

# Vizelet orosomuroid, mint gyulladássos biomarker szepszisben

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**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

<b>I.</b>	<b>BEVEZETÉS.....</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>5</b>
	<b>III.1. Módszer validálás automatizált vizelet orosomuroid mérésekhez .....</b>	<b>5</b>
	<b>III.2. Vizsgált csoportok, mintagyűjtés.....</b>	<b>6</b>
	<b>III.3. Statisztikai elemzések .....</b>	<b>8</b>
<b>IV.</b>	<b>EREDMÉNYEK .....</b>	<b>9</b>
	<b>IV.1. Vizelet orosomuroid mérési módszer validálása .....</b>	<b>9</b>
	<b>IV.2. Referencia tartomány meghatározása .....</b>	<b>10</b>
	<b>IV.3. Illesztett kontroll csoport vizsgálata.....</b>	<b>10</b>
	<b>IV.4. Intenzív osztályon kezelt betegcsoportok vizsgálata.....</b>	<b>10</b>
	<b>IV.5. Szívűtött betegek vizsgálata .....</b>	<b>13</b>
<b>V.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>15</b>
<b>VI.</b>	<b>ÚJ EREDMÉNYEK-TÉZISEK.....</b>	<b>19</b>
<b>VII.</b>	<b>A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI.....</b>	<b>20</b>
<b>VIII.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>24</b>

## I. BEVEZETÉS

A világszerte vezető morbiditású és mortalitású kórképek (kardiovaszkuláris, daganatos és fertőzőes megbetegedések) összefüggésbe hozhatók a szervezet gyulladásoos aktivitásával. A szisztémás gyulladás gyakran vezet súlyos szövödményekhez. 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. Közel 30%-os halálozási mutatókkal és magas kezelési költségekkel, a szepszis az egyik legjelentősebb megterhelés az intenzív osztályok számára ma is.

A szepszis heterogén, komplex klinikai szindróma, változó etiológiai háttérrel, súlyossággal és prognózzissal. A kimenetel szempontjából döntő a szeptikus állapot korai felismerése, és elkülönítése a szisztémás gyulladásoos válaszreakció (SIRS) egyéb formáitól, melyhez nagy segítséget nyújtanak a mikrobiológiai és laboratóriumi vizsgálatok. A diagnózis felállításának elősegítésén kívül, bizonyos biomarkerek alkalmasak lehetnek a prognózis és a szervi diszfunkciók kifejlődésének előrejelzésére, az antibiotikus terápia megtervezésére, továbbá a kezelésre adott válasz értékelésére. Az elmúlt néhány évtizedben számos, közel 200 különböző szepszis marker vizsgálatáról számoltak be. A lehetséges biomarkerek nagy része a szepszis során kialakuló gyulladásoos válasz mediátorai közé tartozik. A legújabb diagnosztikus irányelvek már magukba foglalják a szérum prokalcitonin (PCT) és nagy-érzékenységű C-reaktív protein (hsCRP) mérését szepszis gyanújakor, azonban ezek sem minden igényt kielégítő molekulák, így a szepszis markerek kutatása napjainkban is intenzíven folyik. Különösen előnyös olyan paraméterek elemzése, melyek a betegeknek nem jelentenek megterhelést (non-invazívan nyerhetők), és a gyulladásoos állapot valóos idejű monitorozására alkalmasak. Újabb proteomikai kutatások szerint a vizeletfehérjék klinikailag hasznos információval szolgálhatnak, mind szisztémás, mind lokális folyamatokban.

Az orosomuroid (ORM), vagy más néven  $\alpha$ -1 savanyú glikoprotein egy jelentős, pozitív akut fázis fehérjeként számon tartott glikoprotein. Habár már 1950-ben azonosították, és azóta számos funkcióját leírták, a pontos biológiai szerepe még ma is tisztázatlan. Az ORM egy 41-43 kDa molekulatömegű fehérje, tömegének közel felét szénhidrát láncok alkotják, így kialakítva a különleges molekulaszervezetét, melynek egyedi tulajdonságait és funkcióit köszönheti. Az immunocalin fehérje család tagjaként az ORM egyrészt jelentős transzport funkciókkal, ligand kötő tulajdonságokkal rendelkezik, és így képes befolyásolni bizonyos gyógyszerek farmakokinetikáját, másrészt részt vesz a gyulladásoos folyamatok szabályozásában, ismert anti-inflammatorikus és immunmoduláló szerepe is.

*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. Állatkísérletek során kimutatták az ORM protektív tulajdonságait különböző gyulladásos állapotokban, sokkban, szepszisben. Igazolták, hogy az ORM fontos szerepet tölt be a kapillaris permeabilitás szabályozásában, növeli az endothel sejtek negatív töltését és közreműködik a glycocalix fenntartásában, ezáltal részt vesz a vitális szervek perfúziójának megtartásában.

Számos betegségben, akut és krónikus gyulladásos állapotokban, autoimmun és tumoros megbetegedésekben leírták a szérum ORM (se-ORM) nem specifikus, maximum 2-3-szoros emelkedését.

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. A vizelet ORM (u-ORM) szintek feltérképezésére idáig csak kevés kutatás irányult. II-es típusú cukorbetegségben, szívelégtelenségben, reumatoid arthritisben írtak le emelkedett u-ORM szinteket, melyet összefüggésbe hoztak a fennálló krónikus gyulladásos állapottal és az endothel diszfunkcióval. Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az u-ORM szintek monitorozása számos szisztémás gyulladásos aktivitással járó betegség esetén ígéretes lehet, és kiegészítő információval szolgálhat a napi klinikai gyakorlat számára is. A biztató adatok ellenére azonban a rutin klinikai gyakorlat számára nem érhető el megbízható, precíz, automata u-ORM mérési mód.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja volt a vizelet orosomuroid szintek monitorozása akut gyulladással járó folyamatokban. Vizsgálni kívántuk, hogy az u-ORM alkalmas-e a szisztémás gyulladás súlyosságának megítélésére.

Tanulmányunk céljai a következők voltak:

- Automatizált u-ORM mérési módszer adaptálása, analitikai validálása.
- Referencia tartomány megállapítása egészséges egyének vizsgálata alapján.
- Az u-ORM szintek vizsgálata akut gyulladással nem szenvedő, de különböző krónikus betegségekkel rendelkező egyéneknél. Ezzel vizsgálni kívántuk, hogy az alapbetegségek befolyásolják-e az u-ORM kiválasztást.
- Az u-ORM szintek monitorozása intenzív osztályon kezelt súlyos szepszis betegeknek. Azt feltételeztük, hogy az u-ORM egy korai markere a súlyos gyulladással, így szepszis betegeknek 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 vizsgálata műtét indukálta szisztémás gyulladással járó állapotban. Feltételezéseink szerint az u-ORM gyorsan és érzékenyen jelezheti a műtét utáni gyulladással járó aktivitás mértékét. Szív-műtött betegeknek 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 gyulladással járó válasz mértékével és klasszikus gyulladással járó paraméterekkel.

### III. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### III.1. Módszer validálás automatizált vizelet orosomuroid mérésekhez

Az u-ORM mérésekhez egy latex partikulumok által erősített turbidimetriás módszert dolgoztunk ki és adaptáltunk a cobas 8000/c502 automata nyitott, fejlesztői moduljára (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország).

Az u-ORM meghatározása nyúlban termeltetett, poliklonális anti-humán orosomuroid immunpartikulumokat tartalmazó reagenssel (ref. no. OA504, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánia) és a hozzá tartozó Reakció pufferrel (ref. no. PO1812, Dako) történt.

A módszer kalibrálásához (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, mely vak mintaként is szolgált.

A reakció detektálása 546 nm-es hullámhosszon zajlott. Kétlépcsős végpontos (two-point end) mérési módot alkalmaztunk, delta abszorbancia számítással (a 38-70 mérési pont között). A kalibrátor/kontrol/minta térfogata 7  $\mu$ l, az immunpartikulum reagens mennyisége 40  $\mu$ l, a reakció puffer 130  $\mu$ l volt. A módszerhez 6 pontos kalibrációt alkalmaztunk 0,0-5,25 mg/l között spline görbe-illesztéssel. A reakció 37 °C-on zajlott 10 percig.

A módszer validálása során az analitikai határokat 30 független vak mérés adataiból határoztuk meg, melyekből átlagot, szórást (SD) és variációs koefficiens (CV%) számoltunk. A kimutatási határt (limit of detection, LOD) az átlag + 3 SD, míg a mennyiségi meghatározási határt (limit of quantification, LOQ) az átlag + 10 SD értékekből számoltuk ki. A módszer funkcionális szenzitivitása egy vizelet minta hígításaiból (0,025-0,390 mg/l) került meghatározásra, azon koncentrációnál, ahol a CV% elérte a 20%-ot. A linearitást egy vizelet minta 10 lépcsős hígítási sorának (0,10-4,68 mg/l) 2 parallel méréséből ítéltük meg.

A precizitás és valódiság megítéléséhez (845 mg/l ORM tartalmú) PreciControl ClinChem Multi 2 (PC2, ref. no. 05117216 190, Roche) négy különböző hígítását használtuk. A sorozaton belüli pontatlanság megítéléséhez egy nap 10 párhuzamos mérés történt, míg a sorozatok közti pontatlansághoz 10 napig 2-2 parallel mérést végeztünk. A valódiságot a mért és a névleges értékek %-os arányában fejeztük ki.

Stabilitás vizsgálatokhoz 5 vizeletmintát (0,52-4,11 mg/l) konzerváló szer hozzáadása nélkül teszteltünk. A minták egy részét 2-8 °C-on tároltuk, majd a harmadik, ötödik, nyolcadik és

tizedik napon mértünk u-ORM koncentrációt. Továbbá 5 egymást követő fagyasztás-olvasztási ciklust teszteltünk.

## **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 rendelkezünk (4327.316-2900/KK15/2011). A vizsgálatokat az engedélyezett protokolloknak megfelelően, a 2008-as Helsink Deklarációban foglalt etikai ajánlások betartásával végeztük el.

### **III.2.1. Egészséges referencia csoport**

Az u-ORM mérési módszerhez tartozó referencia tartomány megállapításához egészséges egyéneket vizsgáltunk 10-60 év között (n=72, átlagéletkor: 30±16 év, 51% nő). Egészségesnek tekintettük azt a személyt, akinek nem volt ismert krónikus betegsége, nem szedett rendszeresen gyógyszert, valamint a mintavételkor nem volt panasza, sem akut betegsége utaló tünete. Ezek alapján kizárási kritérium volt bármilyen gyulladás (fehérvérsejtszám (WBC) <10 G/l, hsCRP <5 mg/l és klinikai tünetek alapján), krónikus betegség (orvosi kartonok alapján) és a beleegyezés hiánya. A csoport tagjaitól egyszeri vér- és vizelet mintavétel történt.

### **III.2.2. Illesztett kontroll csoport alapbetegségekkel**

A különböző krónikus betegségek u-ORM kiválasztásra gyakorolt hatását alapbetegségekkel rendelkező, az intenzív osztályon kezelt betegekhez korban, nemből és egészségügyi problémákban is illeszkedő egyének bevonásával vizsgáltuk (n=30, átlagéletkor: 60±12 év, 47% nő). A csoport tagjainál kizárási kritériumot jelentettek az akut gyulladással állapotok (WBC <10 G/l, hsCRP <5 mg/l és klinikai tünetek alapján), a krónikus vesebetegség (orvosi dokumentáció, és GFR <60 ml/perc/1,73m<sup>2</sup> alapján), valamint a beleegyezés hiánya. A csoport tagjaitól csak egyszeri vér- és vizelet mintavétel történt.

### **III.2.3. Intenzív osztályon kezelt betegcsoportok (SIRS, szepszis)**

Vizsgálataink során intenzív osztályon kezelt, szisztémás gyulladás tüneteit mutató SIRS-es (n=13, átlagéletkor: 63±9 év, 31% nő) és súlyos szeptikus betegektől (n=43, átlagéletkor: 65±14 év, 40% nő) vettünk mintákat. 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), és legalább egy szervdiszfunkció, mely szepszis következtében alakult ki. A diagnózis felállítása és a betegek beválasztása során több pontrendszert (SAPS II, APACHE II, SOFA) és az aktuális irányelveket is figyelembe vettük.

Kizárási kritériumot jelentett a krónikus vesebetegség, az uroszepszis és a beleegyezés hiánya. A betegeknél követéses vizsgálatot folytattunk, a felvételt/ klinikai diagnózist követő 24 órán belül történt az első mintavétel, majd súlyos szeptikus betegeknél a kezelés második, harmadik és ötödik napján, míg SIRS betegek esetén - a rövidebb intenzív osztályos kezelés miatt - csak az első és második napon vettünk mintákat.

A SIRS-es és súlyos szeptikus betegcsoportok adatait az illesztett kontroll csoporthoz viszonyítottuk, mivel ezen csoportok alap demográfiai adatai hasonlóak voltak.

#### **III.2.4. Szívműtéten átesett betegek**

A műtét indukálta szisztémás gyulladás hatását elektív, on-pump szívműtéten átesett betegek monitorozásával vizsgáltuk ( $n=38$ , átlagéletkor:  $66\pm 8$  év, 40% nő). A szívműtött betegeknél az akut és krónikus gyulladós folyamatok, autoimmun betegségek, tumorok, 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 az azt követő első, harmadik és ötödik napon vettünk mintákat.

A szívműtéten átesett betegek adatait a Referencia csoport egészséges felnőtt tagjaihoz ( $n=42$ , átlagéletkor:  $43\pm 11$  év, 57% nő) viszonyítottuk.

#### **III.2.5. Laboratóriumi mérések**

A vizsgálatainkba bevont egyéneknél egyidejűleg történt a vér- és vizelet mintavétel. Centrifugálás után (1500g, 10 perc) a szérum és vizelet mintákat  $-70$  °C-ra fagyasztva tároltuk. Rutin automata módszerekkel szérum mintáinkból gyulladós paramétereket (hsCRP, PCT, se-ORM) és vesefunkciós markereket (kreatinin, cisztatin-C) mértünk, míg a vizeletmintákból összfehérjét (u-TP), kreatinint (u-CREAT), albumint (u-ALB) és az általunk kidolgozott eljárással orosomuroidot (u-ORM) határoztunk meg. Mivel nem gyűjtött, random vizeletmintákat elemeztünk, így az u-ORM értékeket u-CREAT-ra vonatkoztattuk (u-ORM/u-CREAT, mg/mmol), hogy kiküszöböljük a vizelet mennyiség/töménység befolyásoló hatását.



Továbbá vizsgáltuk az u-ORM részarányát és relatív változásait a vizeletfehérjék közt, így u-TP-re vonatkoztatva is kifejeztük (u-ORM/u-TP, %).

### **III.3. Statisztikai elemzések**

Statisztikai analízisekhez az SPSS szoftver 22-es verzióját használtuk (IBM Corporation, New York, USA). Változóink nem-normál eloszlást mutattak (Shapiro-Wilk teszt), így elemzéseinkhez nem-paraméteres tesztek alkalmaztunk. A csoportok összehasonlításához Mann-Whitney U tesztet (2 csoport), illetve Kruskal Wallis tesztet (több csoport) 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. Logisztikus regressziós analízist végeztünk a változók klinikai hatásának megítélésére, melyet esélyhányadossal és a hozzátartozó 95% konfidencia intervallumokkal (95% CI) szemléltettünk. A korrelációs vizsgálatainkhoz Spearman tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzések során a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

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

## IV. EREDMÉNYEK

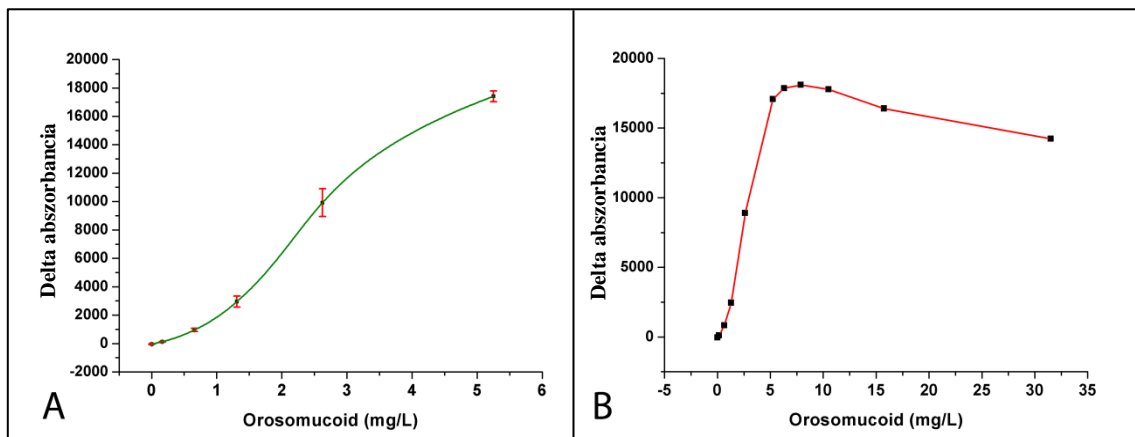
### IV.1. Vizelet orosomuroid mérési módszer validálása

Az u-ORM meghatározásokhoz a kalibrált tartományt 0,16-5,25 mg/l közt állítottuk be (1/A Ábra). Széles koncentráció tartomány (0,1-31,5 mg/l) vizsgálata során megfigyelt szűk biztonsági zóna és a görbe visszahajlása miatt (1/B Ábra), az 5,25 mg/l feletti u-ORM koncentrációjú mintákat hígítani kellett. Az alsó kalibrátor 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. A mérések megfelelő linearitást mutattak ( $R^2=0,999$ ) a 0,10-4,68 mg/l tartományon belül. 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.

A 10 napos 2-8 °C-os tárolás során 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 sem.

#### 1. 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  $\pm$ szórás értékeit szemlélteti.

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

## **IV.2. Referencia tartomány meghatározása**

A vizsgálatunkban résztvevő 72 egészséges egyénből 3 életkori csoportot alkottunk (10-20, 21-40, 41-60 év). Az u-ORM szintek tekintetében nem találtunk szignifikáns különbségeket a korcsoportok között, ezért közös referencia tartományt határoztunk meg 10-60 év között: u-ORM: 0,13-2,96 mg/l; u-ORM/u-CREAT: 0,01-0,24 mg/mmol; u-ORM/u-TP: 0,21-3,58 %. Az u-ORM/u-CREAT –ként kifejezett értékek esetén nem volt szignifikáns különbség a nők és a férfiak között egyik életkori csoportban sem.

## **IV.3. Illesztett kontroll csoport vizsgálata**

Az illesztett kontroll csoport tagjai a referencia egyéneknél idősebb, különböző alapbetegségektől szenvedő (hipertónia, diabetes, COPD, stb.), gyógyszereket szedő egyének voltak. Az egészséges egyénekhez viszonyítva a kontroll csoport tagjainál szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) magasabb u-ORM/u-CREAT értékeket figyeltünk meg (0,08 (0,05-0,15) vs 0,2 (0,1-0,3) mg/mmol). 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 kiválasztás tekintetében, valamint nem volt különbség a különböző alapbetegségekkal rendelkező egyének u-ORM/u-CREAT értékeiben sem.

## **IV.4. Intenzív osztályon kezelt betegcsoportok vizsgálata**

A vizsgálatunkba bevont betegek közül több páciens került felvételre műtéti beavatkozás után, mint belgyógyászati okokból. A SIRS-es betegek átlagosan 2 napos, míg a szeptikus betegek átlagosan közel 6 napos intenzív terápiát igényeltek. Az 5 napos követésünk alatt a súlyos szeptikus betegek 28%-a elhunyt, a 28-napos halálozás pedig 47%-os volt. Komplikációként 22 szeptikus betegnél alakult ki akut veseelégtelenség (AKI), és 9 beteg szorult akut dialízisre.

Minden bevont SIRS páciens negatív hemokultúrával rendelkezett. A szeptikus betegéknél 9 esetben maradt azonosítatlan a kórokozó. A leggyakrabban kevert fertőzésekkel találkoztunk (53%).

### **Felvételi laboradatok SIRS és szepszis elkülönítésében**

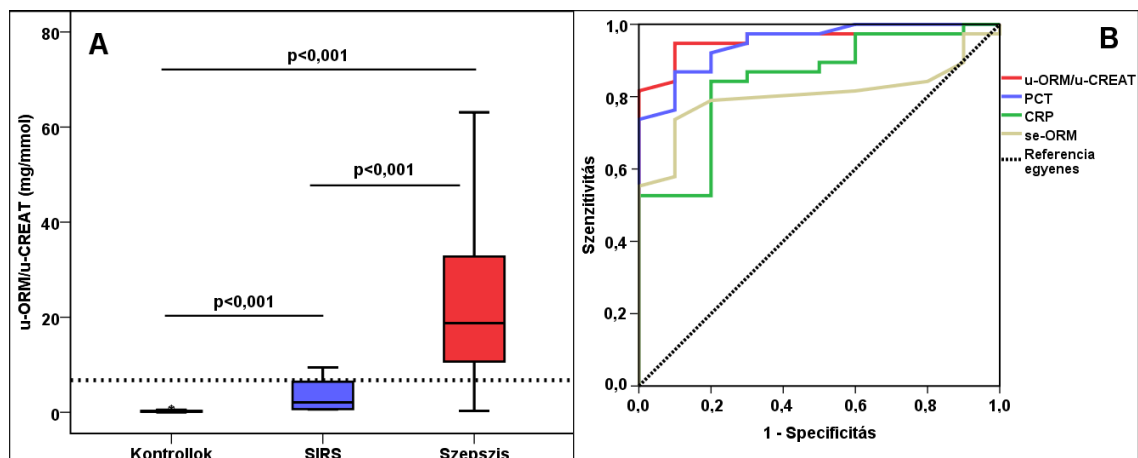
A szokványos gyulladási markerek mellett (WBC, hsCRP, PCT) a szérum és vizelet orosomuroid szintek is szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) magasabbak voltak SIRS-ben és szepszisben

is a kontrollokhoz viszonyítva. Közel tízszer magasabb u-ORM/u-CREAT értékeket találtunk szepszisben, mint SIRS- ben (19,20 (11,43-32,78) vs 2,06 (0,72-6,36),  $p < 0,001$ ).

A ROC analízisek alapján a SIRS szepszistól való elkülönítéséhez 94,7% érzékenységgel és 90% fajlagossággal cut-off értéket határoztunk meg a 6,75 mg/mmol u-ORM/u-CREAT értéknél (2/A Ábra). A görbe alatti terület 0,954 volt u-ORM/u-CREAT esetén, amely hasonló volt a PCT-hez (0,949), és nagyobb, mint a hsCRP (0,845) és a se-ORM (0,804) értékei (2/B Ábra).

Logisztikus regressziós elemzéseink kimutatták, hogy az emelkedett u-ORM/u-CREAT szintek, hasonlóan a PCT és a hsCRP értékekhez szignifikáns ( $p < 0,05$ ) indikátorai a szepszisnek: 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).

## 2. 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.

**B:** ROC analízisek a SIRS és szepszis elkülönítésére.

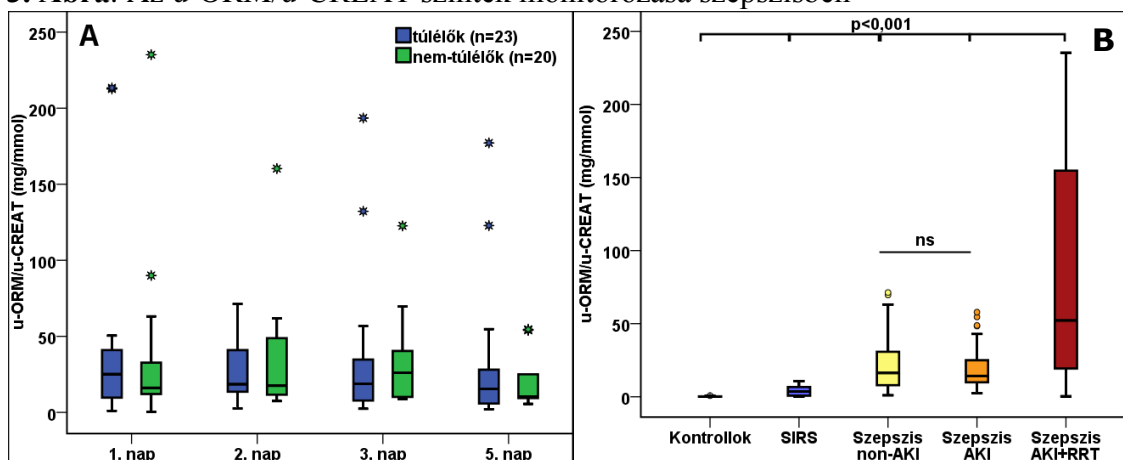
### Vizelet orosmucooid szintek monitorozása szepszisben

Sem a SIRS-es betegek 2 napos monitorozása alatt, sem a szeptikus betegek 5 napos követése során nem figyeltünk meg szignifikáns változást az u-ORM/u-CREAT szintek esetén. 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 (3/A Ábra).

Az u-ORM/u-CREAT szintek 28 napos mortalitást jelző képessége (AUC ROC: 0,414) elmaradt a prognosztikus pontrendszerekhez tartozó magasabb értékektől (SAPS II: 0,731, APACHE II: 0,676, SOFA: 0,698).

Az u-ORM/u-CREAT értékek szepszisben egyaránt magasak voltak függetlenül a patogén típusától vagy a fertőzés okától, eredetétől. A szeptikus sokkos betegek, és a háromnál több szervi elégtelen betegek u-ORM/u-CREAT értékei nem különböztek az ezekkel nem rendelkező betegektől. Nem találtunk kapcsolatot a vazopressor ill. diuretikum igényvel sem. Azonban extrém magas 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 (14,1 (9,9-25,0) mg/mmol). A nem dializált AKI és nem-AKI betegek u-ORM/u-CREAT értékei között azonban nem találtunk különbséget (3/B Ábra).

### 3. Ábra: Az u-ORM/u-CREAT szintek monitorozása szepszisben



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

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

### Albuminuria és orosomuroiduria gyulladás során

Vizsgáltuk a vizeletfehérjék összetételének változásait gyulladás során. Mind a SIRS-es, mind a szeptikus betegek közt szignifikánsan magasabb u-ORM részarányt (u-ORM/u-TP) figyeltünk meg a kontrollokhoz képest ( $p < 0,001$ ). A kontrolloknál csak mintegy 1,6-4,0 %-ban volt jelen az orosomuoid a vizeletfehérjék közt, 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.

### Korrelációs vizsgálatok

Szignifikáns ( $p < 0,001$ ) pozitív korrelációt találtunk az u-ORM/u-CREAT és a közismert gyulladási paraméterek között, mint a se-ORM (0,693), a hsCRP (0,600), a WBC (0,407) és a PCT (0,348). Továbbá, az u-ORM/u-CREAT korrelált a vesefunkciós markerekkel:

cisztatin-C (0,488), kreatinin (0,318), azonban egyéb asszociációt nem találtunk a szervelégtelenségeket jelző paraméterekkel.

#### **IV.5. Szívműtött betegek vizsgálata**

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) történt. 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 intenzív osztályos felügyeletet igényelt. Az 5 napos követés alatt egyik szívműtött betegnél sem alakult ki akut veseelégtelenség, sem szepszis. A műtétet követő hatvanadik napon valamennyi szívműtött beteg életben volt.

##### **Kiindulási, műtét előtti adatok**

A szívműtét előtti napon a betegek alap u-ORM/u-CREAT és hsCRP értékei mérsékelten emelkedettek voltak az egészséges egyénekhez viszonyítva ( $p < 0,001$ ). Ezzel szemben a se-ORM koncentrációk nem különböztek a referencia egyénétől.

A műtét előtti u-ORM/u-CREAT szintek egyformán enyhe emelkedést mutattak a szívműtétre váró betegeknél, függetlenül az ismert krónikus betegségektől. Az alap 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.

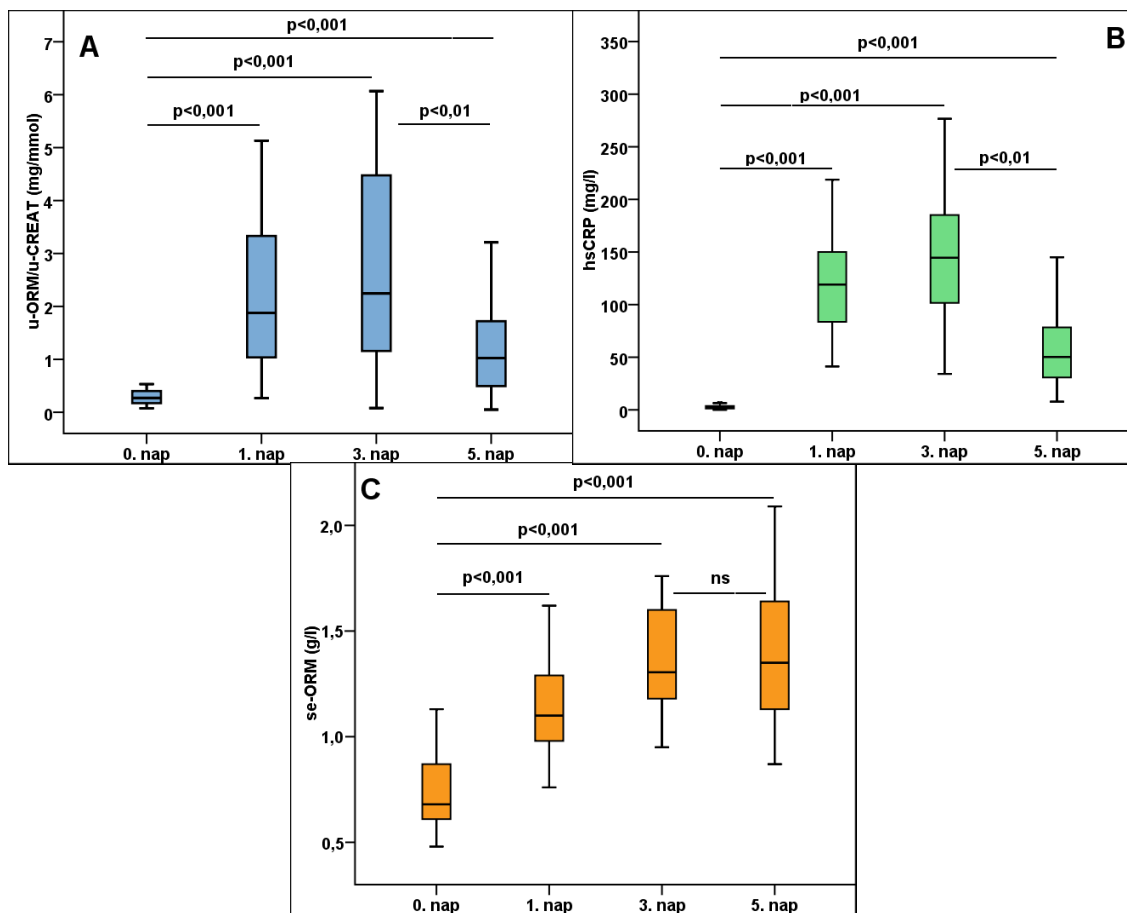
##### **A gyulladós állapot monitorozása szívműtét után**

A műtét utáni időszakban az u-ORM/u-CREAT szintek változásai hasonló mintázatot mutattak a hsCRP kinetikájához. Nagyjából 10-szeres emelkedést találtunk a szívműtét után az u-ORM/u-CREAT tekintetében, mely a harmadik napon is emelkedett maradt, majd szignifikánsan csökkent, habár magasabb maradt a kiindulási, műtét előtti szintnél (4/A,B 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 (4/C Ábra).

##### **Korrelációs vizsgálatok**

Szívműtét után az u-ORM/u-CREAT értékek szignifikáns ( $p < 0,001$ ), pozitív korrelációt mutatattak a gyulladós paraméterekkel: hsCRP (0,724), se-ORM (0,633) és WBC (0,461). Azonban nem találtunk összefüggést a vesefunkciós markerekkel, sem a cisztatin-C, sem a kreatinin koncentrációkkal.

4. 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, ns: nem szignifikáns

## V. MEGBESZÉLÉS

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

Munkánk során megfelelően gyors, érzékeny és precíz turbidimetriás u-ORM meghatározási módszert dolgoztunk ki cobas 8000/c502 automatán, mely rutin felhasználásra is ideális. A különösen alacsony mennyiségi meghatározási határ és a jó funkcionális szenzitivitás eredményeknek köszönhetően a módszerünk lehetővé teszi a kvantitatív u-ORM meghatározást valamennyi egészséges egyén vizeletében, és megfelelő hígítás után szisztémás gyulladással járó betegekénél is. A szűk biztonsági zóna miatt, a vizelet minták 20-szoros előhígítása ajánlott, így kiterjeszhető a mérési határ, akár 105 mg/l koncentrációig.

Korábban közölt módszerekkel összehasonlítva automata turbidimetriás módszerünk érzékenyebb és precízebb u-ORM meghatározást tesz lehetővé.

Egyetértésben korábbi vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az ORM a vizeletben - *in vitro* – stabil, így későbbi u-ORM mérésekhez akár hosszabb ideig is tárolhatók a vizeletminták.

Vizsgálataink során egészséges egyéneknél alacsony u-ORM kiválasztást figyeltünk meg. A 72 egészséges egyén spontán vizelet mintája alapján meghatározott u-ORM/u-CREAT referencia tartományunk jó összhangban van korábbi tanulmányok eredményeivel. A random (nem gyűjtött) vizelet mintákban az u-ORM szintek kifejezése u-ORM/u-CREAT arányában javasolt, ezáltal csökkenthető a vizelet változó koncentrátságának hatása, mindemellett az u-ORM/u-CREAT szintek függetlennek tűnnek az életkortól és a nemtől.

Az egészségesekhez képest a krónikus alaptergéséggel rendelkező egyéneknél 2-3 szoros u-ORM/u-CREAT emelkedést figyeltünk meg, mely különbségek rámutatnak a krónikus betegségek u-ORM kiválasztásra gyakorolt hatására. Valószínűnek tartjuk, hogy az enyhe emelkedést az alaptergéségekkel járó krónikus gyulladással járó folyamat okozza, melyet a mérsékelten emelkedett hsCRP értékek is alátámasztanak. Az u-ORM gyulladással összefüggő emelkedését korábban mások is feltételezték krónikus betegségek, kardiovaszkuláris megbetegedések, diabetes, atherosclerosis, szívelégtelenség során. Az illesztett kontroll csoportnál megfigyelt u-ORM emelkedés jó összhangban van a szívűtött betegcsoport műtét előtti u-ORM szintjeivel. A szívűtetre előjegyzett betegek szintén krónikus betegségekkel kezelt egyének voltak, ugyanacsak mérsékelten emelkedett hsCRP értékekkel. 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.

Szignifikánsan emelkedett u-ORM exkréciót találtunk súlyos szisztémás gyulladásban is. 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 túlélési esélyeket, 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.

Mindeddig csak Magid és mtsai. számoltak be eredményeinkhez hasonló mértékben emelkedett u-ORM exkrécióról szepszisben, igaz ők mindössze csak 7 szeptikus beteget monitoroztak.

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.

Annak ellenére, hogy az u-ORM szinteket nem befolyásolták a szepszishez kapcsolódó szervelégtelenségek, valamint ezek súlyossága, a vese funkcionak fontos hatása lehet az u-ORM kiválasztásra. Ezt a dializált betegek esetén megfigyelt extrém 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 veseelégtelenséget, és a vesepótló kezelés igényét, habár ennek eldöntésére további vizsgálatokra van szükség. Eredményeinkkel összhangban, korábban Devarajan és mtsai. szívűtött gyermekeknél figyeltek meg extrém fokú u-ORM emelkedést, melyet a posztoperatív AKI korai markereként írtak le.

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, és egy jelentős fehérjévé válik a vizeletben.

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.

Nagy műtéti beavatkozások, mint a nyitott szívűtét is, szisztémás gyulladásos választ váltanak ki, mely során a szepszishez hasonlóan aktiválódhat az immunrendszer.

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 szívűtét után, és nem a se-ORM szintek változását. A hosszú, körülbelül 5 napos féléletideje magyarázza a se-ORM kinetikáját, míg az u-ORM szinteket valószínűleg kevésbé befolyásolják azon faktorok, melyek a plazma féléletidőért felelősek. Az u-ORM szintek szívűtét után megfigyelt kinetikája magyarázza az intenzív osztályon kezelt SIRS betegeknel észlelt két napig nem változó szinteket, hiszen az u-ORM értékek csak a stimulus utáni harmadik napot követően mutatnak csökkenést. Csak néhány adat található az u-ORM kinetikáját illetően műtét után. Eredményeinkkel egyetértésben Magid és mtsai. követéses vizsgálatukban, 6 hasi műtéten átesett beteg monitorozásakor figyelték meg, hogy az u-ORM szintek tükrözik a CRP változásait. Devarajan és mtsai. szívűtött gyermekek vizsgálata során leírták, hogy az u-ORM szintek két órán belül képesek megemelkedni.

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. A korrelációs vizsgálatok alapján az u-ORM/u-CREAT szintek összhangban vannak a gyulladásos válasz mértékével, az erős korreláció a gyulladásos markerek és u-ORM/u-CREAT értékek között megerősíti azt a feltevést, hogy a szisztémás gyulladás tűnik a legfőbb felelősnek az u-ORM emelkedésében, ezzel is hangsúlyozva az ORM immunmodulátoros szerepét.

Az elvégzett vizsgálatok eredményeit összegezve megállapítható, hogy a vizelet orosomuroid a szérum orosomuroidnál 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 gyorseszként is.

## VI. ÚJ EREDMÉNYEK-TÉZISEK

- Adaptáltunk 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 gyermekeknél és felnőtteknél egyaránt alkalmazható.
- 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 gyulladós állapotnak.
- Az u-ORM szintek markáns és korai emelkedést mutattak szepszisben, és képesek egyértelműen elkülöníteni a SIRS-et a szepszistől. A 6,75 mg/mmol feletti u-ORM/u-CREAT szintek egyidejű 90 % feletti szenzitivitással és specificitással képesek jelezni a súlyos szepszist.
- Habár az u-ORM/u-CREAT szintek függetlennek tűntek a szepszis súlyosságától és a kimeneteltől, az extrém szintek potenciális indikátorai lehetnek a vesekárosodásnak és vesepótló kezelés szükségességének.
- Az u-ORM/u-CREAT szintek időbeli változása szívműtét után demonstrálta, hogy az u-ORM gyors és érzékeny markere a szisztémás gyulladós aktivitás fokozódásának.
- 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.
- Erős korrelációt találtunk a közismert gyulladós paraméterek és az u-ORM/u-CREAT értékek között, mely utalhat arra, hogy az u-ORM emelkedésben a szisztémás gyulladás jelentős szerepet játszik.
- A vizelet orosomuroid a szérum orosomuoidnál egy jóval érzékenyebb, korai gyulladós marker, mely ideális a szisztémás gyulladós aktivitás non-invazív követésére.

## VII. A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

### 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 orosomuroid 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 orosomuroid: 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 orosomuroid: 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**

Németh B, Kiss I, Jencsik T, Peter I, Kreska Z, Kőszegi T, Miseta A, **Kustán P**, Boncz I, Laczó 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: -----**

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

### **Könyvfejezetek**

**Péter Kustán**, Balázs Szirmay, Diána Mühl, Andrea Ludány: Human orosomuroid 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 orosomuroid, 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 Orosomuroid 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 orosomuroid: 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 orosomuroid- automated immunoturbidimetric test and its clinical relevance. *The 8th Conference of PhD Students*, Marosvásárhely, 2015.12.09-10. IN: *Acta 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 orosomuroid 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 orosomuroid 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 orosomuroid 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: Orosomuroid 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 orosomuroid 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.

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

**Kustán Péter**: Vizelet orosomuroid, 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 orosomuroid 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 orosomuroid vizsgálatára. *PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia*, Pécs, 2013.02.07-08.

**Kustán Péter**: Vizelet orosomuroid mérések szepszis 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 orosomuroid monitorozás szívműtéten átesett betegekénél. *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 orosomuroid: 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.

**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 gelsolin. *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 orosomuroid 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 orosomuroid 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 orosomuroid 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 orosomuroid 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 orosomuroid in sepsis. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 56. Nagygyűlése*, Budapest, 2012.08.30-09.01. IN: *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):eA33.



## VIII. 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 Szentágotthai Kutatóközpont igazgatójának, Prof. Dr. Kovács L. Gábornak is köszönettel tartozom, amiért lehetőséget biztosítottak a vizsgálatok elvégzéséhez. Kiemelt köszönettel tartozom két lelkes kollégámnak, Dr. Szirmay Baláznak és Dr. Horváth-Szalai Zoltánnak, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi munkatársának, kiemelten Rózsai Ágnesnek, aki a cobas automata rejtelveivel 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 Baláznak, Dr. Ajtay Zénónak és Dr. Németh Ádámnak tartozom hálával.

A vizelet orosmucooid 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.

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