,71 (0,49-1,37)	ns
u-ORM, mg/l	0,69 (0,33-1,13)	1,6 (0,7-2,8)	<0,001
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,08 (0,05-0,15)	0,2 (0,1-0,3)	<0,001
u-ORM/u-TP, %	1,00 (0,54-1,69)	2,2 (1,6-4,0)	<0,001

A csoportok összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet használtunk, a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns

IV.4. INTENZÍV OSZTÁLYON KEZELT BETEGCSOPORTOK VIZSGÁLATA

Vizsgálatunkba 13 SIRS és 43 súlyos szeptikus beteg került bevonásra. Az ITO-n kezelt betegcsoportok adatait a 30 fős illesztett kontroll csoporthoz viszonyítottuk, mivel ezen csoportok alap demográfiai adatai hasonlóak voltak (8. Táblázat).

8. Táblázat: Intenzív osztályon kezelt betegek demográfiai adatai

	Illesztett kontrollok	**SIRS**	**Szepszis**
elemszám, n	30	13	43
nők, n (%)	14 (46,7)	4 (30,8)	17 (39,5)
életkor, évek	58 (49-69)	62 (54-70)	67 (57-76)
Alapbetegségek, n (%)			
kardiovaszkuláris megbetegedések	18 (60,0)	10 (76,9)	28 (65,1)
diabetes mellitus	5 (16,7)	3 (23,1)	11 (25,6)
tüdőbetegségek	1 (3,3)	6 (46,2)	16 (37,2)
tumor	0 (0)	6 (46,2)	15 (34,9)

A kritikus állapotú betegeink közül több beteg került felvételre műtéti beavatkozás után, mint belgyógyászati okokból. A SIRS-es betegek általában csak rövidebb, 2 napos intenzív terápiás felügyeletet igényeltek, ezután más osztályokra lettek áthelyezve, egyiküknél sem alakult ki szepszis.

A szeptikus betegek átlagosan közel 6 napos intenzív terápiát igényeltek. Az 5 napos követés alatt a súlyos szeptikus betegek 28%-a elhunyt, a 28-napos halálozás pedig 47%-os volt (9. Táblázat).

Minden bevont SIRS páciens negatív hemokultúrával rendelkezett. A szeptikus betegeknél 9 esetben maradt azonosítatlan a kórokozó. A leggyakrabban azonosított Gram-negatív mikroorganizmus az *Escherichia coli* volt, míg Gram-pozítív baktériumok közül leggyakrabban a *Staphylococcus* fajok fordultak elő.

Gomba infekciót leginkább Candida fajok okoztak. További mikrobiológiai és klinikai adatok a 9. Táblázatban láthatóak.

9. Táblázat: Intenzív osztályon kezelt betegek klinikai és mikrobiológiai adatai

	SIRS	Szepszis	p érték
elemszám, n	13	43	-
Felvétel típusa, n (%)			
belgyógyászati ok	3 (23,1)	17 (39,5)	-
sebészeti ok	10 (76,9)	26 (60,5)	-
ITO kezelés hossza, napok	2 (1-2)	6 (3-11)	<0,001
5-napos halálozás, n (%)	0 (0)	12 (27,9)	0,046
28-napos halálozás, n (%)	1 (7,7)	20 (46,5)	0,014
Prognosztikus pontrendszerek			
APACHE II score	8 (6-14)	19 (13-24)	<0,001
SAPSII score	25 (18-31)	50 (34-57)	<0,001
SOFA score	4 (2-5)	8 (7-11)	<0,001
Szervelégtelenségek, n (%)			
1 szervi elégtelenség	-	7 (16,2)	-
2 szervi elégtelenség	-	15 (34,9)	-
3 szervi elégtelenség	-	8 (18,6)	-
≥4 szervi elégtelenség	-	13 (30,2)	-
szeptikus sokk	-	28 (65,1)	-
akut vese sérülés	-	22 (51,2)	-
Patogének, n (%)			
nem identifikált	13 (100)	9 (20,9)	-
kevert (Baktérium+Gomba)	-	23 (53,5)	-
Gram-negatív baktérium	-	5 (11,6)	-
Gram-pozitív baktérium	-	3 (6,9)	-
gomba	-	3 (6,9)	-

A csoportok összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet használtunk, a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel.

Felvételi laboradatok SIRS és szepszis elkülönítésében

A szokványos gyulladásos markerek mellett (WBC, hsCRP, PCT) a szérum és vizelet orosomucoid szintek is korai emelkedést mutattak; SIRS-ben és szepszisben is szignifikánsan magasabb (p<0,001) értékeket találtunk a kontrollokhoz képest. Közel tízszer magasabb u-ORM/u-CREAT értékeket találtunk szepszisben, mint SIRS- ben (10. Táblázat, 8/A Ábra).

10. Táblázat: Intenzív osztályon kezelt betegek laboratóriumi adatai felvételkor

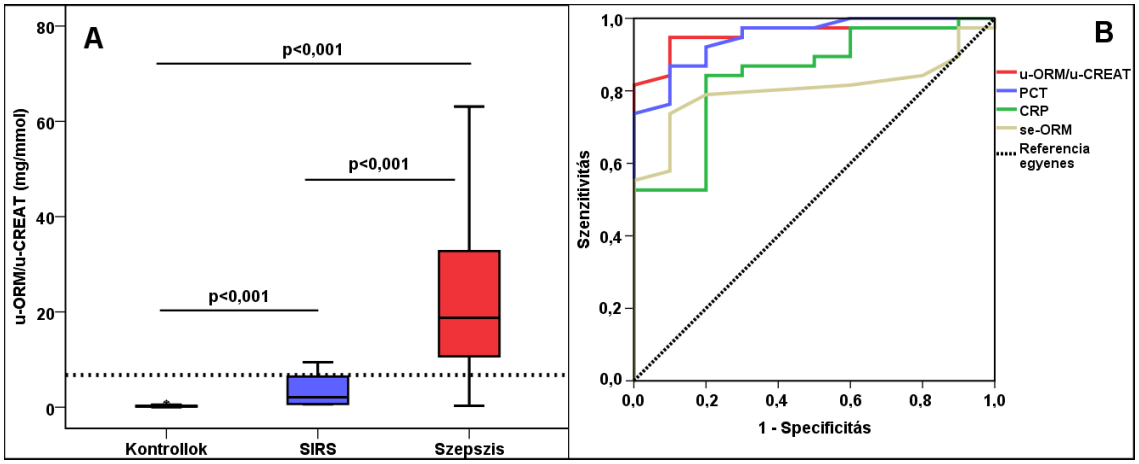
	Illesztett kontrollok	SIRS	Szepszis	p érték
elemszám, n	30	13	43	-
PCT, ng/ml	-	0,4 (0,3-0,7)	15,4 (4,4-33,5)	<0,001
WBC, G/l	6,7 (5,5-8,2)	11,0 (9,1-14,8)	14,0 (7,5-16,7)	<0,001[a,b]
hsCRP, mg/l	1,0 (0,5-2,2)	92,4 (56,4-227,9)	228,5 (138,6-336,4)	<0,001[a,b,c]
se-ORM, g/l	0,8 (0,7-0,9)	1,2 (1,1-1,3)	1,7 (1,3-2,1)	<0,001[a,b,c]
se-CREAT, µmol/l	73 (66-81)	70 (59-81)	127 (94-182)	<0,001[b,c]
se-CYSC, mg/l	0,9 (0,9-1,0)	0,9 (0,7-1,1)	1,8 (1,5-2,3)	<0,001[b,c]
u-TP, mg/l	60 (50-90)	160 (89-410)	427 (150-850)	<0,001[a,b,c]
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0,71 (0,49-1,37)	3,82 (1,44-4,78)	14,68 (3,51-40,90)	<0,001[a,b,c]
u-ORM, mg/l	1,61 (0,71-2,78)	14,90 (7,2-27,2)	89,41 (28,22-145,89)	<0,001[a,b,c]
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,21 (0,11-0,30)	2,06 (0,72-6,36)	19,20 (11,43-32,78)	<0,001[a,b,c]
u-ORM/u-TP, %	2,20 (1,64-4,01)	10,21 (3,59-11,92)	18,53 (10,21-34,02)	<0,001[a,b,c]

A csoportok összehasonlításához Kruskal Wallis tesztet használtunk. A folytonos változók esetén a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns. A betűk felsőindexben jelzik a post hoc analízisek eredményeit: [a]: kontroll vs SIRS: p<0,001, [b]: kontroll vs szepszis: p<0,001, [c]: SIRS vs szepszis: p<0,05. PCT –t a kontroll csoportnál nem mértünk.

ROC analíziseket végeztünk a laborparaméterek diagnosztikus képességének megítélésére. A súlyos szepszis SIRS-től való elkülönítésében a görbe alatti terület 0,954 volt u-ORM/u-CREAT esetén, amely hasonló volt a PCT-hez

(0,949), és nagyobb, mint a se-ORM szintekhez tartozó 0,804, és a hsCRP 0,845 értékei (8/B Ábra). A ROC analízisek alapján a SIRS szepszistől való elkülönítéséhez 94,7% érzékenységgel és 90% fajlagossággal cut-off értéket határoztunk meg a 6,75 mg/mmol u-ORM/u-CREAT értéknél. (A diagnosztikus képesség vizsgálatához a dializált betegeket kizártuk, hogy elkerüljük ennek befolyásoló hatását- lásd később).

8. Ábra: Felvételi u-ORM/u-CREAT diagnosztikus értéke szepszisben



A: Az u-ORM/u-CREAT értékek összehasonlítása az illesztett kontroll csoport, a SIRS-es és szeptikus betegek között. A pontozott vonal szemlélteti a 6,75 mg/mmol-os cut-off értéket. Az extrém kiugró értékek nincsenek ábrázolva.

B: ROC analízisek a SIRS és szepszis elkülönítésére.

Logisztikus regressziós elemzéseink kimutatták, hogy az emelkedett u-ORM/u-CREAT, hasonlóan a PCT és a hsCRP szintekhez szignifikáns ($p<0,05$) indikátorai a szepszisnek. A következő OR értékeket kaptuk: u-ORM/u-CREAT: 1,56 (95% CI: 1,14– 2,14), PCT: 2,37 (95% CI: 1,23–4,57) és hsCRP: 1,02 (95% CI: 1,01–1,02).

Vizelet orosomucoid szintek időbeli alakulása szepszisben

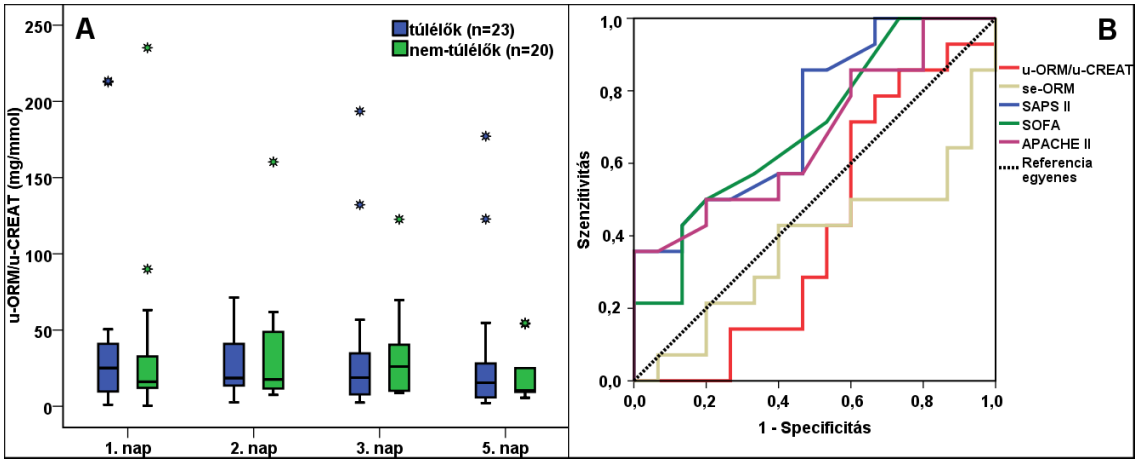
SIRS betegek esetén a 2 napos monitorozás alatt nem figyeltünk meg szignifikáns változást az u-ORM/u-CREAT szintek esetén, ugyanúgy az 5 napos

követés alatt szepszisben sem. Továbbá a vizsgált periódus alatt nem volt különbség az u-ORM/u-CREAT szintekben a túlélő (n=23) és nem-túlélő (n=20) szeptikus betegek közt. A minták vizsgálata során néhány esetben azonban megfigyeltünk kiugróan magas, extrém u-ORM/u-CREAT értékeket, melyeket a későbbiekben részletezünk (9/A Ábra).

Mortalitás becslés

A felvételi u-ORM/u-CREAT szintek prediktív értékét szepszisben ROC analízissel vizsgáltuk (9/B Ábra). A 28 napos mortalitás előrejelzésére az AUC ROC 0,414 volt u-ORM/u-CREAT és 0,376 volt se-ORM esetén, szemben a prognosztikus pontrendszerekhez tartozó magasabb értékekkel (SAPS II: 0,731, APACHE II: 0,676, SOFA: 0,698).

9. Ábra: U-ORM/u-CREAT szintek túlélő és nem-túlélő betegeknél szepszisben



A: 5 napos követés szepszisben. A csillagok az extrém, kiugró értékeket jelölik. A követés alatt nem volt szignifikáns különbség.

B: ROC analízisek a 28 napos mortalitás prognosztikus értékét tekintve szepszisben.

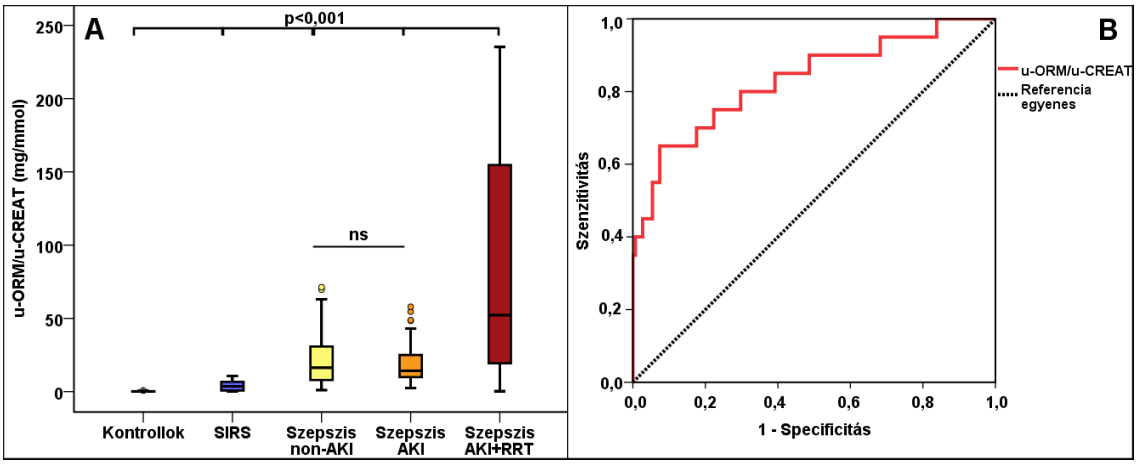
Alcsoport elemzéseink során az u-ORM/u-CREAT értékek hasonlóan magasak voltak függetlenül attól, hogy mikrobiológiailag milyen kórokozó ágens igazolódott a szepszis hátterében. Nem találtunk különbséget a fertőzés

helye/eredete ill. eltérő felvételi okok (belgyógyászati/sebészeti) közt sem. Az u-ORM/u-CREAT értékek a szeptikus sokkos betegek, és a háromnál több szervi elégtelen betegek esetében sem különböztek az ezekkel nem rendelkező betegekétől. Nem találtunk kapcsolatot a vazopressor ill. diuretikum igénnyel sem. Az u-ORM exkréció oliguriás betegeknél is emelkedett volt.

Szepszis következtében kialakult AKI és u-ORM/u-CREAT szintek

A 22 AKI betegből 9 akut dialízisre szorult. Minden korábban megfigyelt kiugróan magas u-ORM/u-CREAT érték, melyeket a 9/A Ábra szemléltet, dializált betegektől származott. Extrémen emelkedett u-ORM/u-CREAT szinteket mértünk (p<0,001) a dializált betegektől származó vizelet mintákban (52,2 (19,4-154,7) mg/mmol), szemben a nem dializált szeptikus betegek mintáival. A nem dializált AKI és nem-AKI betegek vizelet mintáiban mért u-ORM szintek között azonban nem találtunk különbséget (14,1 (9,9-25,0) mg/mmol vs 16,3 (7,9-30,8) mg/mmol), mint ahogy a 10/A Ábrán látható. A dialízis igény előrejelzésében az AUC ROC u-ORM/u-CREAT esetén 0,831 volt (10/B Ábra).

10. Ábra: U-ORM/u-CREAT szintek AKI-ban



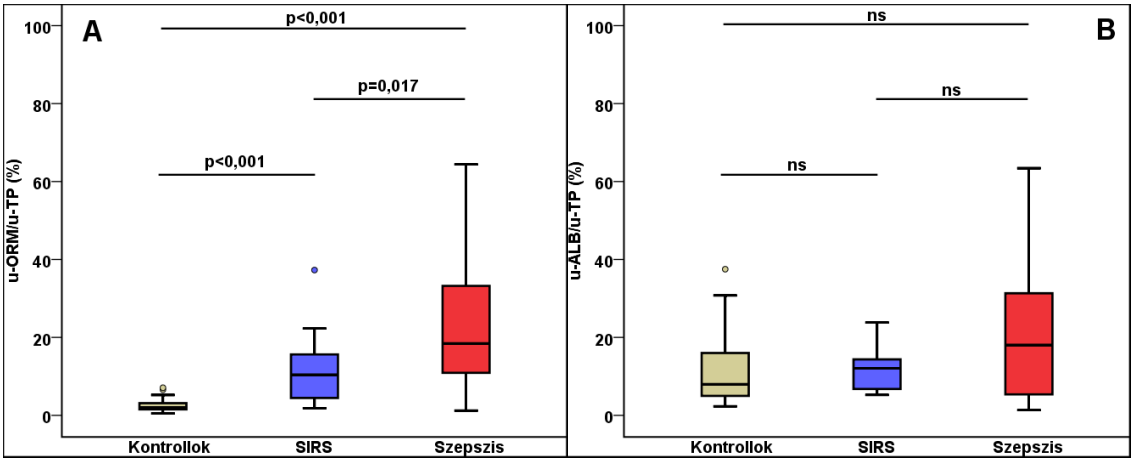
A: Az u-ORM/u-CREAT szintek összehasonlítása AKI és nem-AKI csoportok közt. RRT: renal replacement therapy (dialízis), ns: nem szignifikáns

B: ROC analízis az u-ORM/u-CREAT értékek dialízist jelző képességéről

Albuminuria és orosomucoiduria gyulladás során

Vizsgáltuk a vizeletfehérjék összetételének változásait gyulladás során. Mind a SIRS-es, mind a szeptikus betegek közt szignifikánsan magasabb u-ORM részarányt figyeltünk meg a kontrollokhoz képest (p<0,001, 10. Táblázat, 11/A Ábra). A kontrolloknál mintegy 1,6-4,0 %-ban volt jelen az orosomucoid a vizeletfehérjék közt, míg SIRS-ben elérte a 3,6-11,9 %-ot, szepszisben pedig a vizeletfehérjék 10,2-34,0 %-át tette ki. Ezzel szemben az u-ALB/u-TP arány nem változott szignifikánsan a szisztémás gyulladás hatására (11/B Ábra).

11. Ábra: Orosomucoiduria (A) és albuminuria (B) szisztémás gyulladás során



A: Az orsomucoid részaránya a vizeletfehérjék között (u-ORM/u-TP).

B: Az albumin részaránya a vizeletfehérjék között (u-ALB/u-TP).

Korrelációs vizsgálatok

Szignifikáns (p<0,001) korrelációkat találtunk az u-ORM/u-CREAT és a közismert gyulladásos paraméterek között, mint a se-ORM (0,693), a hsCRP (0,600), valamint a WBC (0,407) és a PCT (0,348). Továbbá, u-ORM/u-CREAT közvetlenül korrelált a vesefunkciós markerekkel: se-CYSC (0,488), se-kreatinin (0,318). Gyenge kapcsolatot találtunk az APACHE II pontrendszerrel (0,339, p=0,024), de egyéb asszociációt nem találtunk a szervelégtelenségeket jelző paraméterekkel. A vizelet ORM koncentráció erősen korrelált a vizelet összfehérje szintekkel (0,844, p<0,001).

IV.5. SZÍVMŰTÖTT BETEGEK VIZSGÁLATA

A vizsgálatba 38 nyitott szívműtéten és extrakorporális keringésen átesett beteget vontunk be, az adataikat 42 egészséges felnőtthöz (Referencia csoport tagjai) viszonyítottuk. A betegek demográfiai adatai és alap laborértékei a 11. Táblázatban láthatók.

11. Táblázat: Szívműtött betegek demográfiai és műtét előtti laboratóriumi adatai

	Referencia egyének	**Szívműtött betegek**	**p érték**
elemszám, n	42	38	-
nők, n (%)	24 (57,1)	15 (39,5)	-
életkor, évek	45 (32-53)	67 (60-73)	<0,001
Alapbetegségek, n (%)			
kardiovaszkuláris megbetegedések	0	38 (100)	-
diabetes mellitus	0	12 (31,6)	-
tüdőbetegségek	0	7 (18,4)	-
korábbi szívműtét	0	3 (7,9)	-
Műtét előtti laboratóriumi adatok			
WBC, G/l	6,4 (4,9-7,5)	7,0 (6,4-4,8)	0,035
hsCRP, mg/l	0,9 (0,5-1,8)	2,2 (1,2-3,9)	<0,001
se-ORM, mg/l	0,8 (0,7-0,9)	0,7 (0,6-0,9)	ns
se-CREAT, µmol/l	75 (63-81)	76 (67-84)	ns
se-CYSC, mg/l	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-1,0)	ns
u-TP, mg/l	60 (40-70)	60 (30-70)	ns
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0,49 (0,26-1,65)	0,58 (0,41-1,89)	ns
u-ORM, mg/l	0,79 (0,36-1,16)	1,92 (0,64-4,56)	0,002
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,08 (0,06-0,15)	0,29 (0,16-0,42)	<0,001
u-ORM/u-TP, %	1,47 (0,6-2,1)	2,96 (1,90-5,07)	<0,001

A csoportok összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet használtunk, a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns

A 38 szívműtött betegből, 20 fő koszorúér bypass műtéten (CABG, coronary artery bypass grafting) esett át, és 18 főnél aorta billentyű csere (AVR, aortic valve replacement) műtétre került sor (12. Táblázat). A CABG és AVR betegek demográfiai adataiban nem volt különbség, hasonló volt az operatív stressz is (operációs idő, aorta kirekesztés, stb.). A szívműtét után a legtöbb beteg mindössze egynapos ITO felügyeletet igényelt. A műtétet követő hatvanadik napon valamennyi szívműtött beteg életben volt (12. Táblázat)

12. Táblázat: Szívműtött betegek klinikai adatai

	CABG	**AVR**	**p érték**
elemszám, n	20	18	-
nők, n (%)	7 (35,0)	8 (44,4)	-
életkor, évek	65 (54-72)	68 (62-74)	ns
Euroscore	5 (3-7)	6 (4-8)	ns
műtéti idő, perc	163 (150-201)	155 (133-190)	ns
aorta kirekesztési idő, perc	52 (45-81)	63 (45-92)	ns
cardioplegia, ml	750 (500-800)	800 (500-1000)	ns
vérveszteség, ml	220 (170-395)	210 (160-300)	ns
ITO kezelés, napok	1 (1-2)	1 (1-2)	ns
kórházi bentfekvés, napok	8 (7-11)	8 (7-10)	ns
láz, n (%)	8 (40,0)	6 (33,3)	-

A csoportok összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet használtunk, a medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel. ns: nem szignifikáns, ITO: intenzív terápiás osztály, CABG: coronary artery bypass grafting, AVR: aortic valve replacement

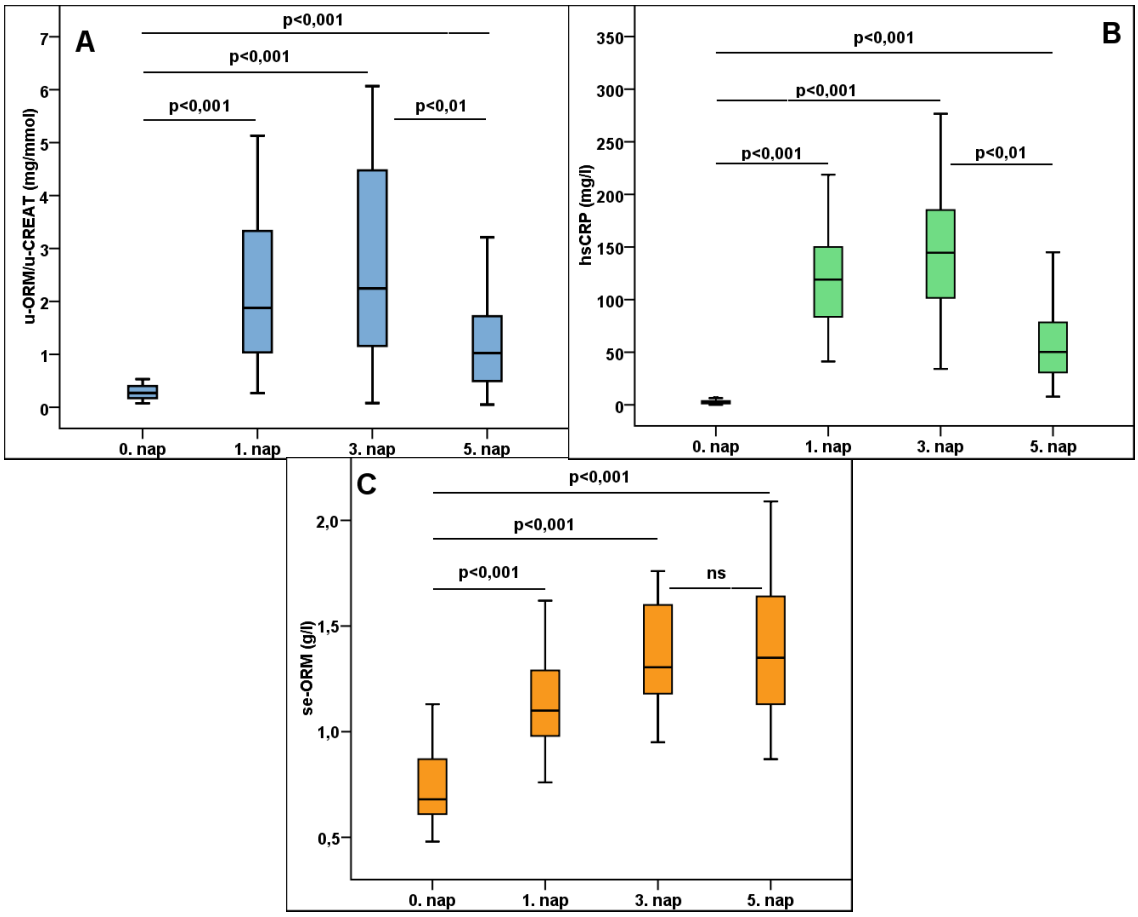
Kiindulási, műtét előtti adatok

A műtét előtti napon a betegek nem szenvedtek akut gyulladástól, habár az alap u-ORM/u-CREAT és hsCRP értékeik mérsékelten emelkedettek voltak az egészséges egyénekhez viszonyítva ($p<0,001$). Ezzel szemben a se-ORM koncentrációk nem különböztek a referencia egyénekétől. A szívműtétre váró betegeknek nem volt proteinuriájuk, albuminuriájuk, és vesefunkciós paramétereik is a referencia tartományon belül mozogtak (11. Táblázat). A műtét előtti u-ORM/u-CREAT szintek egyformán enyhe emelkedést mutattak a szívműtétre váró betegeknél, függetlenül az ismert diabetestől, ill. egyéb krónikus betegségektől. Az u-ORM/u-CREAT értékekben nem mutatkozott különbség a CABG (0,27 (0,17-0,36) mg/mmol) és AVR (0,33 (0,13-0,49) mg/mmol) csoportok közt, valamint a kor és a nem tekintetében sem.

A gyulladásos állapot monitorozása szívműtét után

A műtét utáni időszakban az u-ORM/u-CREAT szintek változásai hasonló mintázatot mutattak a hsCRP kinetikájához, az értékek a harmadik posztoperatív napig markánsan emelkedtek, majd szignifikánsan csökkentek (12. Ábra). Nagyjából 10-szeres emelkedést találtunk a szívműtét után az u-ORM/u-CREAT tekintetében, mely a harmadik napon is emelkedett maradt. Az ötödik posztoperatív napon az u-ORM/u-CREAT szintek csökkentek, és alacsonyabbak voltak, mint a harmadik napi értékek ($p<0,001$), habár magasabbak maradtak a kiindulási, műtét előtti szinteknél (13. Táblázat, 12/A Ábra). Az u-ORM koncentráció adatok (mg/l) és a százalékos megoszlás (u-ORM/u-TP) is hasonló trendet írtak le. Ezzel szemben a se-ORM koncentrációk az ötödik posztoperatív napig egy folyamatosan emelkedő tendenciát mutattak, mintegy kétszeres emelkedéssel, itt csökkenést nem figyeltünk meg (12/C Ábra).

12. Ábra: Gyulladásos paraméterek monitorozása szívműtétet követően



A: u-ORM/u-CREAT szintek, **B**: hsCRP szintek, **C**: se-ORM szintek alakulása szívműtétet követően. 0. nap jelzi a műtét előtti értékeket.

13. Táblázat: Gyulladásos paraméterek monitorozása szívműtét után

	Műtét előtt 0. nap	Műtét után 1. nap	Műtét után 3. nap	Műtét után 5. nap	p érték
WBC, G/l	7,0 (6,4-8,4)	14,0 (11,6-16,0)	10,0 (8,3-12,4)	9,0 (6,9-9,9)	<0,001
hsCRP, mg/l	2,2 (1,2-3,9)	117,8 (82,2-146,3)	143,8 (93,7-173,0)	50,3 (30,8-79,6)	<0,001
se-ORM, g/l	0,7 (0,6-0,9)	1,1 (0,9-1,3)	1,3 (1,1-1,6)	1,4 (1,1-1,6)	<0,001
u-ORM, mg/l	1,92 (0,64-4,56)	13,40 (5,75-29,22)	9,62 (3,39-24,13)	4,41 (2,91-11,93)	<0,001
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0,29 (0,16-0,42)	1,95 (1,08-4,71)	2,32 (1,08-5,39)	1,40 (0,61-2,21)	<0,001
u-ORM/u-TP, %	2,96 (1,90-5,07)	8,92 (6,32-17,77)	12,4 (5,93-22,73)	9,97 (4,64-14,79)	<0,001

A követés alatti változások megítélésére Friedman tesztet használtunk. A medián (25-75 percentilis) értékeket tüntettük fel.

Klinikai események a követés alatt

A követés alatt nem találtunk szignifikáns különbségeket az u-ORM/u-CREAT szintek tendenciájában a CABG és AVR műtött betegek között. Az öt nap során sem oliguriát, sem markáns se-CYSC emelkedést nem találtunk (<1,5x a kiinduláshoz képest), a 38 betegből senkinél sem alakult ki akut veseelégtelenség.

A nagy műtét utáni SIRS jeleként 14 betegnél regisztráltunk lázat, de a mikrobiológiai eredmények negatívak maradtak, és a betegeknél nem alakult ki szepszis. Az u-ORM/u-CREAT megegyező tendenciát mutatott lázas és nem lázas betegeknél, és a lázas betegeknél sem találtunk szignifikáns u-ORM emelkedést.

Korrelációs vizsgálatok

Az u-ORM/u-CREAT értékek szignifikáns ($p<0,001$), pozitív korrelációt mutatattak a gyulladásos paraméterekkel: hsCRP (0,724), se-ORM (0,633) és WBC (0,461). Azonban nem találtunk összefüggést a vesefunkciós markerekkel, sem a se-CYSC, sem a se-CREAT koncentrációkkal.

V. MEGBESZÉLÉS

V.1. MÓDSZER VALIDÁLÁS

Megfelelően gyors, érzékeny és precíz turbidimetriás u-ORM meghatározási módszert dolgoztunk ki cobas 8000/c502 automatán, mely rutin felhasználásra is ideális. A mérési pontatlanság nem érte el az 5%-os variációs koefficienst, és a teszt csak 10 percet igényel. A különösen alacsony mennyiségi meghatározási határ (0,08 mg/l) és a jó funkcionális szenzitivitás (0,03 mg/l) eredményeknek köszönhetően a módszerünk lehetővé teszi a kvantitatív u-ORM meghatározást minden egészséges egyén vizeletében, és megfelelő hígítás után szisztémás gyulladástól szenvedő betegeknél is. A szűk biztonsági zóna miatt, a vizelet minták 20-szoros előhígítása ajánlott, így kiterjeszthető a mérés határ, akár 105 mg/l koncentrációig. Az alacsony u-ORM tartalmú mintákat (<1 mg/l) újra lehet mérni hígítás nélkül, jóllehet ezeknek az adatoknak nincs klinikai jelentősége.

Irodalmi és saját adatok alapján az u-ORM egy ígéretes markernek tűnik szisztémás gyulladásos aktivitással járó betegségekben [45-50], azonban ez idáig csak Christiansen és mtsai. írtak le automata turbidimetriás immunoassayt u-ORM mérésekhez [126]. Az ő módszerük a miénkhez hasonló, de az általunk alkalmazott beállítások, reagens/puffer/minta arányok érzékenyebb meghatározást tesznek lehetővé, összehasonlítva az általuk közölt detektálási határral (0,05mg/l). Eredményeink továbbá azt mutatják, hogy a módszerünk precízebb az alsó koncentráció tartományokban is.

Egyetértésben a korábbi vizsgálatokkal [126, 127], saját eredményeink is bizonyítják, hogy az ORM a vizeletben - *in vitro* - stabil. Adataink igazolják, hogy az u-ORM koncentrációk additívum nélkül, hűtőben tárolva akár 10 napig is stabilak. Továbbá azt találtuk, hogy nincs anyagveszteség 5 fagyasztás-kiolvasztás ciklus alatt sem. Ezek az eredmények bizonyították, hogy későbbi u-ORM mérésekhez a vizelet minták akár 2-8 °C-on tárolhatók, vagy fagyaszthatók és később is megbízhatóan tesztelhetők.

V.2. REFERENCIA INTERVALLUM

Vizsgálataink során egészségeseknél alacsony vizelet orosomucoid kiválasztást figyeltünk meg. A 72 egészséges egyén spontán vizelet mintája alapján, különböző életkori csoportokban, 10-60 év között meghatározott u-ORM/u-CREAT referencia tartományunk (0,01-0,24 mg/mmol, 0,08 mg/mmol mediánnal) jó összhangban van korábbi tanulmányok eredményeivel [126, 128, 129]. Tencer és mtsai. 95 egészséges felnőtt mintáját vizsgálták radiális immundiffúzióval, és felső határértéknek 0,7 mg/mmol-t határoztak meg [128]. Függetlennek találták az u-ORM szinteket az életkortól, a nemtől és a vizelet mintavételezés típusától. Hjorth és mtsai. szintén radiális immundiffúzióval mértek u-ORM szinteket, és 233 1-15 év közti gyermek vizsgálata során 0,5 mg/mmol-nál állapítottak meg felső határértéket. Szignifikánsan magasabb szinteket csak az egy hónapnál fiatalabb újszülötteknél találtak [129]. Christiansen és mtsai. a miénkhez hasonló referencia tartományt közöltek (0,009-0,17 mg/mmol, 0,04 mg/mmol medián értékkel) [126]. Az u-ORM szinteket turbidimetriás módszerrel 69 felnőttnél vizsgálták (átlag életkor 43 év), és hozzánk hasonlóan, férfiaknál magasabb u-ORM koncentrációkat (mg/l) mértek, mint a nők vizeletében, habár a különbségek eltűntek, ha az eredményeket testfelszínre vagy kreatininre vonatkoztatták. A 40 év fölötti korosztályban mi szintén szignifikáns különbséget találtunk nők és férfiak között, de a különbségek megszűntek, ha az u-ORM szinteket u-CREAT-ra korrigáltuk. Ezért random (nem gyűjtött) vizelet mintákban az u-ORM szintek kifejezése u-ORM/u-CREAT arányában javasolt, ezáltal csökkenthető a vizelet változó sűrűségének befolyásoló hatása, és az eredmények egyértelműen interpretálhatóak és összehasonlíthatóak.

V.3. KRÓNIKUS BETEGSÉGEK HATÁSA: ILLESZTETT KONTROLL CSOPORT

Irodalmi adatokkal egyetértésben, az alapbetegséggel rendelkező csoportunknál (illesztett kontroll csoport) az egészséges egyénekhez képest 2-3 szoros emelkedést figyeltünk meg az u-ORM szintek vizsgálata során. A legtöbb publikáció ez idáig diabeteses betegeket vizsgált [106-109, 130, 131], azonban saját vizsgálataink során a diabeteses és nem diabeteses egyének közt nem találtunk eltérést az u-ORM/u-CREAT szintekben. Továbbá, hasonlóan az egészséges egyénekhez, a nemi megoszlás és az életkor sem volt hatással az u-ORM/u-CREAT értékekre. Valószínűnek tartjuk, hogy az enyhe emelkedést az alapbetegségekkel járó krónikus gyulladásos folyamat okozza, melyet a mérsékelten emelkedett hsCRP értékek is alátámasztanak. Az u-ORM gyulladással összefüggő emelkedését korábban mások is feltételezték [113, 132].

Az illesztett kontroll csoportnál megfigyelt u-ORM emelkedés jó összhangban van a szívműtött betegcsoport műtét előtti u-ORM szintjeivel. A szívműtétre előjegyzett betegek szintén krónikus betegségekkel kezelt egyének voltak, akiknél ugyancsak emelkedett hsCRP értékeket találtunk már a műtét előtt.

A se-ORM szintekben azonban nem találtunk különbségeket az egészséges és krónikus betegségekkel rendelkező csoportok között, így eredményeink alapján, a krónikus gyulladásos folyamatok aktivitását az u-ORM/u-CREAT érzékenyebben képes jelezni, mint a se-ORM.

V.4. INTENZÍV OSZTÁLYON KEZELT BETEGCSOPORTOK: SIRS ÉS SZEPSZIS

A SIRS és szepszis elkülönítése gyakran nehézkes, mivel a tünetek hasonlóak, és a mikrobiológiai vizsgálatok hosszú időt igényelnek. A szepszis korai diagnózisa és a megfelelő terápia indítása elengedhetetlenek a kedvező kimenetel szempontjából [23, 133]. A laboratóriumi paraméterek különösen hasznosak a gyors klinikai döntéshozatalban és a szepszis monitorozásában, így számos potenciális biomarkert vizsgáltak már a szérumban [28].

Jóllehet a proteinuria régóta ismert különböző gyulladásos folyamatokban, így szepszisben is, de a vizelet fehérje markerek szerepét ez idáig kevesen vizsgálták [134]. Újabb proteomikai kutatások szerint azonban a vizeletfehérjék is szolgálhatnak klinikailag hasznos információval, mind szisztémás, mind lokális folyamatokban [135-137].

Legjobb tudásunk szerint az u-ORM szintek szerepét szepszisben mi vizsgáltuk először. Szignifikánsan emelkedett u-ORM exkréciót találtunk súlyos szisztémás gyulladásban. Szepszisben a kontrollokhoz viszonyítva mintegy 100-szoros, SIRS-hez képest 10-szeres u-ORM/u-CREAT emelkedést írtunk le. A 6,75 mg/mmol u-ORM/u-CREAT cut-off érték alkalmas lehet a szepszis - SIRS elkülönítésére, melyet a regressziós analízisek is alátámasztottak. Ezek alapján az u-ORM/u-CREAT egy hasznos markere a súlyos gyulladásnak, ígéretesnek tűnik a szepszis korai felismerésében, és ezáltal javíthatja a túlélést, mivel a korai diagnózis létfontosságú a kimenetel szempontjából.

A se-ORM koncentrációkat vizsgálva szintén emelkedett szinteket találtunk, de ennek mind a diagnosztikus, mind a prediktív értéke elmaradt az u-ORM értékekhez képest. Korábbi tanulmányok már leírtak szignifikánsan magasabb se-ORM szinteket szepszisben - kontrollokhoz és SIRS-es betegekhez viszonyítva [105, 138]. Nemrégiben Xiao és mtsai. közöltek kedvező diagnosztikus (AUC ROC: 0,869) és prognosztikus (AUC ROC: 0,793) értékeket se-ORM esetén szepszisben [105]. Saját eredményeink alapján azonban, a se-ORM szintek diagnosztikus kapacitása alacsonyabb, mint az u-ORM/u-CREAT értékeké, ami

egy érzékeny, korai markere lehet a szepszisnek, kiváló diagnosztikus értékkel, (AUC ROC: 0,954). Vizsgálataink alapján az u-ORM/u-CREAT hasonlóan jelzi a szepszist, mint a PCT, és jobban, mint a hsCRP.

Mindeddig csak Magid és mtsai. számoltak be emelkedett u-ORM exkrécióról szepszisben, igaz ők mindössze csak 7 szeptikus beteget monitoroztak. Annak ellenére, hogy nálunk jóval kevesebb beteget vizsgáltak, hasonló eredményeket közöltek, 25 mg/mmol u-ORM/u-CREAT medián értéket találtak szepszisben [139].

Habár az u-ORM/u-CREAT értékek korai emelkedést mutattak szepszisben, az öt napos követési periódus alatt ezek jelentősen nem változtak. Ez a jelenség magyarázható a fennálló, folyamatos súlyos szisztémás gyulladással, valamint a csoport heterogenitásával (a súlyosságot, etiológiát illetően), és feltehetően kevésbé indokolja az ORM relatív hosszú, 5 napos plazma-féléletideje.

Vizsgálatunkban emelkedett u-ORM kiválasztást figyeltünk meg függetlenül a patogén típusától és attól, hogy a fertőzés sebészi vagy belgyógyászati eredetű, ami előnyös lehet a szepszis diagnosztikában, kiküszöbölve a PCT ezen hátrányait [20].

Gyenge korrelációt találtunk az APACHE II score és az u-ORM/u-CREAT között, de nem figyeltünk meg különbségeket a túlélő és nem túlélő szeptikus betegek között követésünk alatt. Az u-ORM/u-CREAT szintek prediktív tulajdonságai feltehetően a viszonylag alacsony esetszám alapján nem kielégítőek. A szepszis szindróma komplexitásából és heterogenitásából adódóan a kimenetel kórjóslásához és az állapot monitorozásához több paraméteres vizsgálatok szükségesek, egy biomarker önmagában nem képes ugyanazt produkálni, mint a többváltozós pontrendszerek [28].

Annak ellenére, hogy az u-ORM szinteket nem befolyásolták a szepszishez kapcsolódó szervelégtelenségek, valamint ezek súlyossága, a vese funkciónak fontos hatása lehet az u-ORM kiválasztásra. Ezt a dializált betegek esetén megfigyelt extrémen emelkedett u-ORM/u-CREAT szintek is sugallják, valamint a vesefunkciós paraméterekkel talált korrelációk is. A dialízis során megfigyelt,

extrém u-ORM/u-CREAT értékek képesek lehetnek jelezni a fatális vese elégtelenséget, és a vesepótló kezelés igényét, habár ennek eldöntésére további vizsgálatokra van szükség. Eredményeinkkel összhangban, korábban Devarajan és mtsai. szívműtött gyermekeknél figyeltek meg extrém fokú u-ORM emelkedést, melyet a posztoperatív AKI korai markereként írtak le [140].

Az u-ORM szintek jóval markánsabban emelkednek szepszisben, mint a se-ORM koncentráció, és az u-ORM egy jelentős fehérjévé válik a vizeletben. Egészséges egyéneknél az u-ORM, a vizeletfehérjék 1-5%-át teszi ki, normálisan az albuminnál 5-10-szer alacsonyabb mértékben van jelen, míg szepszisben az u-ORM meghaladhatja az u-ALB szinteket. Eredményeink alapján, gyulladásos folyamatokban az u-ORM relatív emelkedése jóval erőteljesebb, mint az albumin változása. Ez utalhat arra, hogy más mechanizmussal kerülnek a vizeletbe, illetve, hogy az u-ORM egy jobb indikátora a gyulladásnak, melyre Magid és mtsai. is rávilágítottak [139].

Az u-ORM exkréció patomechanizmusa nem teljesen tisztázott. A szérum és vizelet ORM szintek közti korreláció azt sugallja, hogy a keringő ORM egy része megjelenik a vizeletben, azonban a se-ORM szintek önmagukban nem magyarázzák az emelkedett u-ORM értékeket, mely feltehetően nem egy túlfolyásos proteinuria eredménye. A vesefunkcióban történő változások, valószínűleg mind glomeruláris, mind tubuláris folyamatok is szerepet játszhatnak az u-ORM emelkedésében. Továbbá, - a szisztémás gyulladás hatására - lokális produkció a vesében is feltételezhető. Az extrahepatikus helyi ORM szintézis a vesében hozzájárulhat a szervi funkciók és homeosztázis fenntartásához, és csökkentheti a gyulladásos folyamat miatti szövetkárosodást. Az erős korreláció a gyulladásos markerek és u-ORM/u-CREAT értékek között megerősíti azt a feltevést, hogy az u-ORM emelkedés fő oka a szisztémás gyulladás.

V.5. U-ORM SZINTEK MONITOROZÁSA SZÍVMŰTÖTT BETEGEKNÉL

Nagy műtéti beavatkozások, mint a nyitott szívműtét is, szisztémás gyulladásos választ váltanak ki, mely során a szepszishez hasonlóan aktiválódhat az immunrendszer. Eredményeink alapján az u-ORM/u-CREAT szintek összhangban vannak a gyulladásos válasz mértékével az operatív sérülés után, melyet a hsCRP- hez hasonlóan képes jelezni, mint érzékeny non-invazív, gyulladásos marker.

A szívbetegek műtét előtti u-ORM/u-CREAT szintjei és az egészséges egyének között megfigyelt különbségek rámutattak a krónikus betegségek u-ORM kiválasztásra gyakorolt hatására, melyet az illesztett kontroll csoport esetén is tapasztaltunk. A megfigyelt emelkedés valószínűleg a fennálló krónikus gyulladásos állapotnak köszönhető, mely az atherosclerosissal, kardiovaszkuláris és egyéb betegségekkel magyarázható. Az emelkedett kiindulási hsCRP, mint jól ismert kardiovaszkuláris rizikó faktor is ezt támasztja alá [141]. Korábbi tanulmányok az u-ORM szinteket az atherosclerosis és az endothel diszfunkció markereként ill. a kardiovaszkuláris mortalitás prediktoraként írták le [109, 113, 130]. Emelkedett u-ORM szinteket találtak szívelégtelen betegekben is [110]. Az u-ORM koncentrációkat esszenciális hipertóniában is vizsgálták, de módszertani okokból a kontrollokban és a betegek 87%-ában nem sikerült az u-ORM szinteket meghatározni [142]. Ezzel szemben az általunk kidolgozott, nagy érzékenységű turbidimetriás módszer alkalmas a finom u-ORM koncentráció változásokat is megítélni, ezért rutin meghatározásokra is alkalmas és hasznos lehet akár kiterjesztett klinikai gyakorlatban is.

Annak ellenére, hogy a se-ORM szinteket korábban összefüggésbe hozták a kardiovaszkuláris eseményekkel magas vérnyomásos betegekben [143, 144], és újabb vizsgálatok a krónikus szívelégtelenség prognosztikus faktoraként írták le [145], jelen tanulmányunk során a szívbetegeknél nem találtunk emelkedett se-ORM szinteket, szemben a magasabb műtét előtti u-ORM/u-CREAT értékekkel.

Jóllehet a szívműtött betegeink életkorban és nemi összetételben is különböztek az egészséges, referencia egyénektől, mégis ezen faktorok u-ORM/u-CREAT szintekre gyakorolt – feltételezhető - befolyását nem tartjuk valószínűnek. Egyik általunk vizsgált populációban sem, és korábbi tanulmányokban sem találtak a férfiak és nők között különbséget az u-ORM/u-CREAT szintekben, valamint az értékek nem mutattak igazolható összefüggést az életkorral [126, 128].

Ezek alapján úgy gondoljuk, és a megfigyeléseink is azt tükrözik, hogy a mérsékelt u-ORM/u-CREAT emelkedés jó indikátora lehet a krónikus, alacsony intenzitású gyulladásos folyamatoknak, ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek az u-ORM szintek klinikai hasznosíthatóságának eldöntésére a magas kardiovaszkuláris rizikójú betegeknél.

Az u-ORM szintek szívműtét után megfigyelt kinetikája magyarázza az intenzív osztályon kezelt SIRS betegeknél észlelt két napig nem változó szinteket, hiszen az u-ORM értékek csak a stimulus utáni harmadik napot követően mutatnak csökkenést. Legjobb tudásunk szerint mi írtuk le először az u-ORM szintek változását szívműtéten átesett felnőtteknél.

Eredményeink azt tükrözik, hogy az u-ORM/u-CREAT hasonlóan mutatja a szisztémás gyulladás kiterjedtségét, mint a hsCRP. Érdekes megfigyelés, hogy az u-ORM/u-CREAT időbeli lefutása a hsCRP kinetikáját követi szívműtét után, és nem a se-ORM szintek változását. A CRP lefutása jól ismert, az inzultus után 24-48 órán belül emelkedik és 72 óra múlva kezd csökkenni [146, 147]. A se-ORM kinetikája is hasonlóan ismert, nagyjából kétszeresére emelkedik 24-48 órán belül, és a stimulus után még 5 napon túl is magas marad [146, 148, 149]. A hosszú, körülbelül 5 napos féléletideje magyarázza a se-ORM kinetikáját, míg az u-ORM szinteket valószínűleg nem befolyásolják azon faktorok, melyek a plazma féléletidőért felelősek.

A szignifikáns u-ORM/u-TP emelkedés mutatja a valós idejű változást a vizeletben, és kihangsúlyozza, hogy az ORM egy tekintélyes frakció a vizelet fehérjék közt gyulladásos állapotokban. Eredményeink rámutattak, hogy az u-ORM szintek gyorsabban, érzékenyebben és sokkal jelentősebben emelkednek

mint a se-ORM koncentráció. Az u-ORM normálisan csak néhány százaléka a vizeletfehérjéknek, és mg/l-es koncentrációban van jelen, szemben a szérum ORM g/l-es nagyságrendjével. Így a vizelettel ürülő ORM mennyiségének kismértékű emelkedése is jóval markánsabb változást jelent, mint a se-ORM enyhe mozgásai. Ezek alapján az u-ORM egy jóval szenzitívebb marker, mint a se-ORM.

Csak néhány adat található az u-ORM kinetikáját illetően műtét után. Magid és mtsai. követéses vizsgálatukban, 6 felnőtt betegnél műtét által indukált gyulladásban monitorozták az u-ORM kiválasztást [139], és azt figyelték meg, hogy az u-ORM szintek tükrözik a CRP változásait elektív hasi műtétet követően. Ez egybevág saját, nagyobb elemszámú eredményeinkkel szívműtéten átesett betegeknél. Egy másik tanulmányban Devarajan és mtsai. leírták, hogy az u-ORM szintek két órán belül emelkednek szívműtött gyermekekben [140]. Ők jóval magasabb u-ORM szinteket mértek nefelometriás módszerrel, mint mi a felnőtt szívműtöttek esetén. Azt figyelték meg, hogy a 40 mg/l feletti u-ORM szintek erős indikátorai a szívműtét után kialakuló AKI-nak. Saját vizsgálatunk során a szívműtött betegeknél azonban egy esetben sem fordult elő AKI (vizelet kiválasztás és se-CYSC szintek alapján), és ilyen extrém magas u-ORM szinteket sem mértünk. A posztoperatív AKI az on-pump szívműtétek egyik fő komplikációja, mely nagyjából a betegek 30%-ában alakul ki [150], azonban az általunk vizsgált szívműtött betegcsoport egy kis kockázatú csoportnak tekinthető. A bevont betegeknél műtét előtt nem figyeltünk meg proteinuriát, ill. albuminuriát, mely alacsony posztoperatív rizikóra utal [151, 152].

Jelen vizsgálatban a lázas egyének u-ORM/u-CREAT értékei nem különböztek a láztalanokétól, és infekciót mikrobiológiailag sem igazoltunk. Megfigyelések szerint, a szívműtét utáni láz általában szimplán az akut fázis reakció jele, és nem fertőzéses eredetű [153]. Az ITO-n kezelt SIRS-es betegcsoportunkhoz hasonló u-ORM értékeket figyeltünk meg a szívműtét után is, és az u-ORM/u-CREAT szintek nem érték el a 6,75 mg/mmol cut-off értéket, mely szepszisre lehet diagnosztikus.

A szívműtött betegeknél is megfigyelt erős korreláció a hsCRP és u-ORM/u-CREAT értékek közt azt sugallja, hogy a szisztémás gyulladás tűnik a legfőbb felelősnek az u-ORM emelkedésében, ezzel is hangsúlyozva az ORM immunmodulátoros szerepét. Azonban a korrelációs vizsgálatok nem adnak egyértelmű magyarázatot az u-ORM emelkedés komplex mechanizmusára, a gyulladás mellett a vesefunkció változása, és egyéb lokális faktorok is szerepet játszhatnak.

V.6. VIZSGÁLATAINK KORLÁTAI

Eredményeink értékelését, a vizsgálatainkból levonható következtetéseket számos tényező befolyásolhatja, korlátozhatja.

A módszer validálást tekintve, vizelet orosomucoid meghatározáshoz nem érhető el hivatalos kalibrátor/kontroll anyag, ezek csak se-ORM mérésekhez kaphatók, így az u-ORM mérési módszer validálásához hígított szérum kalibrátorokat/kontrollokat használtunk.

További limitáció, hogy monocentrikus jellegű vizsgálatainkat viszonylag alacsony elemszámú csoportokon végeztük.

A SIRS fogalmát az új, Szepszis-3 definíciórendszer már nem javasolja, mivel nem elég specifikus, jóllehet tanulmányunk időszakában még széleskörűen használt fogalom volt.

A szívműtött betegek vizsgálata során nem tapasztaltunk korai halálozást és egyéb komplikációkat, így nem tudtuk megítélni az u-ORM prediktív tulajdonságait a kimenetelt és az AKI-t illetően. Továbbá off-pump szívműtött betegek bevonása segítene feltárni az extrakorporális keringés szerepét/befolyását az u-ORM emelkedésében.

A betegellátás során alkalmazott kezelések u-ORM szintekre gyakorolt hatása sem zárható ki a vizsgálati eredmények értékelésében.

Az emelkedett u-ORM szintek okának/patomechanizmusának tisztázásához további vizsgálatok szükségesek (esetszám növelés, sejtes- és állatkísérletes modellek, tubuláris markerek, stb.).

További betegcsoportok bevonásával kiterjeszthető az u-ORM diagnosztikus és prognosztikus értékeinek tanulmányozása.

VI. ÖSSZEGZÉS

Vizsgálataink során tanulmányoztuk a vizelet orosomucoid szinteket szisztémás gyulladásos folyamatokban. Eredményeink segíthetik az u-ORM potenciális szerepének feltárását akut gyulladások során.

Elvégzett vizsgálataink eredményeit összegezve:

- Kidolgoztunk egy megfelelően gyors, érzékeny, precíz és teljesen automata, immunpartikulumok által erősített turbidimertriás u-ORM mérési módszert, mely alkalmas rutin klinikai használatra.
- Egészséges egyének vizsgálatával a módszerhez referencia tartományt határoztunk meg, mely alkalmazható gyermekeknél és felnőtteknél egyaránt.
- Míg az egészséges egyéneknél alacsony u-ORM/u-CREAT értékeket mértünk, addig a krónikus betegségektől szenvedő személyeknél mérsékelten emelkedett u-ORM kiválasztást találtunk, mely indikátora lehet az alapbetegségekkel összefüggő krónikus, alacsony intenzitású gyulladásos állapotnak.
- Vizsgálataink legfőbb tudományos eredményének tartjuk, hogy az u-ORM szintek markáns és korai emelkedést mutattak szepszisben, és képesek egyértelműen elkülöníteni a SIRS-et a szepszistől. Megfigyeléseink alapján az u-ORM/u-CREAT alkalmazható lehet kiegészítő markerként szepszisben, és segítheti a klinikusokat a gyors döntéshozatalban.
    - Ígéretes diagnosztikus értékeket találtunk a SIRS és szepszis elkülönítéséhez, a 6,75 mg/mmol feletti u-ORM/u-CREAT szintek egyidejű 90 % feletti szenzitivitással és specificitással képesek jelezni a súlyos szepszist.
    - Szeptikus betegeknél az 5 napos követési periódus alatt az u-ORM szintek jelentősen nem változtak, melyre magyarázat lehet a fennálló folyamatos súlyos szisztémás gyulladás.
    - Alacsony esetszámunk mellett, a kimenetelt illetően az u-ORM szintek prediktív értéke elmaradt a sokparaméteres pontrendszerektől.

- Habár az u-ORM/u-CREAT szintek függetlennek tűntek a betegség súlyosságától és a kimeneteltől, az extrém szintek potenciális indikátorai lehetnek a vesekárosodásnak és vesepótló kezelés szükségességének
- Jelentős eredménynek tekintjük, hogy erős korrelációt találtunk a közismert gyulladásos paraméterek és az u-ORM/u-CREAT értékek között. A megfigyelt összefüggések utalhatnak arra, hogy az u-ORM emelkedésben a szisztémás gyulladás jelentős szerepet játszik.

- Az u-ORM szintek időbeli változása szívműtét után demonstrálta, hogy az u-ORM gyors és érzékeny markere a szisztémás gyulladásos aktivitásnak.
  - A szívbetegek műtét előtti, mérsékelten emelkedett u-ORM/u-CREAT értékei jelezték a krónikus betegségek u-ORM kiválasztásra gyakorolt hatását.
  - Fontos megfigyelésünk, hogy az u-ORM/u-CREAT értékek szívműtét után korán, markánsan emelkednek, és a műtétet követően a hsCRP-hez hasonló kinetikát követnek. Míg a se-ORM változásai kevésbé befolyásolták az u-ORM/u-CREAT értékeket.
  - A klasszikus gyulladásos markerek és az u-ORM/u-CREAT közt tapasztalt összefüggések rámutattak arra, hogy az u-ORM jelezheti a gyulladásos válasz mértékét.

Az elvégzett vizsgálatok eredményeit összegezve megállapítható, hogy a vizelet orosomucoid a szérum orosomucoidnál egy jóval érzékenyebb, korai gyulladásos marker, mely ideális a gyulladásos aktivitás valós idejű követésére. Eredményeink alapján a non-invazív úton nyert vizelet alternatívája lehet a vérvételnek, és a vizelet orosomucoid alkalmasnak tűnik a szisztémás gyulladásos folyamatok vizsgálatára a mindennapi gyakorlatban, akár betegágy melletti gyorstesztként is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt hálás köszönettel tartozom családomnak, akik mindvégig mellettem álltak, és megértően támogattak a doktori tanulmányaim alatt.

Szeretném megköszönni a támogatást és iránymutatást témavezetőimnek és egyben mentoraimnak, Prof. Dr. Ludány Andreának, Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak és Dr. Mühl Diána tanárnőnek. Továbbá köszönettel tartozom Györgyi Erzsébetnek is, aki megismertette velem a laboratóriumi munkát, és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a vizsgálatok elvégzéséhez. A Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, Prof. Dr. Miseta Attilának és a Szentágothai Kutatóközpont igazgatójának, Prof. Dr. Kovács L. Gábornak is köszönettel tartozom, amiért lehetőséget biztosítottak a vizsgálatok elvégzéséhez. Kiemelt köszönettel tartozom két lelkes kollégámnak, Dr. Szirmay Balázsnak és Dr. Horváth-Szalai Zoltánnnak, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársának, kiemelten Rózsai Ágnesnek, aki a cobas automata rejtelmeivel és kezelésével ismertetett meg. Köszönet illeti az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet dolgozóit is a mintavételben nyújtott segítségükért. A Szívgyógyászati Klinikához köthető kutatásokban nyújtott segítségért Dr. Németh Balázsnak, Dr. Ajtay Zénónak és Dr. Németh Ádámnak tartozom hálával.

A vizelet orosomucoid mérési módszer beállítása és a mérések a Dako Denmark A/S vállalat, valamint a Roche Magyarország Kft. támogatásával valósultak meg.

Köszönettel tartozom a vizsgálatban résztvevő valamennyi személynek, akik hozzájárultak a jelen tudományos munka megszületéséhez.

A jelen tudományos művet a szerző a Pécsi Tudományegyetem alapításának 650. évfordulója emlékének szenteli.

Az értekezés az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-III kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2013;369:840-51.
2. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. Crit Care Clin 2009;25:83-101, viii.
3. 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. Chest 1992;101:1644-55.
4. 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 Med 2003;29:530-8.
5. 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;315:801-10.
6. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med 2002;28:108-21.
7. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, Francois B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. Lancet Respir Med 2014;2:380-6.
8. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence 2014;5:4-11.
9. 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. Pediatr Crit Care Med 2011;12:494-503.
10. 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. Crit Care Med 2001;29:1303-10.
11. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.
12. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. Crit Care Med 2012;40:754-61.
13. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. Crit Care Med 2010;38:367-74.
14. Bogár L, Nagy G. Három országos szepszisaudit: 2005, 2010 és 2015. Aneszteziológia és Intenzív Terápia. 2016;47:5-13.
15. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 2010;140:805-20.
16. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002;420:885-91.

17. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. BMJ 2016;353:i1585.

18. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. Clin Microbiol Rev 2012;25:609-34.

19. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. Annu Rev Pathol 2011;6:19-48.

20. Laszlo I, Trasy D, Molnar Z, Fazakas J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. J Immunol Res 2015;2015:510436.

21. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2013;43:260-3.

22. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 2008;36:296-327.

23. 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. Crit Care Med 2013;41:580-637.

24. Lebovitz EE, Burbelo PD. Commercial multiplex technologies for the microbiological diagnosis of sepsis. Mol Diagn Ther 2013;17:221-31.

25. Chun K, Syndergaard C, Damas C, Trubey R, Mukindaraj A, Qian S, et al. Sepsis Pathogen Identification. J Lab Autom 2015;20:539-61.

26. Andrade SS, Bispo PJ, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. Shock 2008;30 Suppl 1:41-6.

27. Vincent JL, Beumier M. Diagnostic and prognostic markers in sepsis. Expert Rev Anti Infect Ther 2013;11:265-75.

28. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care 2010;14:R15.

29. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 2004;39:206-17.

30. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2013;13:426-35.

31. Singh M, Anand L. Bedside procalcitonin and acute care. Int J Crit Illn Inj Sci 2014;4:233-7.

32. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. Journal of Clinical Investigation 2003;111:1805-12.

33. Faix JD. Biomarkers of sepsis. Crit Rev Clin Lab Sci 2013;50:23-36.

34. 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 Med 2015;41:12-20.

35. Behnes M, Bertsch T, Lepiorz D, Lang S, Trinkmann F, Brueckmann M, et al. Diagnostic and prognostic utility of soluble CD 14 subtype (presepsin) for severe

sepsis and septic shock during the first week of intensive care treatment. Crit Care 2014;18:507.

36. Pizzolato E, Ulla M, Galluzzo C, Lucchiari M, Manetta T, Lupia E, et al. Role of presepsin for the evaluation of sepsis in the emergency department. Clin Chem Lab Med 2014;52:1395-400.

37. Donadello K, Scolletta S, Covajes C, Vincent JL. suPAR as a prognostic biomarker in sepsis. BMC Med 2012;10:2.

38. Backes Y, van der Sluijs KF, Mackie DP, Tacke F, Koch A, Tenhunen JJ, et al. Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review. Intensive Care Med 2012;38:1418-28.

39. Vincent JL, Moreno R. Clinical review: scoring systems in the critically ill. Crit Care 2010;14:207.

40. 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 Med 2017;43:304-77.

41. Schmid K. Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. J Am Chem Soc 1950;72: 2816.

42. Weimer HE, Mehl JW, Winzler RJ. Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. J Biol Chem 1950;185:561-8.

43. Hochepied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:25-34.

44. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metab Rev 2001;33:161-235.

45. Sun Y, Yang Y, Qin Z, Cai J, Guo X, Tang Y, et al. The Acute-Phase Protein Orosomucoid Regulates Food Intake and Energy Homeostasis via Leptin Receptor Signaling Pathway. Diabetes 2016;65:1630-41.

46. Dente L, Ciliberto G, Cortese R. Structure of the human alpha 1-acid glycoprotein gene: sequence homology with other human acute phase protein genes. Nucleic Acids Res 1985;13:3941-52.

47. Nakamura H, Yuasa I, Umetsu K, Nakagawa M, Nanba E, Kimura K. The rearrangement of the human alpha(1)-acid glycoprotein/orosomucoid gene: evidence for tandemly triplicated genes consisting of two AGP1 and one AGP2. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:779-84.

48. Merritt CM, Board PG. Structure and characterisation of a duplicated human alpha 1 acid glycoprotein gene. Gene 1988;66:97-106.

49. Yuasa I, Weidinger S, Umetsu K, Suenaga K, Ishimoto G, Eap BC, et al. Orosomucoid system: 17 additional orosomucoid variants and proposal for a new nomenclature. Vox Sang 1993;64:47-55.

50. Yuasa I, Umetsu K, Vogt U, Nakamura H, Nanba E, Tamaki N, et al. Human orosomucoid polymorphism: molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1*F1, ORM1*F2, and ORM1*S. Hum Genet 1997;99:393-8.

51. Yuasa I, Nakamura H, Henke L, Henke J, Nakagawa M, Irizawa Y, et al. Characterization of genomic rearrangements of the alpha1-acid glycoprotein/orosomucoid gene in Ghanaians. J Hum Genet 2001;46:572-8.

52. Johnson AM, Schmid K, Alper CA. Inheritance of human alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid) variants. J Clin Invest 1969;48:2293-9.

53. Kulkarni AB, Reinke R, Feigelson P. Acute phase mediators and glucocorticoids elevate alpha 1-acid glycoprotein gene transcription. J Biol Chem 1985;260:15386-9.

54. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim Biophys Acta 2000;1482:157-71.

55. Luo Z, Lei H, Sun Y, Liu X, Su DF. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. J Physiol Biochem 2015;71:329-40.

56. Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. Curr Protein Pept Sci 2007;8:91-108.

57. Schmid K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, et al. Structure of 1 -acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. Biochemistry 1973;12:2711-24.

58. Schmid K, Burgi W, Collins JH, Nanno S. The disulfide bonds of alpha1-acid glycoprotein. Biochemistry 1974;13:2694-7.

59. Kopecky V, Jr., Ettrich R, Hofbauerova K, Baumruk V. Structure of human alpha1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. Biochem Biophys Res Commun 2003;300:41-6.

60. Schonfeld DL, Ravelli RB, Mueller U, Skerra A. The 1.8-A crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. J Mol Biol 2008;384:393-405.

61. Schmid K. α1-acid glycoprotein. In: Putnam FW, editor. The Plasma Proteins. New York: Academic Press, 1975:183–228.

62. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. Dis Markers 2008;25:267-78.

63. Treuheit MJ, Costello CE, Halsall HB. Analysis of the five glycosylation sites of human alpha 1-acid glycoprotein. Biochem J 1992;283 (Pt 1):105-12.

64. De Graaf TW, Van der Stelt ME, Anbergen MG, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. J Exp Med 1993;177:657-66.

65. Cheresh DA, Haynes DH, Distasio JA. Interaction of an acute phase reactant, alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid), with the lymphoid cell surface: a model for non-specific immune suppression. Immunology 1984;51:541-8.

66. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. J Biol Chem 1971;246:1461-7.

67. Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of alpha1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. Biochim Biophys Acta 2005;1725:128-35.

68. van Dijk W, Havenaar EC, Brinkman-van der Linden EC. Alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. Glycoconj J 1995;12:227-33.

69. Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin. Glycoconj J 1998;15:177-82.

70. Mackiewicz A, Mackiewicz K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. Glycoconj J 1995;12:241-7.

71. Balmana M, Gimenez E, Puerta A, Llop E, Figueras J, Fort E, et al. Increased alpha1-3 fucosylation of alpha-1-acid glycoprotein (AGP) in pancreatic cancer. J Proteomics 2016;132:144-54.

72. Poland DC, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Koeleman CA, van het Hof B, van Dijk W. Increased alpha3-fucosylation of alpha1-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function. Glycoconj J 2001;18:261-8.

73. Ryden I, Pahlsson P, Lundblad A, Skogh T. Fucosylation of alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid) compared with traditional biochemical markers of inflammation in recent onset rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta 2002;317:221-9.

74. Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, Yagihashi Y, Nishimura T, Saniabadi AR, et al. alpha1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. Cancer 2004;101:2825-36.

75. Grzyb J, Latowski D, Strzalka K. Lipocalins - a family portrait. J Plant Physiol 2006;163:895-915.

76. Logdberg L, Wester L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. Biochim Biophys Acta 2000;1482:284-97.

77. Fandino-Vaquero R, Fernandez-Trasancos A, Alvarez E, Ahmad S, Batista-Oliveira AL, Adrio B, et al. Orosomucoid secretion levels by epicardial adipose tissue as possible indicator of endothelial dysfunction in diabetes mellitus or inflammation in coronary artery disease. Atherosclerosis 2014;235:281-8.

78. Lee YS, Choi JW, Hwang I, Lee JW, Lee JH, Kim AY, et al. Adipocytokine orosomucoid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. J Biol Chem 2010;285:22174-85.

79. Kerkay J, Westphal U. Steroid-protein interactions. XIX. Complex formation between alpha 1-acid glycoprotein and steroid hormones. Biochim Biophys Acta 1968;170:324-33.

80. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. Pharmacol Rev 1988;40:1-47.

81. Zsila F, Mady G. Biliverdin is the endogenous ligand of human serum alpha1-acid glycoprotein. Biochem Biophys Res Commun 2008;372:503-7.

82. Szallasi A, Lewin NE, Blumberg PM. Identification of alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid) as a major vanilloid binding protein in serum. J Pharmacol Exp Ther 1992;262:883-8.

83. Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. Inflammation 1997;21:69-82.

84. Fitos I, Visy J, Zsila F, Mady G, Simonyi M. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein. Biochim Biophys Acta 2006;1760:1704-12.

85. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. Clin Cancer Res 2003;9:625-32.

86. Jones K, Hoggard PG, Khoo S, Maher B, Back DJ. Effect of alpha1-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir and indinavir in vitro. Br J Clin Pharmacol 2001;51:99-102.

87. Poland DC, Garcia Vallejo JJ, Niessen HW, Nijmeyer R, Calafat J, Hack CE, et al. Activated human PMN synthesize and release a strongly fucosylated glycoform of alpha1-acid glycoprotein, which is transiently deposited in human myocardial infarction. J Leukoc Biol 2005;78:453-61.

88. Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Rasmussen T, Niemann CU, Udby L, Borup R, et al. Highly glycosylated alpha1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. J Leukoc Biol 2005;78:462-70.

89. Gemelli C, Martello A, Montanari M, Zanocco Marani T, Salsi V, Zappavigna V, et al. The Orosomucoid 1 protein is involved in the vitamin D - mediated macrophage de-activation process. Exp Cell Res 2013;319:3201-13.

90. Hochepied T, Van Molle W, Berger FG, Baumann H, Libert C. Involvement of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. J Biol Chem 2000;275:14903-9.

91. Muchitsch EM, Auer W, Pichler L. Effects of alpha 1-acid glycoprotein in different rodent models of shock. Fundam Clin Pharmacol 1998;12:173-81.

92. Libert C, Hochepied T, Berger FG, Baumann H, Fiers W, Brouckaert P. High-level constitutive expression of alpha 1-acid glycoprotein and lack of protection against tumor necrosis factor-induced lethal shock in transgenic mice. Transgenic Res 1998;7:429-35.

93. Sorensson J, Matejka GL, Ohlson M, Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. Am J Physiol 1999;276:H530-4.

94. Muchitsch EM, Teschner W, Linnau Y, Pichler L. In vivo effect of alpha 1-acid glycoprotein on experimentally enhanced capillary permeability in guinea-pig skin. Arch Int Pharmacodyn Ther 1996;331:313-21.

95. Johnsson E, Haraldsson B. Addition of purified orosomucoid preserves the glomerular permeability for albumin in isolated perfused rat kidneys. Acta Physiol Scand 1993;147:1-8.

96. Hjalmarsson C, Lidell ME, Haraldsson B. Beneficial effects of orosomucoid on the glomerular barrier in puromycin aminonucleoside-induced nephrosis. Nephrol Dial Transplant 2006;21:1223-30.

97. Haraldsson BS, Johnsson EK, Rippe B. Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. Kidney Int 1992;41:310-6.

98. Cylwik B, Chrostek L, Gindzienska-Sieskiewicz E, Sierakowski S, Szmitkowski M. Relationship between serum acute-phase proteins and high disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Adv Med Sci 2010;55:80-5.

99. Zhang X, Xiao Z, Liu X, Du L, Wang L, Wang S, et al. The potential role of ORM2 in the development of colorectal cancer. PLoS One 2012;7:e31868.

100. Kanoh Y, Ohtani H, Egawa S, Baba S, Akahoshi T. Levels of acute inflammatory biomarkers in advanced prostate cancer patients with alpha2-macroglobulin deficiency. Int J Oncol 2011;39:1553-8.

101. Wiklund PK, Pekkala S, Autio R, Munukka E, Xu L, Saltevo J, et al. Serum metabolic profiles in overweight and obese women with and without metabolic syndrome. Diabetol Metab Syndr 2014;6:40.

102. Miranda-Garcia P, Chaparro M, Gisbert JP. Correlation between serological biomarkers and endoscopic activity in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterol Hepatol 2016;39:508-15.

103. Kjeldsen J, Lauritsen K, De Muckadell OB. Serum concentrations of orosomucoid: improved decision-making for tapering prednisolone therapy in patients with active inflammatory bowel disease? Scand J Gastroenterol 1997;32:933-41.

104. Barroso-Sousa R, Lobo RR, Mendonca PR, Memoria RR, Spiller F, Cunha FQ, et al. Decreased levels of alpha-1-acid glycoprotein are related to the mortality of septic patients in the emergency department. Clinics (Sao Paulo) 2013;68:1134-9.

105. Xiao K, Su L, Yan P, Han B, Li J, Wang H, et al. alpha-1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. J Crit Care 2015;30:744-51.

106. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine predicts cardiovascular and over-all mortality in patients with Type II diabetes. Diabetologia 2002;45:115-20.

107. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine is a powerful predictor of cardiovascular mortality in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes at five years of follow-up. Diabetologia 2005;48:386-93.

108. Christiansen MS, Iversen K, Larsen CT, Goetze JP, Hommel E, Molvig J, et al. Increased urinary orosomucoid excretion: a proposed marker for inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. Scand J Clin Lab Invest 2009;69:272-81.

109. Svendstrup M, Christiansen MS, Magid E, Hommel E, Feldt-Rasmussen B. Increased orosomucoid in urine is an independent predictor of cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes at 10 years of follow-up. J Diabetes Complications 2013;27:570-5.

110. Hou LN, Li F, Zeng QC, Su L, Chen PA, Xu ZH, et al. Excretion of urinary orosomucoid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. PLoS One 2014;9:e107550.

111. Nielsen SH, Petersen JS, Magid E. Albuminuria in ischemic heart disease. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1999;230:143-52.

112. Gahmberg CG, Andersson LC. Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid). J Exp Med 1978;148:507-21.

113. Christiansen MS, Hesse D, Ekbom P, Hesse U, Damm P, Hommel E, et al. Increased urinary orosomucoid excretion predicts preeclampsia in pregnant women with pregestational type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2010;89:16-21.

114. Kronborg CS, Allen J, Vittinghus E, Knudsen UB. Pre-symptomatic increase in urine-orosomucoid excretion in pre-eclamptic women. Acta Obstet Gynecol Scand 2007;86:930-7.

115. Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, et al. Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. Proteomics 2005;5:4296-304.

116. Li F, Yu Z, Chen P, Lin G, Li T, Hou L, et al. The increased excretion of urinary orosomucoid 1 as a useful biomarker for bladder cancer. Am J Cancer Res 2016;6:331-40.

117. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, Greis KD, Haines K, Klein-Gitelman MS, et al. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. Pediatr Res 2009;65:530-6.

118. Park YJ, Yoo SA, Hwang D, Cho CS, Kim WU. Identification of novel urinary biomarkers for assessing disease activity and prognosis of rheumatoid arthritis. Exp Mol Med 2016;48:e211.

119. Magnusson B, Örnemark U, eds. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods - A Laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. 2014.
Elérhető: https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv. letöltés ideje: 2016.06.23. 10:09.

120. 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;270:2957-63.

121. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med 1985;13:818-29.

122. 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. Crit Care Med 1998;26:1793-800.

123. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Kidney Int Suppl 2012:1-138.

124. Zhou J, Liu Y, Tang Y, Liu F, Zhang L, Zeng X, et al. A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. Int Urol Nephrol 2016;48:125-32.

125. Zappitelli M, Greenberg JH, Coca SG, Krawczeski CD, Li S, Thiessen-Philbrook HR, et al. Association of definition of acute kidney injury by cystatin C rise with biomarkers and clinical outcomes in children undergoing cardiac surgery. JAMA Pediatr 2015;169:583-91.

126. Christiansen MS, Blirup-Jensen S, Foged L, Larsen M, Magid E. A particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of orosomucoid in urine: development, validation and reference values. Clin Chem Lab Med 2004;42:1168-77.

127. Tencer J, Thysell H, Andersson K, Grubb A. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G,K-AND γ-chain immunoreactivity, orosomucoid and a 1-antitrypsin in urine stored at various conditions. Scand J Clin Lab Invest 2011;54:199-206.

128. Tencer J, Thysell H, Grubb A. Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin. Scand J Clin Lab Invest 1996;56:691-700.

129. Hjorth L, Helin I, Grubb A. Age-related reference limits for urine levels of albumin, orosomucoid, immunoglobulin G and protein HC in children. Scand J Clin Lab Invest 2000;60:65-73.

130. El-Beblawy NM, Andrawes NG, Ismail EA, Enany BE, Abou El-Seoud HS, Erfan MA. Serum and Urinary Orosomucoid in Young Patients With Type 1 Diabetes: A Link Between Inflammation, Microvascular Complications, and Subclinical Atherosclerosis. Clin Appl Thromb Hemost 2016.

131. Christiansen MS, Hommel E, Friberg L, Molvig J, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Increased urinary orosomucoid excretion is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. J Diabetes Complications 2010;24:28-36.

132. Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Liu H, Hou X, et al. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy. Nephrology (Carlton) 2009;14:332-7.

133. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2001;345:1368-77.

134. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. Clin Chem 1989;35:755-65.

135. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. Clin J Am Soc Nephrol 2015;10:147-55.

136. Zimmerli LU, Schiffer E, Zurbig P, Good DM, Kellmann M, Mouls L, et al. Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease. Mol Cell Proteomics 2008;7:290-8.

137. Bagshaw SM, Langenberg C, Haase M, Wan L, May CN, Bellomo R. Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. Intensive Care Med 2007;33:1285-96.

138. Barroso-Sousa R, Lobo RR, Mendonca PR, Memoria RR, Spiller F, Cunha FQ, et al. Decreased levels of alpha-1-acid glycoprotein are related to the mortality of septic patients in the emergency department. Clinics 2013;68:1134-9.

139. Magid E, Guldager H, Hesse D, Christiansen MS. Monitoring urinary orosomucoid in acute inflammation: observations on urinary excretion of orosomucoid, albumin, alpha1-microglobulin, and IgG. Clin Chem 2005;51:2052-8.

140. Devarajan P, Krawczeski CD, Nguyen MT, Kathman T, Wang Z, Parikh CR. Proteomic identification of early biomarkers of acute kidney injury after cardiac surgery in children. Am J Kidney Dis 2010;56:632-42.

141. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. Am J Med 2004;116 Suppl 6A:9S-16S.

142. Lisowska-Myjak B, Krych A, Kolodziejczyk A, Pachecka J, Gaciong Z. Urinary proteins, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity and estimated glomerular filtration rate in hypertensive patients with normoalbuminuria and microalbuminuria. Nephrology (Carlton) 2011;16:403-9.

143. Engstrom G. Blood Pressure Increase and Incidence of Hypertension in Relation to Inflammation-Sensitive Plasma Proteins. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2002;22:2054-8.

144. Engstrom G. Effects of Cholesterol and Inflammation-Sensitive Plasma Proteins on Incidence of Myocardial Infarction and Stroke in Men. Circulation 2002;105:2632-7.

145. Kaplan P, Vrtovec B, Jug B. Orosomucoid is an independent predictor of prognosis in chronic heart failure. Wien Klin Wochenschr 2016;128:870-4.

146. Grubb A, Bjork J, Nyman U, Pollak J, Bengzon J, Ostner G, et al. Cystatin C, a marker for successful aging and glomerular filtration rate, is not influenced by inflammation. Scand J Clin Lab Invest 2011;71:145-9.

147. Watt DG, Horgan PG, McMillan DC. Routine clinical markers of the magnitude of the systemic inflammatory response after elective operation: a systematic review. Surgery 2015;157:362-80.

148. Aronsen KF, Ekelund G, Kindmark CO, Laurell CB. Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1972;124:127-36.

149. Booker PD, Taylor C, Saba G. Perioperative changes in alpha 1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery. Br J Anaesth 1996;76:365-8.

150. Karkouti K, Wijeysundera DN, Yau TM, Callum JL, Cheng DC, Crowther M, et al. Acute kidney injury after cardiac surgery: focus on modifiable risk factors. Circulation 2009;119:495-502.

151. Coca SG, Jammalamadaka D, Sint K, Thiessen Philbrook H, Shlipak MG, Zappitelli M, et al. Preoperative proteinuria predicts acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg 2012;143:495-502.

152. Koyner JL, Garg AX, Coca SG, Sint K, Thiessen-Philbrook H, Patel UD, et al. Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery. J Am Soc Nephrol 2012;23:905-14.

153. Rhee C, Sax PE. Evaluation of fever and infections in cardiac surgery patients. Semin Cardiothorac Vasc Anesth 2015;19:143-53.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kustán P, Szirmay B, Kőszegi T, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Mühl D, Németh B, Kiss I, Németh Á, Szabados S, Ajtay Z: Monitoring of urinary orosomucoid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker. *Clin Biochem.* 2017 Jul 21. pii: S0009-9120(17)30445-9. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.010. **IF: 2,434**

Kustán P, Szirmay B, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Kőszegi T, Mühl D: Urinary orosomucoid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(2):299-307. **IF: 3,432**

Kustán P, Szirmay B, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Christensen PH, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T: Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochem Med*. 2016;26(3):421–30. **IF: 2,934**

Az értekezéshez nem használt közlemények

Horváth-Szalai Z, **Kustán P**, Szirmay B, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T: Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis. *J Clin Lab Anal.* 2017 Sep 5. [Epub ahead of print]
doi: 10.1002/jcla.22321. **IF: 1,521**

Kustán P, Horváth-Szalai Z, Mühl D: Nonconventional markers of sepsis. *E-JIFCC*. 2017;28(2):122-33. **IF: ------**

Horváth-Szalai Z, **Kustán P**, Mühl D, Ludány A, Bugyi B, Kőszegi T: Antagonistic sepsis markers: Serum gelsolin and actin/gelsolin ratio. *Clin Biochem*. 2017;50(3):127-33. **IF: 2,434**

Nemeth B, Kiss I, Jencsik T, Peter I, Kreska Z, Koszegi T, Miseta A, **Kustan P**, Boncz I, Laczo A, Ajtay Z. Angiotensin-converting Enzyme Inhibition Improves the Effectiveness of Transcutaneous Carbon Dioxide Treatment. *In Vivo*. 2017;31(3):425-8. **IF: 0,953**

Németh B, Kiss I, Péter I, Ajtay Z, Németh Á, Márk L, Csorba A, Kőszegi T, Mühl D, **Kustán P**: Monitoring of L-arginine and endogenous dimethylarginines in survivor septic patients – a pilot study. *In Vivo.* 2016 09-10;30(5):663-9. **IF: 0,953**

Németh B, **Kustán P**, Németh Á, Lenkey Z, Cziráki A, Kiss I, Sulyok E, Ajtay Z: Aszimmetrikus dimetilarginin: a cardiovascularis betegségek prediktora? *Orvosi hetilap*. 2016;157(13):483-7. **IF: 0,349**

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: ------**

Könyvfejezetek

Péter Kustán, Balázs Szirmay, Diána Mühl, Andrea Ludány: Human orosomucoid in the clinical laboratory. In: T. Kőszegi (Ed.) *Laboratory Techniques with Applicability in Medical practice.* LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 2015. pp:101-120 (ISBN: 978-3-659-31724-8)

Zoltán Horváth-Szalai, **Péter Kustán**, Tamás Kőszegi: New laboratory findings in sepsis. In: T. Kőszegi (Ed.) *Laboratory Techniques with Applicability in Medical practice.* LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 2015 pp:57-76 (ISBN: 978-3-659-31724-8)

Zoltán Horváth-Szalai, **Péter Kustán**, Tamás Kőszegi: Laboratory diagnostics of sepsis. In: A. Chesca (Ed.) *Methods for Diseases Diagnostic with Applicability in Practice*. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 2014. pp. 27-52. (ISBN: 978-3-8473-4502-2)

Péter Kustán, Zoltán Horváth-Szalai, Tamás Kőszegi: Biochemical markers of systemic diseases. In: A. Chesca (Ed.) *Methods for Diseases Diagnostic with Applicability in Practice*. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 2014. pp. 69-104. (ISBN: 978-3-8473-4502-2)

Kustán Péter: Vizelet orosomucoid, mint lehetséges szepszis biomarker. In: Szamonek Vera (szerk.) *XI. Grastyán konferencia kötet*. Pécs, 2013. pp. 223-229. (ISBN: 978 963 642 547 0)

Konferencia előadások

Kustán Péter, Horváth-Szalai Zoltán, Szirmay Balázs: Urinary Orosomucoid as a Potential Diagnostic Marker of Sepsis. 13th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Kralove, 2016.11.24-25.

B. Szirmay, **P. Kustán**, P.H. Christensen, A. Ludány, T. Kőszegi: An automated immune turbidimetric test for urinary orosomucoid: validation and clinical usage. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése*, Szeged, 2016.08.25-27. IN: *Clin Chem Lab Med* 2016;54(10):eA186.

Péter Kustán, Balázs Szirmay, Zoltán Horváth-Szalai, Andrea Ludány, Attila Miseta, Diána Mühl, Tamás Kőszegi: Urinary orosomucoid- automated immunoturbidimetric test and its clinical relevance. *The 8th Conference of PhD Students*, Marosvásárhely, 2015.12.09-10. IN: A*cta medica marisiensis* 2016;61(7):8.

Horváth-Szalai Z, **Kustán P**, Mühl D, Kőszegi T: New protein biomarkers in sepsis. *International CEEPUS Summer School on Complex Diseases*, Portoroz, 2015. 07.23-29.

Szirmay B MD, Kövér A MD, **Kustán P** MD: Informational value of orosomucoid in acute and chronic inflammatory diseases. *International CEEPUS Summer School on Complex Diseases*, Portoroz, 2015. 07.23-29.

Kustán P, Horváth-Szalai Z, Németh B, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T: Sepsis and oxidative stress. *International CEEPUS Summer School on Complex Diseases*, Portoroz, 2015.07.23-29.

Balázs Szirmay, **Péter Kustán**: Human orosomucoid in the clinical laboratory. *7th International Student Medical Congress*, Kassa, 2015. 24-26.

Kustán P: Urinary proteins in sepsis. *14th International Congress of Medical Sciences*, Szófia, 2015. 05.07-10.

Horváth-Szalai Z, **Kustán P**: Promising markers of sepsis: serum actin and gelsolin. *14th International Congress of Medical Sciences*, Szófia, 2015.05.07-10.

Dr. Szirmay Balázs, **Dr. Kustán Péter**, Dr. Ludány Andrea: Humán orosomucoid a klinikai laboratóriumi diagnosztikában. *Tavaszi Szél Konferencia,* Eger, 2015.04.10-12.

Dr. Kustán Péter: Vizelet fehérjék szepszisben. *Tavaszi Szél Konferencia,* Eger, 2015.04.10-12.

Horváth-Szalai Z, **Kustán P,** Kőszegi T: Unusual protein markers of sepsis: serum actin and gelsolin. *XX. Korányi Frigyes Tudományos Fórum,* Budapest, 2015.03.12-13.

Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T: Orosomucoid in urine. A useful biomarker? *International CEEPUS Summer School*, Portoroz, 2014.08.23-29.

Horváth-Szalai Z, **Kustán P**, Ludány A, Mühl D, Bugyi B, Kőszegi T: Serum actin and gelsolin: new potential biomarkers in sepsis? *International CEEPUS Summer School*, Portoroz, 2014.08.23-29.

P. Kustán, Z. Horváth-Szalai, A. Ludány, T. Kőszegi, D. Mühl: Urinary orosomucoid and sepsis. *10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition*, Pécs, 2013.11.04-05.

Z. Horváth-Szalai, **P. Kustán**, T. Kőszegi, A. Ludány, D. Mühl: New potential sepsis biomarker. *10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition*, Pécs, 2013.11.04-05.

Balazs Szirmay, Anna Kover, **Peter Kustan**: Method for the examination of urinary and tear orosomucoid. *HMAA Balatonfüredi nyári konferencia,* Balatonfüred, 2013.08.16-17. IN: Archives of the Hungarian Medical Association of America (ISSN: 1070-0773).

Kustán Péter: Vizelet orosomucoid, mint lehetséges szepszis biomarker. *V. Nemzetközi és XI. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia*, Pécs, 2013.04.17-19.

Szirmay Balázs, Kövér Anna, **Kustán Péter**: Módszer a vizelet és könny orosomucoid vizsgálatára. *XXXI. OTDK Orvos- és egészségtudományi szekció*, Szeged, 2013.04.02-05. IN: *Előadáskivonatok.* Szeged, 2013. pp:294 (ISBN: 978-963-306-203-6)

Szirmay Balázs Gábor, Kövér Anna, **Kustán Péter**: Módszer a vizelet és könny orosomucoid vizsgálatára. *PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia*, Pécs, 2013.02.07-08.

Kustán Péter: Vizelet orosomucoid mérések szeptikus betegek mintáiban. *PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia*, Pécs, 2012.04.17-18.

Konferencia poszterek

Kustán Péter, Szirmay Balázs, Horváth-Szalai Zoltán, Ludány Andrea, Mühl Diána, Kőszegi Tamás: Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. *EuroMedLab Athens 2017*. Athén, 2017.06.11-15. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(Spec.Suppl):s588.

Horváth-Szalai Zoltán, **Kustán Péter**, Szirmay Balázs, Mühl Diána, Ludány Andrea, Kőszegi Tamás: Serum Gc globulin and gelsolin as potential early predictors of sepsis. *EuroMedLab Athens 2017*. Athén, 2017.06.11-15. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(Spec.Suppl):s585.

Szirmay Balázs, **Kustán Péter**, Horváth-Szalai Zoltán, Ludány Andrea, Kőszegi Tamás: Urinary cystatin-c: a new automated particle-enhanced immune turbidimetric test for the routine evaluation of kidney tubular function. *EuroMedLab Athens 2017*. Athén, 2017.06.11-15. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(Spec.Suppl):s803.

Németh Ádám, **Kustán Péter**, Kőszegi Tamás, Kovács L Gábor, Miseta Attila, Mühl Diána, Németh Balázs, Kiss István, Cziráki Attila, Szabados Sándor, Ajtay Zénó: Vizelet orosomucoid monitorozás szívműtéten átesett betegeknél. *Magyar Kardiológusok Társasága 2017. évi Tudományos Kongresszusa,* Balatonfüred, 2017.05.11-13.

Németh Balázs, Kiss István , Péter Iván, Kreska Zita, Kőszegi Tamás, **Kustán Péter**, Ajtay Zénó: Az ACE gátló adása javítja a szén-dioxid kezelés hatékonyságát. *Magyar Kardiológusok Társasága 2017. évi Tudományos Kongresszusa,* Balatonfüred, 2017.05.11-13.

Peter Kustan, Balazs Szirmay, Zoltan Horvath-Szalai, Daniel Ragan, Andrea Ludany, Diana Mühl, Tamas Koszegi: Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. *4th Joint EFLM-UEMS Congress*, Varsó, 2016.09.21-24. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(10):eA324.

Balazs Szirmay, **Peter Kustan**, Per Hjort Christensen, Andrea Ludany, Tamas Koszegi: An automated particle-enhanced immune turbidimetric test for urinary orosomucoid: validation and clinical usage. *4th Joint EFLM-UEMS Congress*, Varsó, 2016.09.21-24. IN: *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(10):eA365.

Zoltán Horváth-Szalai, **Péter Kustán**, Balázs Szirmay, Beáta Bugyi, Diána Mühl, Andrea Ludány, Tamás Kőszegi: Synergistic, predictive protein markers in sepsis: serum Gc globulin and gelsolin. *4th Joint EFLM-UEMS Congress*, Varsó, 2016.09.21-24. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(10):eA365.

P. Kustán, B. Szirmay, Z. Horváth-Szalai, D. Ragán, A. Ludány, D. Mühl, T. Kőszegi: Novel urinary protein markers in sepsis. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése*, Szeged, 2016.08.25-27. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(10):eA199.

Z. Horváth-Szalai, **P. Kustán**, B. Szirmay, B. Bugyi, D. Mühl, A. Ludány, T. Kőszegi: Serum Gc globulin and gelsolin as sepsis markers. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése*, Szeged, 2016.08.25-27. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(10):eA200.

A. Szijjártó, **P. Kustán**, B. Szirmay, E. Györgyi, F. Kilár, T. Kőszegi, A. Ludány, L. Makszin: Microchip electrophoretic analysis of acid soluble serum proteins of patients. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése*, Szeged, 2016.08.25-27. IN: *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(10):eA207.

Z. Horváth-Szalai, **P. Kustán**, D. Mühl, A. Ludány, T. Kőszegi: Unusual biomarkers in serum and urine of septic patients. *21st IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Párizs, 2015.06.21-25. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(Spec.Suppl):s547.

Kustán P, Kőszegi T., Ludány A., Mühl. D: Vizeletfehérjék szepszisben. *Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság 43. Kongresszusa*, Siófok, 2015.05.28-30. IN: *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 2015;45(suppl.1.):33.

Horváth-Szalai Z, **Kustán P**, Mühl D, Kőszegi T: Nem szokványos szepszis markerek: szérum aktin és gelszolin. *Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság 43. Kongresszusa*, Siófok, 2015.05.28-30. IN: *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 2015;45(suppl.1.):41.

P. Kustan, A. Ludany, D. Muhl, Z. Horvath-Szalai, T. Koszegi: Urinary orosomucoid in sepsis: Laboratory approaches. *22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine IFCC-WordLab*, Isztambul, 2014.06.22-26. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(Spec.Suppl):s1368.

Z. Horvath-Szalai, A. Ludany, D. Muhl, **P. Kustan**, B. Bugyi, T. Koszegi: Serum actin and gelsolin: new biomarkers in sepsis? *22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine IFCC-WordLab*, Isztambul, 2014.06.22-26. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(Spec.Suppl):s1365.

Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Kőszegi T, Mühl D: Vizelet orosomucoid szepszisben. *Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság 42. Kongresszusa*, Siófok, 2014.05.22-24. IN: *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 2014;44(suppl.1.):28.

A. Ludany, **P. Kustan**, T. Koszegi, G. Woth, D. Muhl, G.L. Kovacs: Urinary orosomucoid in sepsis. *20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Milánó, 2013.05.19-23. IN: *Biochimica Clinica* 2013;37(3):S299.

Péter Kustán: Urinary orosomuucoid as a marker of sepsis. *9th International Biomedical Croatian Student Summit*, Zágráb, 2013.03.20-23.

T. Kőszegi, **P. Kustán**, A. Ludány, E Györgyi, G Woth, D. Mühl, G.L. Kovács: Urinary orosomucoid in sepsis. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 56. Nagygyűlése*, Budapest, 2012.08.30-09.01. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):eA33.

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora:	**8,80**
Az értekezéshez nem használt közlemények összesített impakt faktora:	**6,21**
A publikációk összesített impakt faktora:	**15,01**

Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use

Péter Kustán[1,2], Balázs Szirmay[1], Zoltán Horváth-Szalai[1], Andrea Ludány[1], Ágnes Lakatos[1], Diána Mühl[2], Per Hjort Christensen[3], Attila Miseta[1], Gábor L. Kovács[1,4], Tamás Kőszegi*[1,4]

[1]Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary
[2]Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary
[3]Dako A/S, Glostrup, Denmark
[4]Szentágothai Research Centre, Pécs, Hungary

*Corresponding author: tamas.koszegi@aok.pte.hu

Abstract

Introduction: Besides routine serum markers of inflammatory diseases, the diagnostic potential of selected urinary proteins has not been fully exploited yet. Former studies revealed that urinary orosomucoid (u-ORM) might have complementary information in inflammatory disorders. Our aim was to develop and validate a fully automated method for u-ORM measurements and to evaluate its potential clinical impact on systemic inflammatory diseases.

Materials and methods: A particle-enhanced immune turbidimetric assay was validated for a Cobas 8000/c502 analyzer to determine u-ORM levels. Spot urine samples from 72 healthy individuals, 28 patients with Crohn's disease and 30 septic patients were studied.

Results: Our assay time was 10 minutes and the detection limit of u-ORM was 0.02 mg/L. The intra- and inter-assay imprecision expressed as CV was less than 5%, and the recovery ranged between 95–103%. Within 10 to 60 years of age, a preliminary reference range for urinary orosomucoid/creatinine ratio (u-ORM/u-CREAT) was found to be 0.08 (0.01–0.24) mg/mmol [median (2.5–97.5 percentiles)]. Compared to controls, a five-fold increase of u-ORM/u-CREAT values in Crohn's disease and approximately a 240-fold increase in sepsis were observed.

Conclusions: We set up a fast, sensitive and precise turbidimetric approach for automated u-ORM determination. Our highly sensitive assay is ideal for routine u-ORM measurements and might be a potential novel laboratory test in the management of systemic inflammatory processes.

Key words: orosomucoid; urine; particle-enhanced turbidimetry; inflammation; biomarker

Received: May 23, 2016 *Accepted: September 19, 2016*

Introduction

The leading causes of global mortality – cardiovascular diseases, diabetes mellitus, malignancies and infections – and their complications are all associated with activation of the inflammatory system. Laboratory parameters are fundamental in these disorders not only for early diagnosis, but also for the detection of complications. Furthermore, biomarkers are particularly useful in risk stratification, prediction of disease progression and outcome. It is additionally advantageous, if a marker can be measured from a non-invasively obtained sample by a fast, automated routine diagnostic procedure.

Human orosomucoid (α-1-acid glycoprotein, ORM) is an extensively glycosylated, abundant constituent of the α-1-globulin family (1). It is an acute phase protein produced mainly by the liver with a molecular mass of 41–43 kDa; however, lower amounts of ORM can be also synthesized by leukocytes and endothelial cells (2). As a member of the lipocalin protein family, ORM plays a role in transporting biomolecules and drugs (3). Furthermore, it has been revealed that ORM takes part in maintaining capillary perm-selectivity, representing its immunomodulatory effect (4,5).

http://dx.doi.org/10.11613/BM.2016.044 *Biochemia Medica 2016;26(3):421–30*

©Copyright by Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

As an acute phase protein, serum concentrations of ORM can increase up to two-three fold in malignancies, inflammatory diseases and severe infection, thus it serves as a general, non-specific inflammatory marker (6,7). ORM can also be found in the urine with much lower concentrations than in serum. However, information on its role in the urine is limited. Most probably it is filtrated through the glomeruli, but the mechanism of urinary excretion of ORM is not well clarified (8).

Former studies revealed that ORM is a considerably abundant component of urinary proteins (8-21). Markedly increased urinary excretion of ORM was found after physical exercise, in acute inflammation, preeclampsia, lupus and also in bladder cancer (9-14). In spite of the fact that the elevation of urinary orosomucoid (u-ORM) concentrations seems to be a non-specific marker, several publications stated that u-ORM might serve advantageous information on early monitoring of certain inflammatory disorders. Elevated u-ORM was described in diabetes mellitus associated with the ongoing chronic low-grade inflammation and endothelial dysfunction and was considered to be an independent predictor of diabetic nephropathy and cardiovascular mortality among patients with type 2 diabetes (15-19). Recent findings suggest that it also might be a potential novel marker for the early detection of chronic heart failure (20). Previously we showed that u-ORM could be a more sensitive marker of inflammation than serum ORM which rises only 2-fold in contrast to even 200-fold increase of u-ORM in sepsis (21). Others also showed that the elevation of u-ORM is much more considerable than that of serum ORM in relation to inflammatory diseases (10,11,17). These results indicate that u-ORM is a reliable marker of chronic and acute inflammatory disorders and provides valuable supplementary information for daily clinical practice.

In spite of promising literature data on the potential utility of u-ORM, a commercially available, sensitive, fast and fully automated laboratory test for u-ORM measurement is unavailable yet. Several different methods exist to determine u-ORM (western blotting, radioimmunoassay, ELISA), though all of these analyses are not appropriate for routine work. In our previous studies we performed an in-house western blot method and a laser nephelometric assay for u-ORM measurements in several patient groups and in healthy individuals (21,22). Although we could determine ORM values in urine, neither techniques are usable in daily routine: western blotting is time consuming; moreover, it is not accurate enough, while nephelometry was not properly sensitive for values found in healthy individuals. Clinical application requires a simple, reliable, fast and sensitive automated method. For this purpose, we decided to adapt and validate a particle-enhanced turbidimetric assay on a fully automated clinical chemistry analyzer for the quantitative determination of ORM in urine. Our further aim was to determine preliminary reference ranges of u-ORM in different age groups of healthy individuals and to investigate its applicability in acute and chronic inflammatory diseases.

Materials and methods

Methods

Instrumentation, reagents, assay conditions

The latex particle-enhanced turbidimetric (PET) assay for u-ORM measurement was carried out on the c502 module of a Cobas 8000 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). An open developmental channel was used for this application.

The determination of u-ORM was performed by using anti human rabbit Orosomucoid Immunoparticles (ref. no. OA504, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) and Reaction Buffer (ref. no. PO1812, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). The antigen, antibody and buffer volumes were optimized during the validation period.

Considering that there are no commercially available urinary ORM calibrators and controls, dilution series of N Protein Standard SL for BN II Systems (ref. no. OQIM13, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) with 788 mg/L orosomucoid concentration were used for calibration and two different dilutions (4.125 and 0.825 mg/L, respectively) of N/T Protein Control SL/L (ref. no.

OQIN13, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) were applied as controls. All the dilutions of calibrators, controls and samples were made by sterile 154 mmol/L NaCl solution which was also used as blank sample.

The optimal assay volumes were assessed using a wide concentration range of the calibrator (0.1–31.5 mg/L), and a working range below the equivalence zone was chosen (antibody excess). Two-point end assay type was set using 10-minute reaction time. The wavelength used for the turbidimetric reaction was 546 nm and delta absorbance was calculated after pipetting the latex-antibody particles (self-blank, between 38–70 measuring points). The calibrator/control/sample volume was 7 µL and the latex-antibody volume was 40 µL. Full calibration was performed by applying a six-point standard curve (blank plus five different dilutions of the calibrator) and the spline graph evaluation method was used. The assay was performed at 37 °C.

Validation protocol

The validation protocol of our u-ORM assay is based on the 2nd edition of Eurachem guidelines (23). The analytical limits were obtained by using the absorbance data of 30 independent determinations of blank samples. Mean, standard deviation (SD) and coefficients of variation (CV) were calculated. Limit of blank (LOB) was determined as the mean absorbance value + 1.645 x SD of the blank samples (24), limit of detection (LOD) was calculated as the blank mean + 3 x SD, while limit of quantification (LOQ) as the blank mean value + 10 x SD. The corresponding concentrations were defined using cubic spline interpolation of the absorbance data by the Origin Pro8 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Functional sensitivity was evaluated from five independent dilution series of a urine sample (0.025 - 0.390 mg/L) measured on five consecutive days in two parallels. Functional sensitivity was set at the lowest u-ORM concentration where the CV reached 20%.

For intra- and inter-assay imprecision measurements we used dilutions of PreciControl ClinChem Multi 2 (PC2, ref. no. 05117216 190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) with 845 mg/L orosomucoid concentration. Four different dilution levels of PC2 were used for the assessment of intra-assay (within run) imprecision by ten parallel measurements on the same day and for that of inter-assay (between run) imprecision using duplicate measurements on ten consecutive days. Also, recovery was calculated from the measured and theoretical value at four levels of PC2 and was expressed as % (N = 40 for each level). Linearity was determined by two parallel measurements of ten different dilutions of a urine sample in the range of 0.10–4.68 mg/L.

Five different urine samples (ranging from 0.52 to 4.11 mg/L) were selected for stability studies. Specimens were divided into aliquots and were stored at 2–8 °C for 10 days. U-ORM was determined right after sample collection and on the 3rd, 5th, 8th and 10th day, respectively. Urinary orosomucoid stability after freezing - thawing cycles was also assessed. Aliquots of the samples without any preservatives were frozen at -70 °C and subsequently thawed at 37 °C, then u-ORM was measured thereafter, five freezing – thawing cycles were performed with a simultaneous u-ORM determination.

Method comparison

A reference method for u-ORM measurements is not available; therefore, our results measured by turbidimetric assay were compared to results obtained by western blotting which was previously used, too (21). Urine samples from healthy individuals and various patients were analyzed by western blotting using primary anti-orosomucoid antibodies (ref. no. Q0326, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) and secondary horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit immunoglobulins (ref. no. P0217, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). For the chemiluminescent detection and immunoblotting evaluation a charged coupled device (CCD) camera and software (Syngene, Cambridge, UK) was used. Dilution series of the N Protein Standard SL (ref. no. OQIM13, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) were used for calibration of the western blot method after densitometry by plotting the chemi-

luminescence signal of the standards *vs* the standards' concentrations. A linear regression fit was applied (R^2 = 0.996). For the quantitative evaluation of the samples in each blot the same urine sample with known u-ORM concentration of a healthy individual was applied as an internal standard.

Subjects

In order to determine the reference range for u-ORM, healthy volunteers (N = 72) were recruited between the age of 10 and 60 years among whom three age groups were created (10–20, 21–40, and 41–60 years, respectively). Healthy state was assessed if the person had no chronic illness, no complaints, and no symptoms on medical examination and did not take prescribed medicines. Accordingly, exclusion criteria were inflammation (based on hs-CRP, white blood cell count and clinical signs), any kind of chronic diseases (based on medical records) or the lack of consent. U-ORM was also analyzed in patients with clinical diagnosis of Crohn's disease (N = 28) independently from disease activity and in patients with sepsis (N = 30). Our study was performed from January 2014 to November 2015. The study was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs, Medical School in accordance with the Helsinki declaration (no. 4327.316-2900/KK15/2011). Every patient and control individual was fully informed and written consent was obtained from all of them. Spontaneous random urine samples and venous blood were simultaneously obtained from the participants. After centrifugation (1500 x g, 10 minutes) of clotted blood and urine samples, supernatants were collected into aliquots and stored at -70 °C until use. We measured urinary total protein (u-TP) and creatinine on Cobas 8000 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). We expressed our u-ORM data not only in mg/L concentrations but also in u-ORM/ urinary creatinine (u-CREAT) ratio (mg/mmol) and in u-ORM/u-TP (%) proportion. Also, hs-CRP and creatinine were measured from serum samples.

Statistical analyses

The distribution of our variables was determined by Shapiro-Wilk analyses. For comparison of the laboratory parameters of our patient groups Kruskal-Wallis test was used when the distribution was not normal. To assess gender differences the Mann Whitney U test was performed. Reference interval for u-ORM, u-ORM/u-CREAT and u-ORM/u-TP were determined at 95% confidence interval. Passing- Bablok regression analyses and Bland-Altman plots were used to compare the methods. The continuous variables were expressed as medians with percentiles in case of non-normal distribution. A p value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Statistical analyses were performed by MedCalc Statistical Software version 16.8 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Results

Validation data

The calibration curve obtained from 22 independent calibrations is shown in Figure 1A. The calibrated working range for u-ORM measurements was between 0.16–5.25 mg/L. Samples at above 5.25 mg/L u-ORM concentrations had to be diluted due to the hook effect experienced (Figure 1B) while those under the lowest calibration point (0.16 mg/L) of the assay could be determined down to at least of 0.08 mg/L. LOB, LOD, LOQ of our u-ORM assay were calculated as previously described, and were 0.0095, 0.02 and 0.08 mg/L, respectively. The functional sensitivity of our assay was assessed to be 0.03 mg/L (Figure 2A).

Both intra- and inter- assay imprecision was determined to be less than 5% of CV and even recovery of our u-ORM assay was found to vary between 95.69 - 102.51% (Table 1). The assay showed good linearity (R^2 = 0.999) in the range of 0.1–4.68 mg/L (Figure 2B).

Stability studies

During 10 days of storage at 2–8 °C we found no significant difference in the recovery of u-ORM concentrations of the urine samples (97.2–109.2%). Furthermore, we found no significant decrease in u-ORM concentrations after repeated freeze-thaw cycles. Even at the 5th cycle the recovery remained quite acceptable as presented in Table 2.

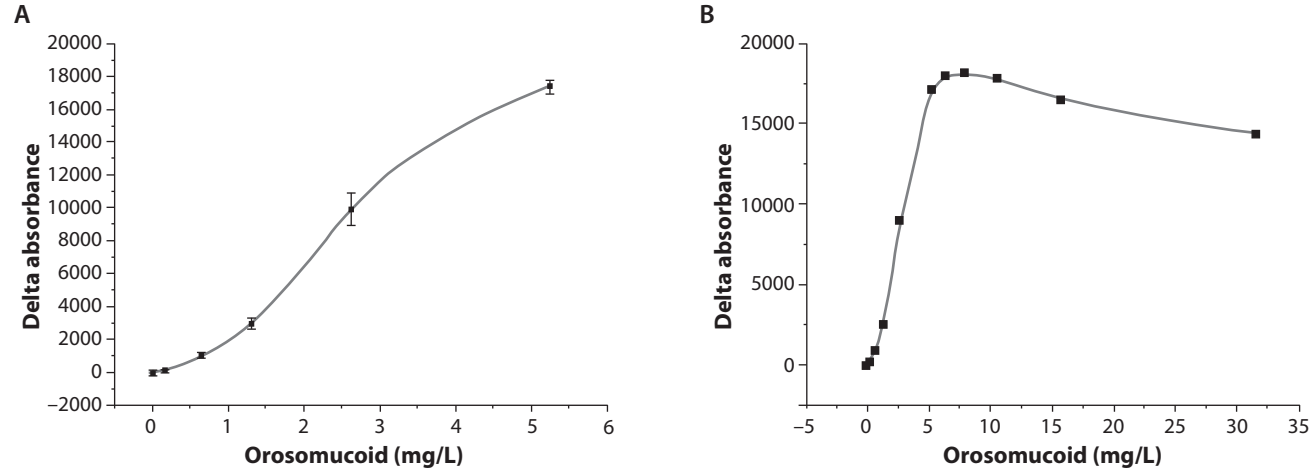


Figure 1. Calibration and dose response curve of u-ORM.
(A) Cumulative graph of a 6-point calibration curve of the assay in the range of 0.16–5.25 mg/L with spline graph fitting. Calibrators' mean ± standard deviations from 22 separate calibrations are represented by red dots and bars.
(B) Dose response curve from serial dilutions of the calibrators in the range of 0.1-31.5 mg/L.

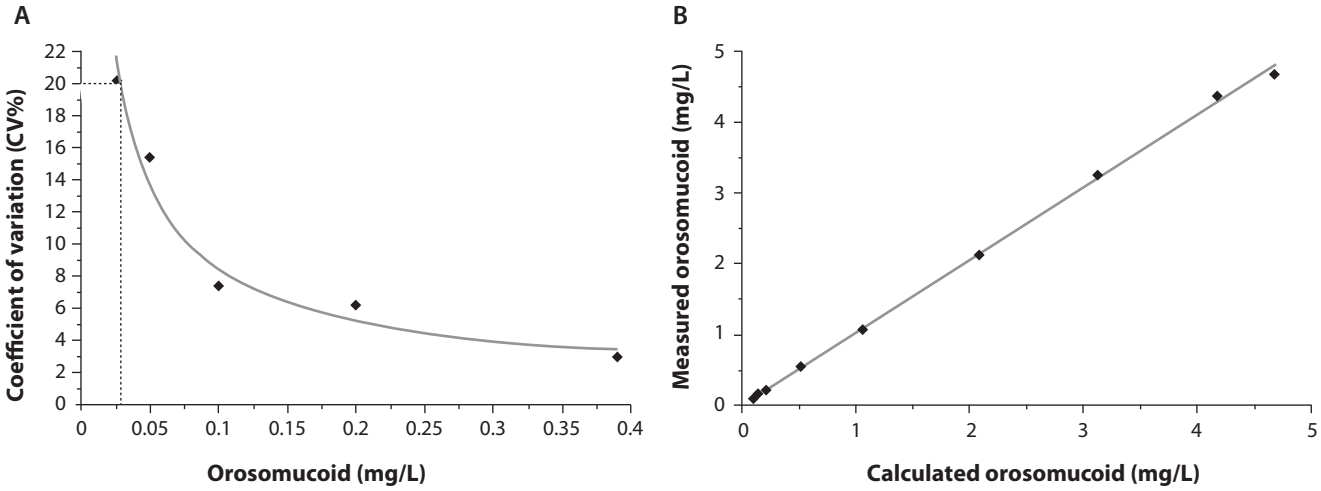


Figure 2. Functional sensitivity and linearity of the u-ORM assay.
(A) Functional sensitivity was determined to be 0.03 mg/L (dashed line).
(B) Linearity was studied by diluting a urine sample within the range of 4.68–0.10 mg/L in 10 different dilutions. The regression line equation (y = bx + a) is: y = 1.021 x + 0.015, R^2 = 0.999. a - Regression line's intercept. b - Regression line's slope. R^2 –Coefficient of determination. Mean values of parallel measurements are presented.

Table 1. Imprecision and recovery data of u-ORM assay.

Sample	Target value, mg/L	Intra-assay (N = 10)			Inter-assay (N = 20)		
		Mean ± SD, mg/L	CV, %	Recovery, %	Mean ± SD, mg/L	CV, %	Recovery, %
c1*	3.86	3.73 ± 0.08	2.01	96.70	3.83 ± 0.13	3.50	99.24
c2*	2.11	2.06 ± 0.01	0.45	97.98	2.17 ± 0.04	1.77	102.51
c3*	0.64	0.62 ± 0.01	1.92	95.69	0.63 ± 0.03	4.29	98.31
c4*	0.30	0.30 ± 0.01	4.44	100.71	0.30 ± 0.01	4.55	100.18

*Samples were dilutions from PC2 control. SD – standard deviation. CV – coefficient of variation.

Table 2. Stability studies of urinary orosomucoid

Initial u-ORM concentration, mg/L	Storage at 2-8 °C				Thawing-freezing cycles				
	Day 3, %	Day 5, %	Day 8, %	Day 10, %	Cycle 1, %	Cycle 2, %	Cycle 3, %	Cycle 4, %	Cycle 5, %
4.11	98.4	103.6	105.7	109.2	106.3	108.3	109.5	111.7	112.9
3.61	99.1	101.5	102.4	106.6	105.5	106.7	106.4	105.3	104.6
2.74	98.9	100.5	103.0	105.8	104.6	105.7	104.2	104.5	103.6
1.23	97.2	98.8	99.1	107.9	106.3	108.2	109.4	112.6	113.1
0.52	104.5	98.8	-*	-*	104.5	104.8	102.0	107.6	110.0

Urinary ORM concentrations are referred to initial concentration and expressed in %. *sample with 0.52 mg/L initial concentration could not be tested on day 8 and 10 because of non-expected sample error.

Method comparison

96 samples with a u-ORM concentration range of 0.23–292 mg/L were analyzed by western blotting and the new turbidimetric assay. We found a strong positive correlation ($r = 0.924$, $p < 0.001$) between the results obtained by the two methods; however, the concentrations determined by western blotting were lower than those obtained by immune turbidimetry and a proportional difference between the methods was found. The comparison of the methods is illustrated in Figure 3.

Reference range, patients

The data of healthy individuals are listed in Table 3. We found no significant differences in u-ORM excretion between the three age-groups of healthy volunteers, therefore we suggest pooling all the data and using a common reference value for all cases between 10–60 years. Based on the spontaneous u-ORM concentrations of 72 healthy persons, the following reference intervals, expressed as median (2.5–97.5 percentiles), could be defined: 0.69 (0.13–2.96) mg/L for u-ORM, 0.08 (0.01–0.24)

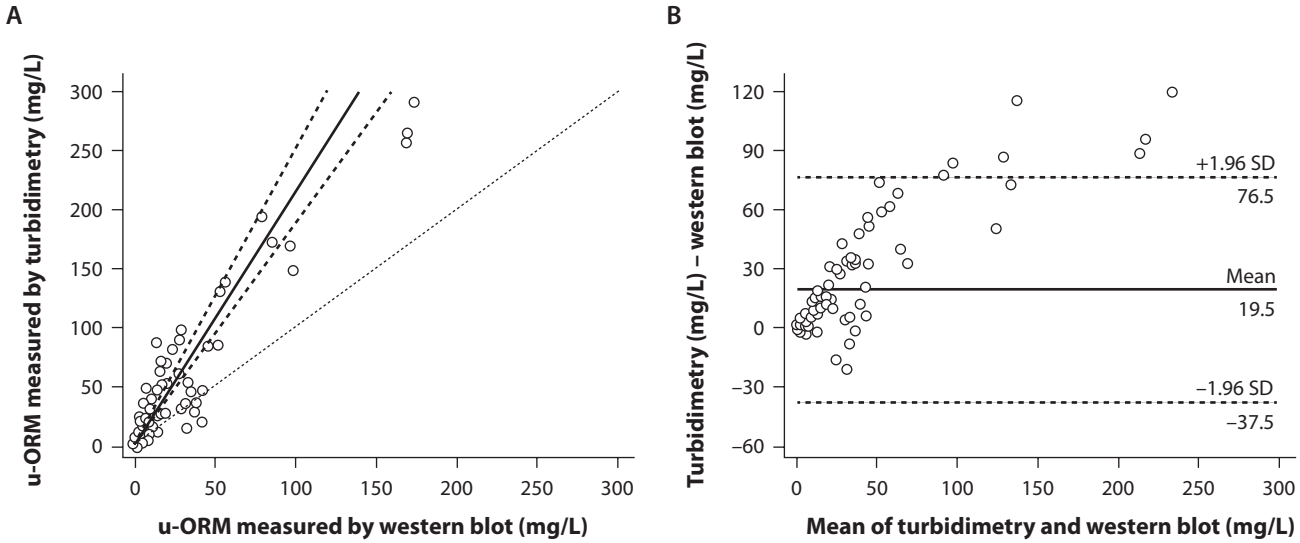


Figure 3. Comparison of quantitative western blotting and the new automated turbidimetric assay for u-ORM measurement.
(A) Passing-Bablok regression analysis. Regression line equation (y = a (95% CI) + b (95% CI) x) is y = 0.154 (-0.396 to 0.574) + 2.143 (1.882 to 2.523) x. a - Regression line's intercept. b - Regression line's slope. 95% CI - 95% confidence interval. Cusum test for linearity showed no significant deviation from linearity (P = 0.95). Solid line - regression line. Dashed lines - 95% CI for the regression line. Dotted line - identity line (x = y).
(B) Bland-Altman plot of the mean concentration against the difference for the compared methods. Solid line (mean) – mean difference. Dashed lines (SD) – standard deviation.

Table 3. Preliminary reference ranges of u-ORM values in healthy individuals

	Group 1, N = 30	Group 2, N = 19	Group 3, N = 23	P	Total control group, N = 72
Females, N (proportion)	13 (0.43)	9 (0.47)	15 (0.65)	NA	37 (0.51)
Age, years	14 (10–18)	29 (21–39)	51 (40–58)	NA	23 (10–58)
U-ORM, mg/L	0.56 (0.10–2.96)	0.71 (0.25–2.30)	0.76 (0.14–2.64)	0.730	0.69 (0.13–2.96)
U-ORM / u-CREAT, mg/mmol	0.09 (0.02–0.19)	0.07 (0.01–0.35)	0.08 (0.02–0.24)	0.590	0.08 (0.01–0.24)
U-ORM / u-TP, %	0.91 (0.21–2.34)	1.09 (0.24–3.24)	1.36 (0.32–4.32)	0.170	1.00 (0.21–3.58)

Data are presented as median and 2.5–97.5 percentiles. Age is presented as median (range). Kruskal-Wallis test was used to compare the different age groups of controls. P < 0.05 was considered statistically significant. NA–not applicable. U-ORM – urinary orosomucoid. u-CREAT – urinary creatinine. u-TP – urinary total protein.

mg/mmol for u-ORM/u-CREAT and 1.00 (0.21–3.58)% for u-ORM/u-TP proportion. There was no significant difference in u-ORM/u-CREAT between females and males in the three control groups. However, significantly elevated u-ORM concentration (P = 0.034) and u-ORM/u-TP (P = 0.023) were observed in males compared to females (1.3 mg/L and 2.29%, 0.49 mg/L and 0.62%, respectively) in the age group of 41–60 years. Regarding past medical history and laboratory data (serum creatinine concentrations) in our control group, normal kidney function was hypothesized and also no proteinuria and no inflammatory activity were observed in healthy individuals.

We found significantly elevated (P < 0.001) u-ORM concentrations in inflammatory diseases (Table 4). Compared to controls, about a 5-fold increase of u-ORM/u-CREAT ratios in Crohn's disease (0.40 mg/mmol, P < 0.001) and an extreme, approximately 240-fold elevation in sepsis (19.13 mg/mmol, P < 0.001) was found. The observed u-ORM concentration in severe sepsis was significantly higher (P < 0.001) than that in morbus Crohn. Likewise, significant elevation was discovered in u-ORM/u-TP proportions both in sepsis and in Crohn's disease compared to healthy people (P < 0.001).

Discussion

In the present study we reported the adaptation and validation of an automated immune turbidi-

Table 4. Urinary orosomucoid concentrations in inflammatory diseases

	Total control group, N = 72	Crohn's disease, N = 28	Sepsis, N = 30	P
Females, N (proportion)	37 (0.51)	15 (0.54)	11 (0.37)	NA
Age, years	23 (10–58)	27 (12–62)	67 (30–82)	NA
Serum creatinine, (µmol/L)	64 (55–75)	59 (50–71)	130 (104–181)	< 0.001
hs-CRP, mg/L	0.60 (0.30–1.50)	6.10 (2.95–14.16)	260.09 (158.16–335.73)	< 0.001
U-ORM, mg/L	0.69 (0.33–1.13)	4.15 (1.97–10.30)	90.21 (42.01–137.23)	< 0.001
U-ORM / u-CREAT, mg/mmol	0.08 (0.05–0.15)	0.40 (0.20–1.08)	19.13 (13.04–32.80)	< 0.001
U-ORM/u-TP, %	1.00 (0.54–1.69)	3.72 (2.48–6.41)	18.71 (11.88–34.86)	< 0.001

Data are presented as median and 25–75 percentiles. Age is presented as median (range). Kruskal-Wallis test was used to compare variables in different groups. P < 0.05 was considered statistically significant. NA – not applicable. Hs-CRP – high sensitive C-reactive protein. U-ORM – urinary orosomucoid. u-CREAT – urinary creatinine. u-TP – urinary total protein.

metric assay for u-ORM measurements on Cobas 8000/c502 platform, and also pointed out its potential clinical relevance.

This new turbidimetric approach was set up to be fast, sensitive and precise, therefore it is ideal for routine u-ORM determinations. The imprecision of our method was tested by using diluted controls with a CV at around 5%. Therefore, taken real urine samples we accepted the quality requirements for this assay with an imprecision of less than 10% as CV. The test requires only 10 minutes. Due to the extraordinarily low LOQ (0.08 mg/L) and the good functional sensitivity (0.03 mg/L) our PET assay enables the quantitative u-ORM determination in all healthy individuals and, after proper dilution in patients suffering from systemic inflammatory diseases. However, due to the narrow security zone, a 20-fold predilution of all urine samples is suggested in order to automatically extend the measurable concentration limit up to 105 mg/L. Samples containing low orosomucoid concentrations (< 1 mg/L) can be retested without dilution however these samples' data has no clinical relevance.

Although, u-ORM seems to be a promising marker in diseases with systemic inflammatory activation, up to now only Christiansen *et al*. described an automated turbidimetric immunoassay for u-ORM determination similar to ours (25). Nevertheless, our assay settings allow more sensitive determination compared to their detection limit (0.05 mg/L); moreover our method seems to be more precise in the lower concentration range.

In agreement with other studies we also proved that ORM in urine is stable in vitro (25, 26). Our results showed that within 10 days the u-ORM concentrations are considerably constant in samples without additives and stored at 2-8 °C. Furthermore, we found no loss in u-ORM concentration during 5 freezing-thawing cycles. These results support that urine samples can be stored at 2-8 °C even for 10 days before analysis, and in case of delayed analysis for any reason, samples can be frozen and tested later.

In our preliminary studies, we found dramatically higher u-ORM concentrations in sepsis by immunoblotting (21,22). Good correlation between the immunoblotting results and this PET immunoassay was found, although the methods are not directly comparable due to systemic bias. The use of quantitative u-ORM determination by immunoblotting, on the grounds of the methodological uncertainty, imprecision and time demand means that western blotting is unsuitable for daily routine u-ORM testing.

In our present work, we found a low urinary orosomucoid excretion rate in healthy persons. The expression of urinary protein concentrations referred to urinary creatinine is necessary in order to reduce the large inter-individual variability in the amount of excreted protein of urine samples. Based on spot urine samples of 72 healthy volunteers from different age groups between 10–60 years, we determined a preliminary reference range for u-ORM/u-CREAT to be 0.01–0.24 mg/mmol with a median of 0.08 mg/mmol. Our results are in accordance with former studies (25, 27, 28). Tencer *et al.* analyzed 95 healthy adults and established an upper reference limit for u-ORM/u-CREAT at 0.7 mg/mmol. They found no correlation with age and found no differences between the gender and the type of urine collection (27). Hjorth *et al.* determined a cut off value for u-ORM/u-CREAT by single radial immunodiffusion of 0.5 mg/mmol in 233 children and in infants at the age from 1 month to 15 years. They found significantly higher u-ORM concentrations in neonates in the first month (28). Christiansen *et al.* described a similar reference range to ours for u-ORM/u-CREAT of 0.009–0.17 mg/mmol, with a median value of 0.04 mg/mmol measured by their u-ORM PET assay. In the examined 69 adults with mean age of 43 years they also found higher urinary orosomucoid excretion in men than in women however, the differences disappeared when results were corrected to body surface area (25). We also noticed significant differences in u-ORM concentration between females and males above 40 but if u-ORM were corrected to u-CREAT, as expectable no differences were observed. Therefore, u-ORM level is suggested to be expressed as urinary orosomucoid/creatinine ratio in order to make results easier to interpret in different patients. We conclude that our preliminary u-ORM reference values seem to be

suitable for both children and adults, furthermore our method is precise and sensitive enough to measure urinary orosomucoid in every healthy individual.

To date no studies have been reported regarding the u-ORM concentrations in Crohn's disease, however serum ORM is a well-known marker of morbus Crohn (29). Our observations suggest that elevated u-ORM may also provide additional information on this disease. So far, in sepsis only one paper with 7 septic patients reported a 280-fold increase of u-ORM excretion, which is similar to our results based on a larger sample size (10). The observed early and extreme elevation of u-ORM indicates that it could be a potential biomarker of sepsis.

During urinalysis we further observed a relative increase in u-ORM/u-TP proportion – both in Crohn's disease and in sepsis, which indicates that ORM becomes a prominent protein component in urine during inflammation. The observed increase of u-ORM values in our patient groups supports the hypothesis that u-ORM elevation is caused by inflammatory activity. Although the cause of such elevation is probably multifactorial, both systemic inflammation and renal factors are supposed to be responsible for it. Based on our results, we further support the hypothesis that u-ORM is a sensitive marker of systemic inflammation.

This study has several limitations. Although, we demonstrated examples for the possible clinical utilization of u-ORM measurements, this study reports only the analytical validation of u-ORM assay, and it is not a diagnostic accuracy study (30). Further research is required to describe the diagnostic performance of u-ORM in inflammatory diseases. Calibrators, control materials and a reference method are not commercially available for u-ORM measurements, only for serum testing. Therefore, in our u-ORM assay validation diluted serum calibrators/controls were used. For these reasons, the accuracy of our test could not be determined; rather recovery was calculated from the appropriate dilutions of PC2. The functional sensitivity was tested down to 0.025 mg/L ORM, where the sample's CV exceeded 20%. The reported preliminary reference range was established by investigation of a relatively small healthy population. The robustness of our assay could not be estimated on other automated analyzers. Furthermore, we may refer only to potential interferences of the assay, which were tested previously, and no interference was found with albumin (20 g/L), hemoglobin (5 g/L), bilirubin (600 mg/L), creatinine (5 g/L) and glucose (100 g/L) (25).

In conclusion, we described the validation of a sensitive, precise and fully automated particle-enhanced immune turbidimetric assay for urinary orosomucoid which serves early and valuable information on inflammatory diseases. Our assay is ideal for routine clinical utilization to measure u-ORM as a possible novel marker of inflammatory activity.

Acknowledgements

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. The work was financially supported by GINOP-2.3.2-15-2016-00021 „The use of chip-technology in increasing the effectiveness of human in vitro fertilization" and NKFI-EPR K/115394/2015 "Early biochemical indicators of embryo viability" grants. Hereby we express our special thanks to Roche Magyarország Kft. for their support, and also the invaluable technical help of Zoltán Horváth (Roche Magyarország Kft.) is highly appreciated.

Potential conflict of interest

None declared.

References

1. *Schmid K. a1-acid glycoprotein. In: Putnam FW, ed. The plasma proteins. New York: Academic Press; 1975. p.183–228. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-568401-9.50011-6.*
2. *Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim Biophys Acta 2000;1482:157–71. http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00153-9.*

3. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metab Rev 2001;33:161-235. http://dx.doi.org/10.1081/DMR-100104402.
4. Haraldsson BS, Johnsson EK, Rippe B. Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. Kidney Int 1992;41:310–6. http://dx.doi.org/10.1038/ki.1992.43.
5. Sörensson J, Matejka GL, Ohlson M, Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. Am J Physiol 1999;276:H530–4.
6. Hochepied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. α1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:25-34. http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00054-0.
7. Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein α1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. Curr Protein Pept Sci 2007;8:91-108. http://dx.doi.org/10.2174/138920307779941497.
8. Christiansen MS, Hommel E, Friberg L, Molvig J, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Increased urinary orosomucoid excretion rate is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. J Diabetes Complications 2010;24:28-36. http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2008.08.001.
9. Poortmans JR, Haralambie G. Biochemical changes in a 100 km run: proteins in serum and urine. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1979;40:245-54. http://dx.doi.org/10.1007/BF00421516.
10. Magid E, Guldager H, Hesse D, Christiansen MS. Monitoring urinary orosomucoid in acute inflammation: observations on urinary excretion of orosomucoid, albumin, alpha1-microglobulin, and IgG. Clin Chem 2005;51:2052-8. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.055442.
11. Kronborg CS, Allen J, Vittinghus E, Knudsen UB. Pre-symptomatic increase in urine-orosomucoid excretion in pre-eclamptic women. Acta Obstet Gynecol Scand 2007;86:930-7. http://dx.doi.org/10.1080/00016340701371322.
12. Christiansen MS, Hesse D, Ekbom P, Hesse U, Damm P, Hommel E, et al. Increased urinary orosomucoid excretion predicts preeclampsia in pregnant women with pregestational type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2010;89:16-21. http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2010.03.018.
13. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, Greis KD, Haines K, Klein-Gitelman MS, et al. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. Pediatr Res 2009;65:530–6. http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e4305.
14. Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, et al. Stage dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha-2-glycoprotein in urinary bladder cancer. Proteomics 2005;5:4296-304. http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200402005.
15. Christiansen MS, Iversen K, Larsen CT, Goetze JP, Hommel E, Molvig J, et al. Increased urinary orosomucoid excretion: a proposed marker for inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. Scand J Clin Lab Invest 2009;69:272-81. http://dx.doi.org/10.1080/00365510802531100.
16. Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Liu H, Hou X, et al. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy. Nephrology (Carlton) 2009;14:332-7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2008.01053.x.
17. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine is a powerful predictor of cardiovascular mortality in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes at five years of follow-up. Diabetologia 2005;48:386–93. http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1630-1.
18. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine predicts cardiovascular and overall mortality in patients with type II diabetes. Diabetologia 2002;45:115–20. http://dx.doi.org/10.1007/s125-002-8251-3.
19. Svendstrup M, Christiansen MS, Magid E, Hommel E, Feldt-Rasmussen B. Increased orosomucoid in urine is an independent predictor of cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes at 10 years of follow-up. J Diabetes Complications 2013;27:570-5. http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.05.008.
20. Hou LN, Li F, Zeng QC, Su L, Chen PA, Xu ZH, et al. Excretion of urinary orosomucoid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. PLoS One 2014;9:e107550. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107550.
21. Kustán P, Szirmay B, Mühl D, Ludány A. Human orosomucoid in the clinical laboratory. In: Kőszegi T, ed. Techniques with applicability in medical practice. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing; 2015. p.101-20
22. Kustan P, Ludany A, Muhl D, Horvath-Szalai Z, Koszegi T. Urinary orosomucoid in sepsis: laboratory approaches. Clin Chem Lab Med 2014;52:S1368.
23. Magnusson B, Örnemark U, eds. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods - A Laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. 2014. Available at: https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv. Accessed June 23rd 2016.
24. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin Biochem Rev 2008;29:S49-52.
25. Christiansen MS, Blirup-Jensen S, Foged L, Larsen M, Magid E. A particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of orosomucoid in urine: development, validation and reference values. Clin Chem Lab Med 2004;42:1168–77. http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2004.237.
26. Tencer J, Thysell H, Andersson K, Grubb A. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-chain immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin in urine stored at various conditions. Scand J Clin Lab Invest 1994;54:199-206. http://dx.doi.org/10.1080/00365519409088425.
27. Tencer J, Thysell H, Grubb A. Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin. Scand J Clin Lab Invest 1996;56:691-700. http://dx.doi.org/10.3109/00365519609088816.
28. Hjorth L, Helin I, Grubb A. Age-related reference limits for urine levels of albumin, orosomucoid, immunoglobulin G and protein HC in children. Scand J Clin Lab Invest 2000;60:65-73. http://dx.doi.org/10.1080/00365510050185056.
29. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:247-55. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03184.x.
30. Šimundić AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. Available at: http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/190404200805.pdf. Accessed September 16th 2016.

Péter Kustán*, Balázs Szirmay, Zoltán Horváth-Szalai, Andrea Ludány, Gábor L. Kovács, Attila Miseta, Tamás Kőszegi and Diána Mühl

Urinary orosomucoid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance

DOI 10.1515/cclm-2016-0840
Received September 19, 2016; accepted September 29, 2016; previously published online November 7, 2016

Abstract

Background: In order to help clinical decision making, we investigated the diagnostic and prognostic ability of urinary orosomucoid (u-ORM) as a new sepsis biomarker, and compared its performance to classical inflammatory parameters.
Methods: We monitored u-ORM in septic (n = 43) and SIRS (n = 13) patients in a 5-day follow-up study vs. control patients (n = 30). U-ORM was measured by a newly developed turbidimetric assay. U-ORM values were referred to urinary creatinine and expressed as u-ORM/u-CREAT (mg/mmol).
Results: Significantly higher ($p < 0.001$) u-ORM/u-CREAT levels were found in sepsis than in SIRS. Both intensive care unit (ICU) groups showed strongly elevated values compared to controls ($p < 0.001$). The medians of admission u-ORM/u-CREAT levels were 19.2 in sepsis, 2.1 in SIRS and 0.2 mg/mmol in controls. The area under the receiver operating characteristic curve for distinguishing SIRS from sepsis was found to be 0.954 for u-ORM/u-CREAT, superior to serum ORM and hsCRP. U-ORM levels did not change during the 5-day follow-up and were independent of the severity of sepsis however, we found extremely elevated u-ORM/u-CREAT values in dialyzed septic patients (52.2 mg/mmol as median).
Conclusions: The early and relevant increase of u-ORM in sepsis suggests that it might be a promising novel marker of sepsis and could be a valuable part of routine laboratory and clinical practice.

Keywords: α1-acid glycoprotein; biomarker; diagnosis; sepsis; SIRS; urinary orosomucoid.

***Corresponding author: Dr. Péter Kustán,** Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary, Phone: +36 30 248 3289, Fax: +36 72 536 121, E-mail: peter.kustan89@gmail.com; and Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs, Pécs, Hungary
Balázs Szirmay, Zoltán Horváth-Szalai and Andrea Ludány: Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary
Gábor L. Kovács, Attila Miseta and Tamás Kőszegi: Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary; and János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary
Diána Mühl: Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs, Pécs, Hungary

Introduction

Although sepsis syndrome has been known since ancient times it still remains a challenging healthcare problem in the 21st century [1]. Sepsis with an approximately 30% mortality rate and high costs of care is one of the most serious conditions in intensive care unit (ICU) admissions [2, 3]. To improve disease outcome, early diagnosis and goal-directed therapy is necessary [4, 5]. Besides clinical signs, laboratory parameters provide the most efficient help in rapid diagnosis and in starting appropriate therapy as early as possible.

The diagnostic guidelines regarding sepsis dedicated serum procalcitonin (PCT) and high-sensitivity C-reactive protein tests (hsCRP) to be the most useful markers, nowadays [4]. Due to their limitations (sensitivity, specificity, etc.) hundreds of further potential sepsis biomarkers in blood have been studied [6]. Nevertheless, urinary markers have not been explored as much, although proteinuria is a well-known phenomenon in infections and in sepsis as well [7]. Therefore, monitoring of specific urinary proteins might provide clinically useful information [8].

Orosomucoid (ORM) – also called α1-acid glycoprotein – is a major positive acute phase protein accounting for 1%–1.5% of total serum proteins [9]. Besides its transport function, ORM has relevant anti-inflammatory and immunomodulation activity. In vitro studies showed, that ORM has several effects on all major leukocyte types: it inhibits lymphocyte proliferation, neutrophil chemotaxis, superoxide generation and platelet aggregation, as well [10]. Animal experiments confirmed that ORM improves the outcome from different types of shock, sepsis, and it is important to maintain perfusion of vital organs, and

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

regulating capillary permeability [11–15]. Besides hepatocytes, leukocytes and endothelial cells can also synthetize ORM. In response to acute stimuli – as a result of glucocorticoid and cytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α) release – the serum level of ORM increases several-fold [16].

Increased serum orosomucoid (se-ORM) concentrations have been described in several disorders with inflammatory activation, like immunological diseases, Crohn's disease, tumors and infections [17]. An elevation of se-ORM with possible diagnostic performance for sepsis was recently reported [18].

Only a little is known about the mechanism of urinary appearance of ORM. Due to its 43 kDa molecular weight, most probably it is filtrated through the glomeruli, but further renal factors might also play a role in its excretion, however, the exact biochemical process is not well understood.

Moderately increased urinary orosomucoid (u-ORM) levels have already been studied in diseases associated with chronic inflammatory activation [19–24].

Elevated u-ORM excretion was recently described as a potential early marker of chronic heart failure [19]. Also, increased u-ORM was found in diabetes mellitus as a predictor of diabetic nephropathy [20] and is thought to be an independent risk factor of mortality in association with the ongoing chronic low grade inflammation and endothelial dysfunction [21–23]. Increased u-ORM excretion was reported as a predictor of preeclampsia, explained by local renal inflammatory response [24]. These findings suggest that u-ORM might serve as a general inflammatory marker.

In the present work, we monitored u-ORM excretion in critically ill patients with an automated immune turbidimetric assay, hypothesizing that u-ORM is a useful marker of sepsis. The aim of our study was to explore u-ORM as an early diagnostic marker of severe sepsis and to describe its suspected association with sepsis-related organ dysfunctions and prognostic value for mortality prediction.

Materials and methods

Study design

Our study was performed at our adult multidisciplinary ICU from September 2014 to October 2015. The study protocol in accordance with the 2008 Declaration of Helsinki was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs (no. 4327.316-2900/KK15/2011). The patients or their next of kin were informed regarding the study protocol and sampling, and written consent was obtained from all. Consecutive patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and severe septic patients from our ICU were enrolled. Exclusion criteria were withdrawal of consent, urosepsis and history of chronic kidney disease. A group of volunteers similar in age, sex and medical history served as the control group. Control patients with inflammation, chronic kidney failure and lack of consent were excluded.

Definitions and clinical characteristics

We applied the definitions and guidelines declared by the 2001 International Sepsis Definitions Conference as it was recommended during our study period [25].

In the present work, SIRS was established when the patient showed two or more of the following findings: fever (>38 °C) or hypothermia (<36 °C), tachycardia (>90/min), tachypnea (>20/min) or $PaCO_2$ < 32 mmHg, leukocytosis (>12,000/μL) or leukopenia (<4000/μL). Only patients with negative blood culture were enrolled into the "SIRS group".

Diagnostic criteria for severe sepsis included SIRS plus microbiologically proven or presumed infection, elevated serum PCT levels (>2 ng/mL in bacterial sepsis), and at least one organ dysfunction induced by sepsis.

Acute kidney injury (AKI) was defined and classified using the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guideline [26] supported by serum cystatin C (CysC) levels, similarly to other authors before [27, 28]. Patients with increased serum CysC levels (≥ 0.3 mg/L increase within 48 h or ≥ 1.5 fold from baseline within 7 days) or with reduced urine output (<0.5 mL/kg/h for 6 h) were considered to have AKI.

For the assessment of disease severity and mortality the Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II), the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores were calculated. Based on 28-day mortality data, patients were categorized as survivors and non-survivors.

Sampling and laboratory analyses

For our study, blood and urine samples were collected simultaneously at the same time of the day. The first sample from each ICU patient was obtained within 24 h after clinical diagnosis then on the 2nd, 3rd and 5th consecutive days in sepsis, whereas in patients with SIRS the sampling was carried out only on the 1st and 2nd days because of the shorter ICU treatment. Blood samples were drawn into plastic blood collection tubes with accelerator gel. Urine was taken directly from the bladder catheter into plain plastic tubes. Only one sample (venous blood and midstream spot urine) was obtained from control individuals. After centrifugation of urine and congealed blood samples (10 min, 1500 *g*), serum and urine aliquots were stored at –70 °C until analyses.

Laboratory determinations – as part of the daily routine – including inflammatory parameters [white blood cell count (WBC), hsCRP, PCT] and kidney function markers (se-creatinine, CysC) were performed in our accredited university central laboratory (MSZ EN ISO 15189:2013) using routine analyzers. For our study, se-ORM was measured on Cobas Integra 400 plus (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) by using the manufacturer's protocol. Urinary total protein (u-TP), creatinine (u-CREAT) and albumin (u-ALB) were determined on Cobas 8000 analyzer (Roche) by routine procedures.

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

Measurement of u-ORM

Automated u-ORM test is not commercially available yet, therefore for routine measurements we developed and adapted a fully automated particle enhanced turbidimetric assay based on the work of Christiansen et al. [29]. The determination of u-ORM was performed on a cobas 8000/c502 analyzer (Roche) by using ORM immunoparticles (ref. no. OA504, Dako A/S, Glostrup, Denmark) and reaction buffer (ref. no. PO1812, Dako). The wavelength used for the turbidimetric reaction was 546 nm. The assay time was 10 min, the detection limit was found to be 0.02 mg/L with a working range of 0.16–5.25 mg/L. For determination of higher u-ORM levels sample predilution was made by saline.

Our method showed good linearity in the range of 0.10–4.68 mg/L ($R^2 = 0.999$). The inter-assay imprecision at four different ORM levels (3.86, 2.11, 0.64 and 0.30 mg/L) prepared from PreciControl ClinChem Multi 2 (ref. no. 05117216 190, Roche) was found to be 3.5, 1.77, 4.29 and 4.55 CV%, respectively. Also, the accuracy at these concentrations varied between 98.3% and 102.5%.

U-ORM concentrations were referred to u-CREAT levels and were expressed as u-ORM/u-CREAT in mg/mmol, as recommended and used by others to avoid the influence of urine volume and to reduce between-subject variability [19, 29]. In addition, u-ORM and u-ALB concentrations were also referred to urinary TP and expressed as urinary protein proportion (%).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed by IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22 (IBM Corporation, NY, USA). The required number of patients in each group was calculated by power analysis based on previous findings [30, 31]. After normality testing (Shapiro-Wilk test) our variables were found to be non-normally distributed, therefore non-parametric tests were used. For comparison of our groups Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U tests were carried out, while differences during the follow-up period were investigated by Wilcoxon sum rank test and by Friedman's two-way ANOVA. Spearman's tests were performed for correlation analyses. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used for analyzing the diagnostic and predictive values. Multivariate logistic regression analyses were applied to evaluate the clinical impact of variables, odds ratios (OR) and corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

Results

Patients' characteristics

In the present study, 13 SIRS, 43 severe septic patients and 30 control individuals were enrolled. The basic demographic data of our groups were similar (Table 1). More patients were admitted after surgical interventions than due to non-surgical causes. Our SIRS patients required only 2 days of ICU treatment, after that they were transferred to other departments, and none of them developed sepsis. Longer ICU stays ($p < 0.001$) and worse predictor scores ($p < 0.05$) were observed in severe sepsis than

Table 1: Demographic and admission data (clinical and laboratory).

	Control (n = 30)	SIRS (n = 13)	Sepsis (n = 43)	p-Value
Age, years	58 (49–69)	62 (54–70)	67 (57–76)	ns
Males, n (%)	16 (53)	9 (69)	26 (60)	ns
Major comorbidities, n (%)				
Diabetes mellitus	5 (17)	3 (23)	11 (26)	ns
Cardiovascular diseases	18 (60)	10 (77)	28 (65)	ns
Pulmonary diseases	1 (3)	6 (46)	16 (37)	0.002
Malignancies	0 (0)	6 (46)	15 (35)	0.001
Admission laboratory data				
se-CREAT, µmol/L	72.5 (66–81)	70 (59–81)	127 (94–182)	$< 0.001^{b,c}$
se-CysC, mg/L	0.9 (0.9–1.0)	0.9 (0.7–1.1)	1.8 (1.5–2.3)	$< 0.001^{b,c}$
WBC, G/L	6.7 (5.5–8.2)	11 (9.1–14.8)	14 (7.5–16.7)	$< 0.001^{a,b}$
hsCRP, mg/L	1 (0.5–2.2)	92.4 (56.4–227.9)	228.5 (138.6–336.4)	$< 0.001^{a,b,c}$
PCT, ng/mL	–	0.4 (0.3–0.7)	15.4 (4.4–33.5)	< 0.001
se-ORM, g/L	0.8 (0.7–0.9)	1.2 (1.1–1.3)	1.7 (1.3–2.1)	$< 0.001^{a,b,c}$
u-TP, mg/L	60 (50–90)	160 (89–410)	427 (150–850)	$< 0.001^{a,b,c}$
u-ORM, mg/L	1.6 (0.7–2.8)	14.9 (7.2–27.2)	89.4 (28.2–145.9)	$< 0.001^{a,b,c}$
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0.2 (0.1–0.3)	2.1 (0.7–6.4)	19.2 (11.4–32.8)	$< 0.001^{a,b,c}$
u-ORM/u-TP, %	2.2 (1.6–4.0)	10.2 (3.6–11.9)	18.5 (10.2–34.0)	$< 0.001^{a,b,c}$
u-ALB/u-TP, %	8.4 (5.0–16.7)	12 (5.5–16.0)	18.0 (5.2–31.7)	ns

Continuous variables are expressed as median (25th–75th percentiles) and categorical variables are expressed as a number (percentage). Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests or χ^2-tests were performed to compare the data between the groups. p-Values are presented; ns, non-significant. Superscript lowercase letters show post-hoc analysis: [a]p<0.001 between controls and SIRS. [b]p<0.001 between controls and sepsis. [c]p<0.05 between SIRS and sepsis. (PCT was not measured in control patients.)

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

in SIRS. During the 5-day follow-up, 28% of the severe septic patients died and a further 19% before the 28th day. Only one of the SIRS patients died within 28 days. All the enrolled SIRS patients had negative blood cultures and in nine cases of sepsis the microbes remained unidentified. The most frequently identified Gram-negative pathogen was *Escherichia coli*, while Gram-positive bacteria were mostly from *Staphylococcus* species. Fungal infections were seen to be caused mostly by *Candida* species. Further clinical and microbiological data are presented in Table 2.

Admission laboratory data to distinguish SIRS from sepsis

Besides the conventional inflammatory markers (WBC, hsCRP, PCT), serum and urinary ORM levels also showed an early elevation among critically ill patients and were found to be significantly higher ($p < 0.001$) compared to controls (Table 1).

The admission levels of u-ORM/u-CREAT were significantly increased both in SIRS and in sepsis compared to controls moreover, much higher levels were found in sepsis than in SIRS (Figure 1A).

ROC analyses were performed to assess the diagnostic ability of laboratory parameters. In differentiating SIRS from sepsis the area under ROC curve (AUC ROC) was found to be 0.954 for u-ORM/u-CREAT, while it was 0.804 for se-ORM, 0.845 for hsCRP and 0.949 for PCT (Figure 1B). A cut-off value for u-ORM/u-CREAT with 94.7% sensitivity and 90% specificity could be set at 6.75 mg/mmol to distinguish SIRS from sepsis. (For diagnostic investigations, dialyzed patients were excluded, to avoid the potential bias, see later.)

Logistic regression analysis showed that increased u-ORM/u-CREAT, PCT, and hsCRP levels were significant ($p < 0.05$) indicators of sepsis, with OR 1.56 (95% CI: 1.14–2.14), 2.37 (95% CI: 1.23–4.57) and 1.02 (95% CI: 1.01–1.02), respectively.

Table 2: Clinical and microbiological characteristics of ICU patients.

	SIRS (n = 13)	Sepsis (n = 43)	p-Value
Type of admission, n (%)			
Medical	3 (23)	17 (40)	na
Surgical	10 (77)	26 (60)	na
Length of ICU stay, days	2 (2–2)	6 (3–11)	< 0.001
5-day mortality, death (%)	0 (0)	12 (28)	0.046
28-day mortality, death (%)	1 (8)	20 (47)	0.014
Prognostic scores			
APACHE II score	8 (6–14)	19 (13–24)	< 0.001
SAPSII score	25 (18–31)	50 (34–57)	< 0.001
SOFA score	4 (2–5)	8 (7–11)	< 0.001
Organ dysfunction, n (%)			
1 organ dysfunction		7 (16)	
2 organ dysfunctions		15 (35)	
3 organ dysfunctions		8 (19)	
≥ 4 organ dysfunctions		13 (30)	
Septic shock		28 (65)	
Acute kidney injury		22 (51)	
Pathogens, n (%)			
Non identified	13 (100)	9 (21)	
Mixed		23 (53)	
Gram-negative bacteria		5 (12)	
Gram-positive bacteria		3 (7)	
Fungi		3 (7)	

Continuous variables are expressed as median (25th–75th percentiles) and categorical variables are expressed as number (percentage). Mann-Whitney U or χ^2-tests were performed to compare the data between the groups, p-values are presented; na, not applicable.

Time course of urinary orosomucoid excretion

We did not observe any significant changes in u-ORM/u-CREAT values during the 2-day monitoring of SIRS and the 5-day follow-up of sepsis. Moreover, in our study period the u-ORM/u-CREAT levels of survivor septic patients (n = 23) did not differ significantly from those of non-survivors (n = 20) (Figure 2A).

Mortality prediction and disease severity

The prognostic performance of admission u-ORM/u-CREAT levels in sepsis was evaluated by ROC analysis (Figure 2B). For 28-day mortality prediction the AUC ROC was found to be 0.414 for u-ORM/u-CREAT and 0.376 for se-ORM, while for SAPS II, APACHE II and SOFA scores were 0.731, 0.676 and 0.698, respectively. By logistic regression analysis only SAPS II score (OR: 1.06, 95% CI: 1.01–1.11, $p < 0.05$) and APACHE II score (OR: 1.14, 95% CI: 1.01–1.28, $p < 0.05$) were found to be risk factors for poor prognosis of patients with sepsis.

During subgroup analysis, the u-ORM/u-CREAT values were similarly high in septic patients with different blood culture results (bacterial, fungal, mixed, non-identified) and no difference was observed among patients with different infectious origin or cause of admission (surgical/non-surgical). Similarly, the u-ORM/u-CREAT levels of patients with septic shock or with dysfunction of more than three organs did not differ significantly from patients without these conditions, and also no relation with the use of vasopressors or diuretics could be found.

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

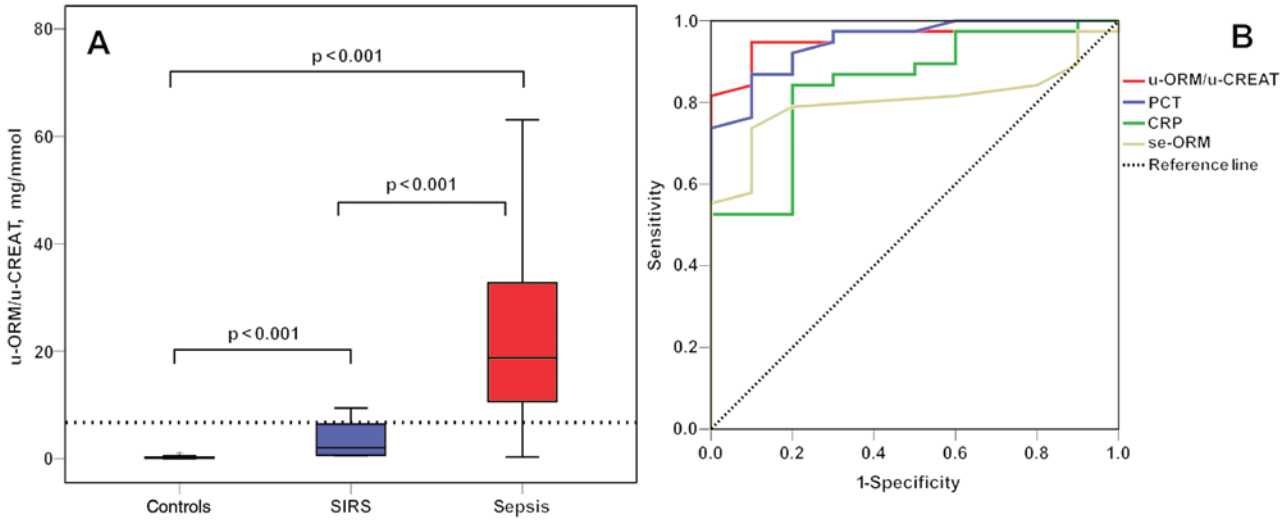


Figure 1: Admission levels of u-ORM.
(A) Comparison of u-ORM/u-CREAT values between controls, SIRS and sepsis. Dotted line shows the cut off value at 6.75 mg/mmol, obtained from ROC analyses. Extreme values are not illustrated, only on Figure 2. (B) ROC analyses to distinguish SIRS from sepsis.

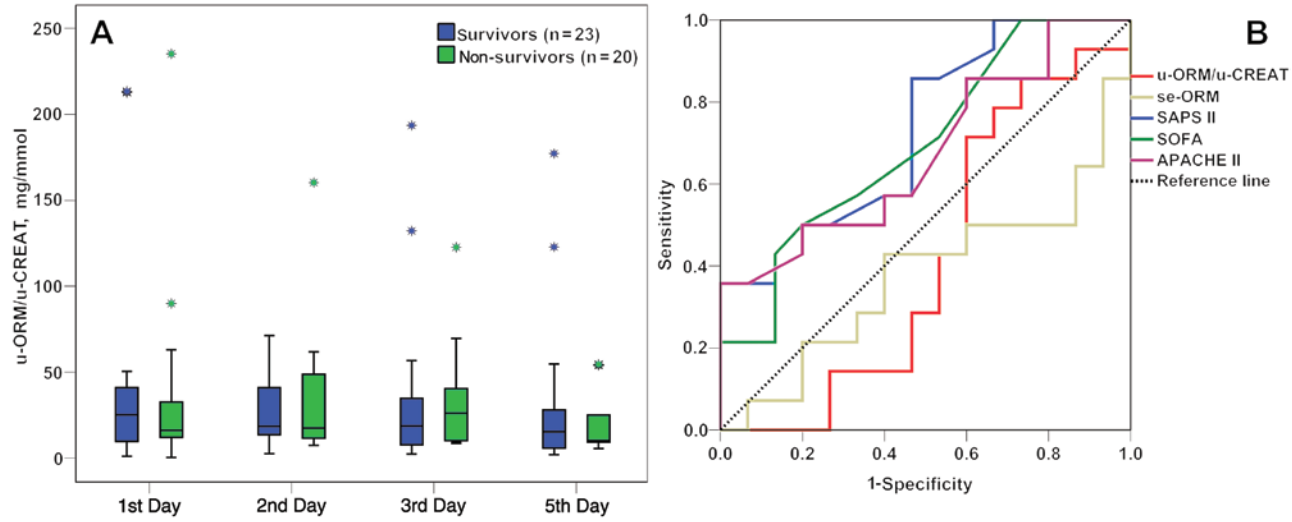


Figure 2: U-ORM/u-CREAT levels in survivors and in non-survivors.
(A) 5-day monitoring of u-ORM/u-CREAT in sepsis. Stars represent the extreme values. No significant differences were found during the follow-up period. (B) ROC analyses for prognostic performance regarding 28-day mortality prediction in sepsis.

Sepsis-related AKI and u-ORM/u-CREAT levels

From the 22 AKI patients nine required acute renal replacement therapy (RRT). Extremely elevated ($p < 0.001$) u-ORM/u-CREAT levels (with a median of 52.2 mg/mmol) were found in the urine samples obtained from patients with RRT requirement compared to non-RRT patients, independently whether they developed AKI (14.1 mg/mmol) or not (16.3 mg/mmol) (Figure 3A). All the observed extreme u-ORM/u-CREAT values, illustrated in our figures originated from dialyzed patients. The AUC ROC of u-ORM/u-CREAT was 0.831 for prediction of RRT requirement (Figure 3B).

Correlations

We found significant ($p < 0.001$) correlation between u-ORM/u-CREAT and se-ORM ($\rho = 0.693$) and hsCRP ($\rho = 0.600$). Additional moderate correlations were discovered with inflammatory parameters, such as WBC ($\rho = 0.407$) and PCT ($\rho = 0.348$). Furthermore,

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

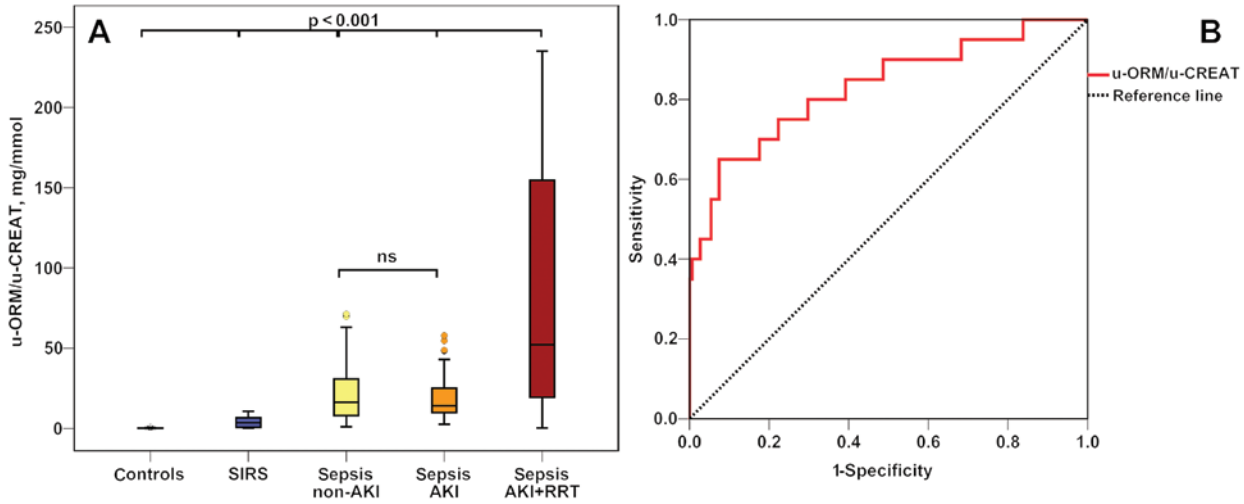


Figure 3: U-ORM/u-CREAT levels in sepsis-related acute kidney injury (AKI).
(A) Differences of u-ORM/u-CREAT levels between AKI and non-AKI groups. RRT, renal replacement therapy; ns, non-significant.
(B) ROC analyses of u-ORM/u-CREAT for indicating RRT.

u-ORM/u-CREAT directly ($p < 0.001$) correlated with kidney function markers: CysC ($\rho = 0.488$) and se-CREAT ($\rho = 0.318$). A weak correlation was found between u-ORM/u-CREAT and APACHE II scores ($\rho = 0.339$, $p = 0.024$) but no associations were observed with other organ dysfunction parameters or severity data. U-ORM correlated strongly ($\rho = 0.844$, $p < 0.001$) with u-TP concentrations.

Albuminuria and orosomucoiduria during inflammation

The u-ORM/total protein proportion (u-ORM/u-TP, %) also showed an elevation among critically ill patients: in controls the u-ORM accounted for only 1.6%–4.0% of urinary proteins, in SIRS it reached 3.6%–11.9%, while in sepsis u-ORM/u-TP ranged from 10.2 to 34.0%. In contrast, the u-ALB/u-TP proportion did not change significantly during systemic inflammation (Figure 4).

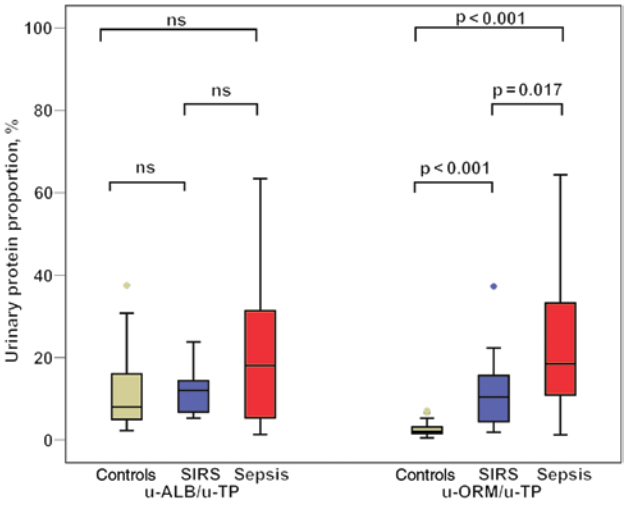


Figure 4: Albuminuria and orosomucoiduria in systemic inflammation, illustrated by urinary protein proportions (%).
ns, non-significant.

Discussion

Distinguishing SIRS from sepsis is often challenging and might be delayed, because symptoms are similar and microbiological identification requires at least 24 h, although the early diagnosis and adequate therapy of sepsis is essential for a favorable outcome [4]. Therefore, laboratory parameters may be extremely useful in rapid clinical decision making and also in monitoring of sepsis [32]. A lot of potential biomarkers have been studied however, sepsis guidelines only recommend the determination of serum PCT and hsCRP levels [4, 25]. Both have several limitations, hsCRP rises late and in a nonspecific manner, PCT concentrations do not indicate adequately fungal infections. Moreover the increase of PCT is lower in non-surgical cases of sepsis compared to cases of surgical origin [33, 34].

The acute phase protein ORM contributes to maintain homeostasis against excessive inflammatory damage, and due to its immunomodulatory and anti-inflammatory properties ORM forms an integrated part of the extended cytokine network [16, 35]. ORM elevates

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

in serum only mildly during the acute phase reaction. Many studies investigated se-ORM but only scarce data are available on u-ORM. A few former studies reported a slight elevation of u-ORM levels in chronic diseases indicating u-ORM as a general inflammatory marker [19, 20, 23, 36]. In our preliminary studies, we found elevated u-ORM levels in sepsis by Western blotting [30, 37] however, the mechanism of urinary excretion of ORM remains unclear.

To our best knowledge our study is the first which examines the potential role of u-ORM in sepsis.

In our present work, we observed significantly increased u-ORM excretion in severe systemic inflammation compared to controls. We described an early and relevant u-ORM/u-CREAT elevation in severe sepsis with a cut off value at 6.75 mg/mmol to distinguish SIRS from sepsis. Analyzing se-ORM too, we also found elevated admission levels but the diagnostic as well as the prognostic capacity of it was much lower than those of u-ORM. Former studies also found significantly higher se-ORM levels in sepsis compared to SIRS or controls [18, 38]. Recently Xiao et al. have reported – on a larger study population – a better diagnostic (AUC ROC: 0.869) and prognostic (AUC ROC: 0.793) performance for se-ORM in sepsis than we found [18]. Nevertheless, based on our results, the diagnostic capability of se-ORM is much less than that of u-ORM/u-CREAT, which is a more sensitive and early marker of sepsis with good diagnostic ability (AUC ROC: 0.954), superior to hsCRP and similar to PCT.

So far only Magid et al. published increased u-ORM excretion in sepsis, monitoring only seven septic patients for 24 h [31]. In spite of the fact that they examined fewer septic patients than we did, their results were similar to ours with a median value of u-ORM/u-CREAT at 25 mg/mmol in sepsis. However, we monitored our patients for a longer time period, and we found an early rise of u-ORM/u-CREAT levels in sepsis which did not change during our 5-day follow-up study. This phenomenon can be explained by the ongoing severe inflammatory condition and also by the relatively long, 5 days half-life of ORM [9].

We found a weak correlation with APACHE II scores, but observed no differences in u-ORM/u-CREAT levels between survivors and non-survivors during the monitoring period. Furthermore, the prognostic performance of u-ORM/u-CREAT was not satisfactory. Because of the heterogeneity and complexity of sepsis syndrome, to predict outcome and monitoring the condition a multimarker approach is required [6, 32], as a single biomarker is not able to compete with the multiparametric scoring systems. U-ORM/u-CREAT as early inflammatory marker seems to be promising for the detection of sepsis, and prompt diagnosis is of utmost importance for improving the outcome, as well [1–6].

In our present work, we observed increased u-ORM excretion in sepsis independently from the source of infection (e.g. different pathogens) or from the cause of admission (surgical or non-surgical), which might be a good advantage in sepsis diagnostics. Moreover, non-infectious/SIRS cases did not reach the u-ORM levels characteristic for sepsis.

In spite of the fact that u-ORM excretion seems not to be influenced by the severity of sepsis or organ dysfunctions, kidney function may have an important impact on the urinary concentration of u-ORM as shown by the increase of u-ORM/u-CREAT in patients with RRT and is confirmed by the correlation between kidney function parameters and u-ORM. The observed extreme values in RRT suggest that u-ORM/u-CREAT might indicate renal insufficiency and the necessity of dialysis.

The good correlation found between inflammatory markers and u-ORM/u-CREAT supports the hypothesis that the elevation of urinary ORM excretion is mainly due to systemic inflammation. The correlation between serum and urinary ORM suggests that circulating ORM appears in the urine. The circulating ORM is only 1%–2% of total serum proteins, and in sepsis it elevates only slightly. In contrast to se-ORM, u-ORM excretion increases extremely and it becomes one of the major urinary protein components in sepsis. Normally, ORM in urine appears 5- to 10-fold lower than ALB, while in sepsis u-ORM exceeds the u-ALB levels. The relative increase of u-ORM is much higher than that of u-ALB during the inflammatory process. Consequently, u-ORM seems to be a better indicator of inflammation, which was also suggested by Magid et al. [31].

The path mechanism of u-ORM excretion is not well understood and the increased se-ORM level itself may not explain that alone. Alteration in kidney function, probably both glomerular and tubular dysfunctions may be involved. Furthermore, a possible local renal production due to systemic manifestation of inflammation is also suspected. Extrahepatic, local ORM synthesis in kidneys might contribute to maintain organ function and reduce tissue damage caused by inflammation [16, 35]. Therefore it is likely that the increased urinary appearance of ORM is not only the result of a simply overflow mechanism rather than due to production in kidneys.

Our study has several limitations. Firstly, our observations were carried out in a relatively small population from a single institution. In the future, we should increase the number of critically ill patients to draw more definite conclusions. Enrollment of further patient groups (AKI,

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

dialyzed patients) and extension of our investigation to other departments (e.g. Emergency Department) are also recommended, to see the earliest moment when patients show developing sepsis. Further research is necessary to clarify the path mechanism of u-ORM excretion during inflammation. Additional large multi-center studies are recommended to validate our findings. As our study was performed in 2014–2015, our patients were categorized according to the former guidelines [25]. We are aware that from February 2016, new definitions for sepsis and septic shock are available [39]. These (e.g. quickSOFA) promote earlier recognition and management of patients with sepsis or at risk of developing sepsis. It would be advantageous and helpful to investigate u-ORM according to the new definitions.

Conclusions

In conclusion, u-ORM showed a considerably early elevation in sepsis with promising diagnostic performance in discriminating SIRS cases from true sepsis. However, u-ORM/u-CREAT levels were found to be independent from outcome and disease severity, the extremely elevated u-ORM/u-CREAT levels are supposed to be potential indicators of dialysis requirement. Consequently, non-invasively obtained urine could be a possible alternative to blood sampling in diagnosis of sepsis, especially by a rapid point of care u-ORM test in emergency and in intensive care departments. U-ORM/u-CREAT might be suitable as a complementary marker of sepsis and could help clinicians in proper decision making. Larger multi-center studies should be conducted to validate our findings and to determine the usefulness of u-ORM measurements in clinical practice.

Acknowledgments: The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. Hereby we express our special thanks for the invaluable help of our nurses and colleagues. We are grateful for Dako A/S Company for providing us the ORM reagents and for Roche Magyarország Kft for the opportunity and technical support of using a developmental channel in our measurements.
Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.
Research funding: The work was supported by GINOP-2.3.2-15-2016-00021 and NKFI-EPR K/115394/2015 grants.
Employment or leadership: None declared.
Honorarium: None declared.
Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

1. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2013;369:840–51.
2. 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. Crit Care Med 2001;29:1303–10.
3. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. Lancet Infect Dis 2012;12:919–24.
4. 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 Med 2013;39:165–228.
5. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2001;345:1368–77.
6. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care 2010;14:R15.
7. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. Clin Chem 1989;35:755–65.
8. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. Clin J Am Soc Nephrol 2015;10:147–55.
9. Schmid K. α1-acid glycoprotein. In: Putnam FW, editor. The Plasma Proteins. New York: Academic Press, 1975:183–228.
10. Hochepied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:25–34.
11. Haraldsson BS, Johnsson EK, Rippe B. Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. Kidney Int 1992;41:310–6.
12. Hjalmarsson C, Lidell ME, Haraldsson B. Beneficial effects of orosomucoid on the glomerular barrier in puromycin aminonucleoside-induced nephrosis. Nephrol Dial Transplant 2006;21:1223–30.
13. Hochepied T, Van Molle W, Berger FG, Baumann H, Libert C. Involvement of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal Gram-negative infection. J Biol Chem 2000;275:14903–9.
14. Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. Inflammation 1997;21:69–82.
15. Muchitsch EM, Auer W, Pichler L. Effects of alpha 1-acid glycoprotein in different rodent models of shock. Fundam Clin Pharmacol 1998;12:173–81.
16. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim Biophys Acta 2000;1482:157–71.

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

17. Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. Curr Protein Pept Sci 2007;8:91–108.
18. Xiao K, Su L, Yan P, Han B, Li J, Wang H, et al. Alpha-1-acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. J Crit Care 2015;30:744–51.
19. Hou LN, Li F, Zeng QC, Su L, Chen PA, Xu ZH, et al. Excretion of urinary orosomucoid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. PLoS One 2014;9:e107550.
20. Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Liu H, Hou X, et al. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy. Nephrology (Carlton) 2009;14:332–7.
21. Christiansen MS, Hommel E, Friberg L, Molvig J, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Increased urinary orosomucoid excretion is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. J Diabetes Complications 2010;24:28–36.
22. Christiansen MS, Hommel E, Magid E, Feldt-Rasmussen B. Orosomucoid in urine is a powerful predictor of cardiovascular mortality in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes at five years of follow-up. Diabetologia 2005;48:386–93.
23. Christiansen MS, Iversen K, Larsen CT, Goetze JP, Hommel E, Molvig J, et al. Increased urinary orosomucoid excretion: a proposed marker for inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. Scand J Clin Lab Invest 2009;69:272–81.
24. Christiansen MS, Hesse D, Ekbom P, Hesse U, Damm P, Hommel E, et al. Increased urinary orosomucoid excretion predicts preeclampsia in pregnant women with pregestational type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2010;89:16–21.
25. 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 Med 2003;29:530–8.
26. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. Kidney Int Suppl 2012;2:1–138.
27. Zappitelli M, Greenberg JH, Coca SG, Krawczeski CD, Li S, Thiessen-Philbrook HR, et al. Association of definition of acute kidney injury by cystatin C rise with biomarkers and clinical outcomes in children undergoing cardiac surgery. J Am Med Assoc Pediatr 2015;169:583–91.
28. Zhou J, Liu Y, Tang Y, Liu F, Zhang L, Zeng X, et al. A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. Int Urol Nephrol 2016;48:125–32.
29. Christiansen MS, Blirup-Jensen S, Foged L, Larsen M, Magid E. A particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of orosomucoid in urine: development, validation and reference values. Clin Chem Lab Med 2004;42:1168–77.
30. Kustán P, Szirmay B, Mühl D, Ludány A. Human orosomucoid in the clinical laboratory. In: Kőszegi T, editor. Techniques with Applicability in Medical Practice. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2015:101–20.
31. Magid E, Guldager H, Hesse D, Christiansen MS. Monitoring urinary orosomucoid in acute inflammation: observations on urinary excretion of orosomucoid, albumin, alpha1-microglobulin, and IgG. Clin Chem 2005;51:2052–8.
32. Di Somma S, Magrini L, Travaglino F, Lalle I, Fiotti N, Cervellin G, et al. Opinion paper on innovative approach of biomarkers for infectious diseases and sepsis management in the emergency department. Clin Chem Lab Med 2013;51:1167–75.
33. Becze Z, Molnar Z, Fazakas J. Can procalcitonin levels indicate the need for adjunctive therapies in sepsis? Int J Antimicrob Agents 2015;46(Suppl 1):S13–8.
34. Laszlo I, Trasy D, Molnar Z, Fazakas J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. J Immunol Res 2015;2015:510436.
35. Logdberg L, Wester L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. Biochim Biophys Acta 2000;1482:284–97.
36. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, Greis KD, Haines K, Klein-Gitelman MS, et al. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. Pediatr Res 2009;65:530–6.
37. Kőszegi T, Kustán P, Ludány A, Györgyi E, Woth G, Mühl D, et al. Urinary orosomucoid in sepsis. Clin Chem Lab Med 2012;50:eA33.
38. Barroso-Sousa R, Lobo RR, Mendonca PR, Memoria RR, Spiller F, Cunha FQ, et al. Decreased levels of alpha-1-acid glycoprotein are related to the mortality of septic patients in the emergency department. Clinics 2013;68:1134–9.
39. 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). J Am Med Assoc 2016;315:801–10.

Brought to you by | Hungarian Society of Laboratory Medicine (MLDT)
Authenticated
Download Date | 10/18/17 3:27 PM

ARTICLE IN PRESS

Clinical Biochemistry xxx (xxxx) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem

Monitoring urinary orosomucoid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker

Péter Kustán[a,b,c,*], Balázs Szirmay[a], Tamás Kőszegi[a,b], Andrea Ludány[a], Gábor L. Kovács[a,b], Attila Miseta[a], Diána Mühl[c], Balázs Németh[d,e], István Kiss[d], Ádám Németh[f], Sándor Szabados[f], Zénó Ajtay[e,f]

[a] Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary
[b] János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Ifjúság u. 20, Hungary
[c] Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary
[d] Department of Public Health Medicine, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Szigeti u. 12, Hungary
[e] Zsigmondy Vilmos Harkány SPA Hospital, 7815 Harkány, Zsigmondy sétány 1, Hungary
[f] Heart Institute, University of Pécs, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:
α1-Acid glycoprotein
Biomarker
Cardiopulmonary bypass
Inflammation
Urine

ABSTRACT

Background: Urinary biomarkers might provide non-invasive tool for monitoring of systemic processes. We aimed to investigate the time-course of urinary orosomucoid (u-ORM) excretion after cardiac surgery hypothesizing that u-ORM is an early and sensitive marker of systemic inflammatory activation.

Methods: During a 5-day follow-up study we monitored u-ORM levels in cardiovascular patients who underwent on-pump cardiac surgery (n = 38). The patients baseline data were compared to healthy control individuals (n = 40). u-ORM was measured by a newly developed automated turbidimetric assay and values were referred to urinary creatinine and expressed as u-ORM/u-CREAT (mg/mmol).

Results: The cardiovascular patients showed slightly increased baseline u-ORM excretion compared to healthy controls (0.29 vs 0.08 mg/mmol, $p < 0.001$). After cardiac surgery, a rapid 10-fold elevation in u-ORM/u-CREAT levels was found. The values remained high till the 3rd postoperative day, and they then decreased significantly ($p < 0.01$) on the 5th day after surgery. u-ORM/u-CREAT mirrored well the perioperative tendency of hs-CRP levels, but it did not follow the non-decreasing kinetics of serum ORM concentrations during the follow-up. u-ORM/u-CREAT correlated significantly ($p < 0.001$) with inflammatory parameters (hs-CRP, se-ORM, WBC).

Conclusions: We described u-ORM as an early and sensitive marker of inflammatory activation. The rapid elevation of u-ORM/u-CREAT after surgery and its postoperative kinetics could reflect the magnitude of inflammatory response better than serum ORM and similar to hs-CRP. u-ORM measurements might provide a novel non-invasive tool for real-time monitoring of systemic inflammation, however further investigations are required to confirm it.

1. Introduction

Cardiovascular diseases are the leading causes of morbidity and mortality worldwide. To our latest knowledge they are associated with low grade inflammation. From the laboratory side - beyond traditional risk factors-, sensitive inflammatory parameters, like high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) are also useful for cardiovascular risk assessment [1]. Recently urinary proteomics also revealed the importance of several urinary markers in cardiovascular diseases [2]. Biomarkers in urine are emerging as a non-invasive tool for real-time monitoring of systemic processes, however urinary protein markers of inflammation have not been fully explored yet.

Major surgical procedures such as cardiac surgery with cardiopulmonary bypass trigger systemic inflammatory response through activation of inflammatory cells, complement cascade, secretion of cytokines and acute phase proteins, including CRP and orosomucoid [3].

Abbreviations: hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; u-TP, urinary total protein; u-CREAT, urinary creatinine; u-ORM, urinary orosomucoid; u-ALB, urinary albumin; WBC, white blood cell count; CABG, coronary artery bypass grafting; AVR, atrial valve replacement; AKI, acute kidney injury; EF, ejection fraction

* Corresponding author at: Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Ifjúság u. 13, Hungary.
E-mail address: peter.kustan89@gmail.com (P. Kustán).

http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.07.010
Received 4 May 2017; Received in revised form 3 July 2017; Accepted 19 July 2017
0009-9120/ © 2017 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Orosomucoid (ORM) or α-1-acid glycoprotein is a major acute phase protein accounting for about 0.5–1.2 g/L of serum proteins [4]. It is an approximately 40 kDa glycoprotein, mainly synthetized by the liver, however extrahepatic gene expression of ORM (leukocytes, endothelial cells, kidney, etc.) is also known [5].

ORM was described as an integrated part of the body's non-specific defense system against excessive inflammation. Among other immunocalins, as part of the extended cytokine network, ORM plays a role in limiting the potential harmful effects of inflammatory response by reduction of tissue damage and protection against oxidative stress [6].

As a non-specific inflammatory marker, serum orosomucoid (se-ORM) concentration is elevated during infection, malignancies, autoimmune diseases and inflammatory bowel diseases [7].

Factors other than solely the molecular weight as a major determinant in the urinary appearance of ORM have not been explored yet. Normally, ORM accounts for about 1–5% of total proteins in urine, and it is detectable only in a few mg/L concentration, much lower than in serum [8]. Consequently, gentle elevation in urinary orosomucoid (u-ORM) levels might appear as a more significant and markedly change compared to serum, therefore u-ORM could be a more sensitive marker than se-ORM.

Recent studies demonstrated that elevated u-ORM levels provide clinically relevant information, and u-ORM might be a promising marker both in diagnosis and in monitoring of disorders associated with chronic inflammatory activation, as autoimmune diseases, cancer, diabetes mellitus and Crohn's disease [9–11]. These findings suggested that slightly elevated u-ORM levels are in association with chronic low grade inflammation. Therefore we might suppose that u-ORM serves as a sensitive general inflammatory marker. Despite of these promising data, routine u-ORM assay is not available, therefore we previously developed a sensitive and fully automated method for u-ORM measurements, suitable for daily clinical use [8].

The present study aimed to monitor u-ORM levels after on-pump cardiac surgery and to compare its changes to well-known inflammatory parameters, hypothesizing that u-ORM serves as a sensitive non-invasive biomarker of inflammation and might be associated with the magnitude of inflammatory activation. A further goal was to compare the baseline, preoperative u-ORM levels to that of healthy individuals, whether ongoing cardiovascular disorders could affect the u-ORM excretion.

2. Methods

2.1. Study design and sampling

This prospective observational study was performed at an ISO 9001 accredited Cardiac Surgical Ward between November 2015 and July 2016. Consecutive patients undergoing elective cardiac surgery with cardiopulmonary bypass were monitored for 5 days after surgery. Apparently healthy volunteers were recruited as a control group. Inclusion criteria were > 18 years of age and lack of underlying renal disease at admission (based on medical history, serum cystatin-C levels and GFR > 60 mL/min/1.73 m^2). Patients suffering from autoimmune diseases, tumors, ongoing acute inflammation, infection, acute coronary syndrome or recent surgical interventions were excluded. In controls, exclusion criteria were any kind of acute or chronic disorders to avoid their potential influence on u-ORM levels. Healthy state was assessed based on medical history and findings.

The study protocol was approved by the Regional Ethics Committee of the University of Pécs (no. 4327.316-2900/KK15/2011). The study was performed according to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki 2008. The patients and controls were fully informed and written consent was obtained from all.

Venous blood and midstream spot urine samples were obtained on the day before surgery and on the 1st, 3rd and 5th postoperative days. Only one sample was taken from healthy controls. After centrifugation (1500 RCF, 10 min) of clotted blood and urine samples, serum and urine aliquots were stored without preservatives at −70 °C until analyses, which happened within 3 months after sampling.

2.2. Laboratory tests

Laboratory tests were performed at the university laboratory (accreditation no.: NAH-1-1553/2016) by routine procedures. Inflammatory parameters (hs-CRP, white blood cell count (WBC), se-ORM) and kidney function markers (serum creatinine, serum cystatin-C) were measured by manufacturer's protocol. Urinary parameters, as total protein (u-TP), creatinine (u-CREAT) and albumin (u-ALB) were determined on cobas 8000 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) by routine procedures. u-ORM was measured by a novel turbidimetric assay using Orosomucoid Immunoparticles (Dako A/S, Glostrup, Denmark) on cobas 8000/c502 automated analyzer as recently described [8]. Since urine was obtained by spontaneous micturition, u-ORM and u-ALB levels were referred to u-CREAT (u-ORM/u-CREAT and u-ALB/u-CREAT, in mg/mmol) to reduce the influence of urine volume on their concentrations as it is recommended and used by others [12,13]. u-ORM concentrations (mg/L) and the proportional data as u-ORM/u-TP (%) were also expressed to reveal the relative changes of ORM among urinary proteins.

2.3. Statistical analyses

Statistical analyses were performed by SPSS for Windows 22 statistical software (IBM Corporation, New York, USA). Since the parameters were found to be non-normally distributed by Shapiro-Wilk analyses, non-parametric statistical tests were used. To assess the differences between groups Mann-Whitney *U* tests were performed. Changes during the follow-up were tested by Friedman's analyses. Spearman's tests were performed for correlation analyses. A p value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Data are presented as median and interquartiles (IQR).

3. Results

3.1. Patients characteristics

In the present study, 38 cardiovascular patients and 40 healthy controls were enrolled. Patients' demographic and baseline laboratory data are shown in Table 1.

From the total 38 patients 20 underwent coronary artery bypass grafting (CABG) and 18 required atrial valve replacement (AVR)

Table 1
Patients characteristics and baseline laboratory data.

	Controls	Patients	p value
Number, n	40	38	–
Age, years	45 (32–53)	67 (60–73)	< 0.001
Females, n (%)	23 (58)	15 (39)	–
HT, n (%)	0	38 (100)	–
DM, n (%)	0	12 (32)	–
COPD, n (%)	0	7 (18)	–
WBC, G/L	6.4 (4.9–7.5)	7.0 (6.4–8.4)	0.035
hs-CRP, mg/L	0.9 (0.5–1.8)	2.2 (1.2–3.9)	< 0.001
se-ORM, g/L	0.79 (0.69–0.91)	0.68 (0.61–0.85)	ns
se-Creatinine, μmol/L	75 (63–81)	76 (67–84)	ns
se-Cystatin-C, mg/L	0.82 (0.76–0.89)	0.84 (0.76–0.99)	ns
u-ALB/u-CREAT, mg/mmol	0.49 (0.26–1.65)	0.58 (0.41–1.89)	ns
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0.08 (0.06–0.15)	0.29 (0.16–0.42)	< 0.001
u-ORM, mg/L	0.79 (0.36–1.16)	1.92 (0.64–4.56)	0.002
u-ORM/u-TP, %	1.47 (0.6–2.1)	2.96 (1.90–5.07)	< 0.001

Mann-Whitney *U* test was used to compare variables. Data are presented as median (IQR) or number (%). HT: hypertension, DM: type 2 diabetes mellitus, ns: non-significant.

Table 2
Data of patients who underwent cardiac surgery.

	CABG	AVR	p value
Number, n	20	18	–
Age, years	65 (54–72)	68 (62–74)	ns
Females, n (%)	7 (35)	8 (44)	–
Euroscore	5 (3–7)	6 (4–8)	ns
Surgery time, min	163 (150–201)	155 (133–190)	ns
Aortic cross clamp time, min	52 (45–81)	63 (45–92)	ns
Cardioplegia, mL	750 (500–800)	800 (500–1000)	ns
Total blood loss, mL	220 (170–395)	210 (160–300)	ns
ICU time, days	1 (1–2)	1 (1–2)	ns
Hospitalization, days	8 (7–11)	8 (7–10)	ns
Fever, n (%)	8 (40)	6 (33)	–
Preoperative EF, %	57 (52–60)	56 (53–58)	ns
Postoperative EF, %	54 (50–56)	54 (53–56)	ns
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0.27 (0.17–0.36)	0.33 (0.13–0.49)	ns

Mann-Whitney *U* test was used to compare variables. Data are presented as median (IQR) or number (%). ICU: intensive care unit, EF: ejection fraction, ns: non-significant.

surgery. The basic demographic and operative data were comparable between CABG and AVR patients. Most patients required only 1 day intensive care after surgery and they were discharged after 1 week from the department. Within a 60-day period after surgery no death was observed (Table 2).

3.1.1. Baseline, preoperative data

On the day before cardiac surgery, the patients had no acute inflammation, however their baseline u-ORM/u-CREAT and hs-CRP levels were moderately elevated compared to healthy controls ($p < 0.001$). Oppositely, se-ORM concentrations did not differ between the groups. All controls and patients were non-albuminuric and normal kidney function was confirmed by serum cystatin-C and creatinine data (Table 1). The baseline u-ORM/u-CREAT values were similarly elevated in patients independently from ongoing diabetes or other chronic disorders and no differences were noted respective to age or gender.

3.2. Monitoring of inflammatory activation after cardiac surgery

The perioperative changes of u-ORM and u-ORM/u-CREAT showed a similar pattern to that of hs-CRP levels, both were increased markedly till the 3rd postoperative day than they decreased significantly (Fig. 1A, B). 10-Fold increased u-ORM/u-CREAT values were found after cardiac surgery which remained also high on the 3rd postoperative day. On the 5th day u-ORM/u-CREAT levels decreased and were lower than on the 3rd postoperative day ($p < 0.01$), however they remained higher than the baseline values (Table 3 and Fig. 1A). The u-ORM concentrations (mg/L) and the proportional changes, as u-ORM/u-TP (%) ratios also showed similar trends (Table 3). Meanwhile, se-ORM concentration showed an increasing tendency up to the 5th postoperative day with a 2-fold elevation, and no decrease was observed in its values (Fig. 1C). u-ALB/u-CREAT levels did not change significantly during the follow-up.

3.3. Clinical events during the follow-up

During the 5-day follow-up period no differences were found between the CABG and AVR groups in the tendency of u-ORM/u-CREAT levels.

None of the 38 patients developed acute kidney injury (AKI). No oliguria and only mild increase of serum cystatin-C concentrations ($< 1.5\times$ increase) were found during the 5-day period.

We observed fever in 14 patients during the follow-up, however their blood cultures remained negative and none of the patients developed sepsis. The u-ORM/u-CREAT values of febrile patients showed the same tendency as those of without, and no extra elevation was found.

3.4. Correlations

Correlation analyses showed that u-ORM/u-CREAT was positively correlated with inflammatory parameters ($p < 0.001$), as hs-CRP (0.724), se-ORM (0.633) and WBC (0.461). Furthermore, a mild correlation was found with u-ALB/u-CREAT levels (0.424, $p < 0.001$), but no association was discovered with serum cystatin-C or creatinine concentrations.

4. Discussion

The present study demonstrated the time-course of u-ORM levels following cardiac surgery. Our results provide evidence that u-ORM/u-CREAT values are associated with systemic inflammatory activation triggered by operative injury, which is indicated by similar changes of hs-CRP.

The differences in baseline u-ORM/u-CREAT levels between patients and healthy controls can be explained by the effect of chronic disorders on u-ORM excretion. The observed subclinical elevation was most likely caused by low-grade inflammation associated with the ongoing atherosclerosis, cardiovascular diseases and ageing [14,15]. Elevated baseline hs-CRP levels also support this hypothesis, since hs-CRP is a known cardiovascular risk factor [1]. Moreover, previous studies also described u-ORM as a marker of endothelial dysfunction and a predictor of cardiovascular mortality [11,16,17]. Elevated u-ORM levels were found in patients suffering from chronic heart failure as well [18]. Only one study aimed to investigate u-ORM among patients with essential hypertension [19], however due to some methodological causes they were unable to measure u-ORM in controls and in 87% of patients.

In spite of the results of a former study showing elevated se-ORM among patients with high blood pressure [20], our findings did not reveal increased baseline se-ORM levels among the patients. Interestingly, u-ORM/u-CREAT levels were elevated compared to controls. These demonstrate that moderately elevated u-ORM might be a more sensitive marker of low grade inflammation than se-ORM, however further studies should decide the usefulness of u-ORM in cardiovascular risk assessment.

To the best of our knowledge, this is the first study monitoring the changes of u-ORM after on-pump cardiac surgery in adults and comparing them to serum acute phase protein levels. The results demonstrated that u-ORM excretion might indicate the magnitude of systemic inflammation, since the time-course u-ORM/u-CREAT and hs-CRP were similar, however hs-CRP levels showed greater alternations. The time-course of CRP after major surgery is well described, it increases 24–48 h after the insult and decreases after 72 h [21,22]. The kinetics of se-ORM after surgical interventions are also known, se-ORM increases about 2-fold in 24–48 h after stimuli and remains high over 5 days [21,23,24]. The relative long, about 5-day half-life of se-ORM can explain its time-course [4], however other factors should influence the u-ORM levels, since it did not follow the kinetics of se-ORM.

The significant relative increase of urinary orosomucoid excretion (u-ORM/u-TP, %) reflects real-time changes in urine, and suggests that ORM might become a valuable fraction of urinary proteins during inflammation. Moreover, our findings showed that increase of u-ORM levels was more rapid, sensitive and explicit than that of se-ORM.

The currently available data regarding the kinetics of u-ORM after surgery is limited. In a follow-up study, Magid et al. monitored u-ORM excretion in 6 patients with surgery induced inflammation [25]. They found that the increase and decrease of u-ORM mirrored those of CRP levels after elective abdominal surgery, similarly to our observations after on-pump cardiac surgery.

Devarajan et al. reported that u-ORM levels could elevate within 2 h after cardiac surgery in children [26]. They found, that u-ORM concentrations above 40 mg/L could be strong indicators for acute kidney injury. Nevertheless, in the present study we did not observe neither as

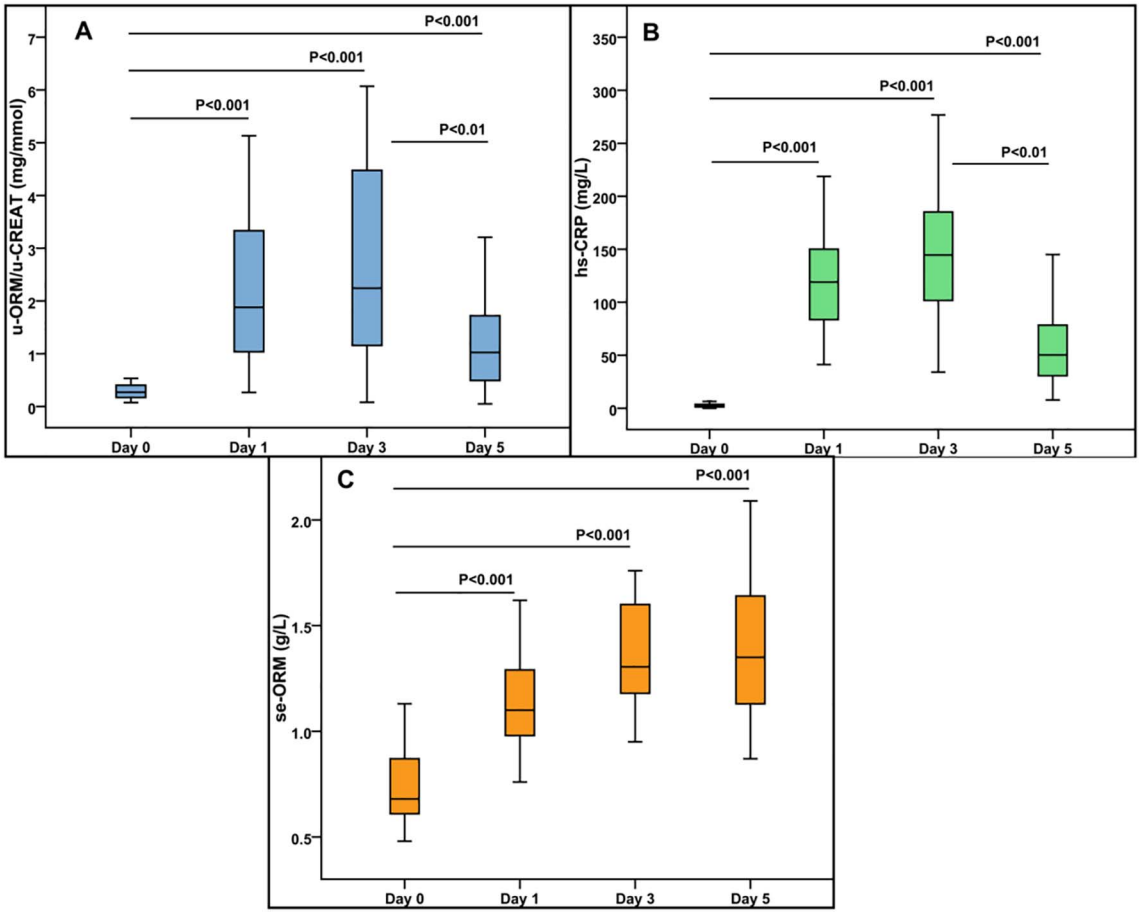


Fig. 1. Monitoring of u-ORM/u-CREAT (A), hs-CRP (B) and se-ORM (C) levels after cardiac surgery.
Friedman's test with post hoc analyses was used to compare variables. Day 0 indicates the day before cardiac surgery. Boxplots represent median values with interquartile ranges.

high u-ORM concentrations nor AKI. Indeed the patients did not have albuminuria before surgery, which is considered to indicate a relatively low risk for postoperative kidney injury [27,28].

Sepsis is another major complication after surgery, however nor infection neither sepsis was observed during the follow-up. Febrile patients showed similar u-ORM/u-CREAT levels to non-febrile ones, probably because of fever following cardiac surgery is mainly caused by acute phase response, not by infection [29]. Moreover u-ORM/u-CREAT levels did not exceed 6.75 mg/mmol which was previously described as a helpful cut-off value for sepsis diagnosis [30].

The complex mechanism and factors responsible for increased u-ORM excretion are not well-clarified. Although serum and urinary levels of ORM were slightly correlated, it is probable that urinary appearance of ORM is not only a simply overflow mechanism. Kidney function should influence u-ORM excretion, glomerular and tubular factors cannot be ruled out, however no correlation was found between kidney function markers and u-ORM/u-CREAT. Furthermore, a local renal ORM synthesis is also suspected [5], which might be a protective response to stressful stimuli, enhancing the anti-inflammatory effects of ORM. The strong correlation between hs-CRP and u-ORM suggested that systemic inflammation seems to be mainly responsible for increased u-ORM excretion.

Table 3
Monitoring of inflammatory and urinary parameters after cardiac surgery.

	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	p value
WBC, G/L	7.0 (6.4–8.4)	14.0 (11.6–16.0)	10.0 (8.3–12.4)	9.0 (6.9–9.9)	< 0.001
hs-CRP, mg/L	2.2 (1.2–3.9)	117.8 (82.2–146.3)	143.8 (93.7–173.0)	50.3 (30.8–79.6)	< 0.001
se-ORM, g/L	0.68 (0.61–0.85)	1.08 (0.96–1.28)	1.3 (1.14–1.60)	1.35 (1.12–1.64)	< 0.001
u-ALB/u-CREAT (mg/mmol)	0.58 (0.41–1.89)	1.61 (0.78–2.92)	1.23 (0.44–2.99)	0.69 (0.44–1.35)	ns
u-ORM/u-CREAT, mg/mmol	0.29 (0.16–0.42)	1.95 (1.08–4.71)	2.32 (1.08–5.39)	1.40 (0.61–2.21)	< 0.001
u-ORM, mg/L	1.92 (0.64–4.56)	13.4 (5.75–29.22)	9.62 (3.39–24.13)	4.41 (2.91–11.93)	< 0.001
u-ORM/u-TP, %	2.96 (1.90–5.07)	8.92 (6.32–17.77)	12.4 (5.93–22.73)	9.97 (4.64–14.79)	< 0.001

Day 0 indicates the day before surgery. Friedman's test was used to compare variables. Data are presented as median (IQR). ns: non-significant.

The first and highest limitation of this study is the relatively small number of patients. In the study we used frozen samples for u-ORM determinations, which could influence protein concentrations, although u-ORM seems to be a stable analyte [31–34]. It would be worthwhile if comparing our results with off-pump cardiac surgery to reveal the impact of extracorporeal circulation on u-ORM levels. Due to the absence of adverse outcomes or complications we could not describe the predictive performance of u-ORM regarding AKI or mortality. In order to exclude the potential influence of latent comorbidities on u-ORM levels, control persons were healthy and younger than patients. Further research and measurements of tubular markers are needed to identify the causative factors of elevated u-ORM excretion.

Based on these promising findings a larger study should be conducted to investigate the clinical usefulness of u-ORM as a sensitive inflammatory marker.

5. Conclusions

This study helps to better understand the potential role of u-ORM in inflammation. Our main conclusion is that u-ORM/u-CREAT is an early inflammatory marker which might be ideal for real-time monitoring of inflammatory response due to its rapid changes. Rapid elevation of u-ORM levels after cardiac surgery and its perioperative kinetics could reflect the magnitude of operative injury and inflammatory activation similarly to hs-CRP. u-ORM seems to be a more sensitive marker than se-ORM, showing considerably higher signal than serum values after acute stimuli. Consequently, non-invasively obtained urine samples could be possible alternative to blood sampling. Due to its low cost and high sensitivity, u-ORM shows itself capable of routine clinical usage, however further investigations are required to decide its utility in management of inflammatory diseases.

Acknowledgements

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. Hereby we express our special thanks to Roche Magyarország Kft. and to Dako A/S Glostrup Denmark Company for providing the reagents and for their technical support. This study was supported by GINOP-2.3.2-15-2016-00021, NKFI-EPR K/115394/2015 and KA-2016-04 grants.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] P. Libby, P.M. Ridker, Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment, Am. J. Med. 116 (Suppl. 6A) (2004) 9S–16S.
[2] L.U. Zimmerli, E. Schiffer, P. Zurbig, D.M. Good, M. Kellmann, L. Mouls, A.R. Pitt, J.J. Coon, R.E. Schmieder, K.H. Peter, H. Mischak, W. Kolch, C. Delles, A.F. Dominiczak, Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease, Mol. Cell. Proteomics 7 (2) (2008) 290–298.
[3] J.R. Day, K.M. Taylor, The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass, Int. J. Surg. 3 (2) (2005) 129–140.
[4] Z. Luo, H. Lei, Y. Sun, X. Liu, D.F. Su, Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities, J. Physiol. Biochem. 71 (2) (2015) 329–340.
[5] T. Fournier, N.N. Medjoubi, D. Porquet, Alpha-1-acid glycoprotein, Biochim. Biophys. Acta 1482 (1–2) (2000) 157–171.
[6] L. Logdberg, L. Wester, Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses, Biochim. Biophys. Acta 1482 (1–2) (2000) 284–297.
[7] F. Ceciliani, V. Pocacqua, The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases, Curr. Protein Pept. Sci. 8 (1) (2007) 91–108.
[8] P. Kustan, B. Szirmay, Z. Horvath-Szalai, A. Ludany, A. Lakatos, D. Muhl, P.H. Christensen, A. Miseta, G.L. Kovacs, T. Koszegi, Urinary orosomucoid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use, Biochem. Med. 26 (3) (2016) 421–430.
[9] F. Li, Z. Yu, P. Chen, G. Lin, T. Li, L. Hou, Y. Du, W. Tan, The increased excretion of urinary orosomucoid 1 as a useful biomarker for bladder cancer, Am. J. Cancer Res. 6 (2) (2016) 331–340.
[10] Y.J. Park, S.A. Yoo, D. Hwang, C.S. Cho, W.U. Kim, Identification of novel urinary biomarkers for assessing disease activity and prognosis of rheumatoid arthritis, Exp. Mol. Med. 48 (2016) e211.
[11] M.S. Christiansen, K. Iversen, C.T. Larsen, J.P. Goetze, E. Hommel, J. Molvig, B.K. Pedersen, E. Magid, B. Feldt-Rasmussen, Increased urinary orosomucoid excretion: a proposed marker for inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 69 (2) (2009) 272–281.
[12] L. Hjorth, I. Helin, A. Grubb, Age-related reference limits for urine levels of albumin, orosomucoid, immunoglobulin G and protein HC in children, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 60 (1) (2000) 65–73.
[13] J. Tencer, H. Thysell, A. Grubb, Analysis of proteinuria: reference limits for urine excretion of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 56 (8) (1996) 691–700.
[14] F.G. Hage, C-reactive protein and hypertension, J. Hum. Hypertens. 28 (7) (2014) 410–415.
[15] R. Ross, Atherosclerosis—an inflammatory disease, N. Engl. J. Med. 340 (2) (1999) 115–126.
[16] M. Svendstrup, M.S. Christiansen, E. Magid, E. Hommel, B. Feldt-Rasmussen, Increased orosomucoid in urine is an independent predictor of cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes at 10 years of follow-up, J. Diabetes Complicat. 27 (6) (2013) 570–575.
[17] N.M. El-Beblawy, N.G. Andrawes, E.A. Ismail, B.E. Enany, H.S. Abou El-Seoud, M.A. Erfan, Serum and urinary orosomucoid in young patients with type 1 diabetes: a link between inflammation, microvascular complications, and subclinical atherosclerosis, Clin. Appl. Thromb. Hemost. (2016).
[18] L.N. Hou, F. Li, Q.C. Zeng, L. Su, P.A. Chen, Z.H. Xu, D.J. Zhu, C.H. Liu, D.L. Xu, Excretion of urinary orosomucoid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure, PLoS One 9 (9) (2014) e107550.
[19] B. Lisowska-Myjak, A. Krych, A. Kolodziejczyk, J. Pachecka, Z. Gaciong, Urinary proteins, *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity and estimated glomerular filtration rate in hypertensive patients with normoalbuminuria and microalbuminuria, Nephrology 16 (4) (2011) 403–409.
[20] G. Engstrom, Blood pressure increase and incidence of hypertension in relation to inflammation-sensitive plasma proteins, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22 (12) (2002) 2054–2058.
[21] A. Grubb, J. Bjork, U. Nyman, J. Pollak, J. Bengzon, G. Ostner, V. Lindstrom, Cystatin C, a marker for successful aging and glomerular filtration rate, is not influenced by inflammation, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 71 (2) (2011) 145–149.
[22] D.G. Watt, P.G. Horgan, D.C. McMillan, Routine clinical markers of the magnitude of the systemic inflammatory response after elective operation: a systematic review, Surgery 157 (2) (2015) 362–380.
[23] P.D. Booker, C. Taylor, G. Saba, Perioperative changes in alpha 1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery, Br. J. Anaesth. 76 (3) (1996) 365–368.
[24] K.F. Aronsen, G. Ekelund, C.O. Kindmark, C.B. Laurell, Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma, Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Supplementum 124) (1972) 127–136.
[25] E. Magid, H. Guldager, D. Hesse, M.S. Christiansen, Monitoring urinary orosomucoid in acute inflammation: observations on urinary excretion of orosomucoid, albumin, alpha1-microglobulin, and IgG, Clin. Chem. 51 (11) (2005) 2052–2058.
[26] P. Devarajan, C.D. Krawczeski, M.T. Nguyen, T. Kathman, Z. Wang, C.R. Parikh, Proteomic identification of early biomarkers of acute kidney injury after cardiac surgery in children, Am. J. Kidney Dis. 56 (4) (2010) 632–642.
[27] S.G. Coca, D. Jammalamadaka, K. Sint, H. Thiessen Philbrook, M.G. Shlipak, M. Zappitelli, P. Devarajan, S. Hashim, A.X. Garg, C.R. Parikh, Translational research investigating biomarker endpoints in acute kidney injury, preoperative proteinuria predicts acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 143 (2) (2012) 495–502.
[28] J.L. Koyner, A.X. Garg, S.G. Coca, K. Sint, H. Thiessen-Philbrook, U.D. Patel, M.G. Shlipak, C.R. Parikh, T.-A. Consortium, Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery, J. Am. Soc. Nephrol. 23 (5) (2012) 905–914.
[29] C. Rhee, P.E. Sax, Evaluation of fever and infections in cardiac surgery patients, Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth. 19 (2) (2015) 143–153.
[30] P. Kustan, B. Szirmay, Z. Horvath-Szalai, A. Ludany, G.L. Kovacs, A. Miseta, T. Koszegi, D. Muhl, Urinary orosomucoid: a novel, early biomarker of sepsis with promising diagnostic performance, Clin. Chem. Lab. Med. 55 (2) (2017) 299–307.
[31] M.S. Christiansen, S. Blirup-Jensen, L. Foged, M. Larsen, E. Magid, A particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of orosomucoid in urine: development, validation and reference values, Clin. Chem. Lab. Med. 42 (10) (2004) 1168–1177.
[32] J. Tencer, H. Thysell, K. Andersson, A. Grubb, Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-chain immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin in urine stored at various conditions, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54 (3) (1994) 199–206.
[33] J. Tencer, H. Thysell, K. Andersson, A. Grubb, Long-term stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-chain-immunoreactivity, orosomucoid and alpha 1-antitrypsin in urine stored at − 20 degrees C, Scand. J. Urol. Nephrol. 31 (1) (1997) 67–71.
[34] E. Vittinghus, Preanalytical handling of stored urine samples, and measurement of beta 2-microglobulin, orosomucoid, albumin, transferrin and immunoglobulin G in urine by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 50 (8) (1990) 843–849.