

Aktinkötő fehérjék szepszisben

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Horváth-Szalai Zoltán

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Kőszegi Tamás, PhD

Doktori iskola vezetője:

Prof. Dr. Kovács L. Gábor, PhD, DSc

Programvezető:

Prof. Dr. Miseta Attila, PhD, DSc



Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

2018

I. BEVEZETÉS

1. A szepszis epidemiológiája és konvencionális laboratóriumi diagnosztikája

A szepszis diagnosztikája napjaink orvostudományának egyik nagy kihívása. Statisztikai felmérések szerint évente mintegy 19 millió szeptikus beteget hospitalizálnak világszerte (1). A szepszis egy sokarcú szindróma, nem egy definitív betegség, ezért nehéz egy univerzális diagnosztikus kritériumrendszer alkalmazása. Az első konszenzus panel szakértői a szepszist egy infekcióra adott szisztémás gyulladással válaszreakcióként (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) értelmezték (2). Az eltelt közel 25 év során a kórképpel kapcsolatos szakmai szemlélet megváltozott, melyet az új definíció is jól mutat: a szepszis a szervezet infekcióra adott diszregulált immunválasza, melynek következménye életveszélyes szervi diszfunkció(k) kialakulása. Bár a szepszis akut mortalitása csökkenni látszik, a szeptikus sokk halálozási rátája továbbra is magas (40-55%) (3, 4).

A diagnosztikát segítő rutin mikrobiológiai tenyésztés időigényes és kis hatásfokú (5). Ennek következtében a klinikai tünetek (légzési, kardiovaszkuláris, neurológiai diszfunkció) észlelésén túl elengedhetetlen a laboratóriumi paraméterek (koaguláció, máj-és vesefunkció), valamint speciális fehérje markerek vizsgálata a szindróma korai felismerése és kezelése érdekében.

Napjaink gold standard szepszis markere a szérumban procalcitonin (PCT). A PCT képes a SIRS/szepszis hatékony elkülönítésére, valamint biztató eredmények utalnak a PCT vezérelt antibiotikus terápia hasznosságára (5-7). Gyakran vizsgált akut fázis fehérje szepszisben a szérumban magas szenzitivitású C-reaktív protein (high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP) is, bár lokális gyulladással szintén okozhat hsCRP növekedést (5). Tanulmányunkban olyan fehérjéket vizsgáltunk, amelyek kiegészítő információt adhatnak a szepszis súlyosságáról.

2. Szérumban aktin és aktinaktiváló fehérjék

Az aktin (molekulatömeg: 42 kDa) az eukarióta sejtekben expresszált ubikviter fehérje. Hat izoformája és két fő előfordulási állapota (globuláris [G]/monomer és filamentózus [F]/polimer) ismert (8, 9). Az aktin gyulladással kórfolyamatban apoptózis/sejtnekrózis révén juthat a plazmába, melynek ionerőssége és összetétele a mikrofilamentum-képződés irányában hat. Az

excesszív mennyiségben plazmába jutó szabad aktin toxikus, mivel a mikrométer hosszúságú filamentumok mikrothrombus-képződést, endothelsérülést okozhatnak. A szabad aktin filamentumok káros hatásától az extracelluláris aktin scavenger rendszer két fehérjéje, a gelszolin és a Gc (group-specific component)-globulin nyújt védelmet (10-15).

A gelszolin egy kalcium-függő fehérje, emlősben 2 fő izoformája (citoplazmatikus, valamint a plazmában jelen lévő) ismert. A plazma gelszolint (molekulásúly: 83 kDa) a vázizomzat szintetizálja, koncentrációja a vérben fiziológiásan 150-300 mg/l, azonban ez a tartomány nagymértékben függ a vizsgálati módszertől (16). A fehérje fő szerepe a plazma aktin filamentumok oligomerekké hasítása, emellett egy molekula gelszolin képes 2 molekula aktin monomer megkötésére is. A plazma gelszolin gyulladáshoz vezető kórfolyamatban nagy affinitással köti meg a bakteriális lipopoliszachharidot, képes a szfingozin-1-foszfát adszorbeálására, valamint a trombocita aktivációs faktor mediálta gyulladáshoz vezető válaszreakció gátlására is (10-14, 16).

A szérumban Gc-globulin (molekulásúly: 52-59 kDa) egy kis fokban glikozilált α_2 -globulin. A fehérjét a máj termeli, szérumban koncentrációja egészséges egyéneknél 200-600 mg/l (17). A Gc-globulin nagy affinitással köti a plazma monomer aktint, ezáltal segítve a gelszolin további mikrofilamentum hasítását. Emellett a Gc-globulin a plazma legfontosabb D-vitamin szállító fehérjéje. Gram-negatív infekció esetén a fehérje képes a bakteriális endotoxin megkötésére és hatásának gátlására. Kísérletes modellek feltételezték a fehérje gyulladáshoz vezető folyamatok során megvalósuló ko-kemotaktikus hatását is (17, 18).

Súlyos szisztémás gyulladáshoz és kiterjedt szövetségi sérülés során az elhalt sejtekből felszabaduló nagy mennyiségű aktin telíti az extracelluláris aktin scavenger rendszer kapacitását. Kísérletes eredmények alapján az aktinkötött gelszolint és Gc-globulint jóval gyorsabban eliminálják a retikuloendotheliális rendszer sejtjei, mint a szabad fehérjéket, ezáltal a gelszolin és a Gc-globulin szérumban szintje rövid időn belül csökken (10). Szakirodalmi adatok szerint az intenzív osztályon kezelt betegekben mért alacsony szérumban gelszolin szint korrelált az elhúzódó intenzív osztályos kezeléssel, a súlyos szövödmények kialakulásával, valamint a megnövekedett mortalitással (19-22). A szérumban Gc-globulin szerepét vizsgáló klinikai tanulmányok során csökkent fehérje koncentrációt mértek politraumatizált, szeptikus, valamint akut májelégtelenségben szenvedő betegek vérében (23-28). A csökkent szérumban Gc-globulin szint összefüggést mutatott a szervi diszfunkciók és a szeptisz kialakulásával, valamint a mortalitással.

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. A szérumban aktin és gelszolin szintek együttes vizsgálatára eddig nem került sor humán szepszisben. Célunk a szérumban aktin és gelszolin szintek, valamint egy új marker, az aktin/gelszolin hányados monitorozása és prediktív értékének meghatározása volt SIRS-ben és súlyos szepszisben.

2. Analitikai szempontból nem állt rendelkezésre gyors, automatizált módszer a szérumban gelszolin szint mérésére. Célunk volt egy gyors, immunturbidimetriás assay validálása a szérumban gelszolin koncentráció meghatározására. További célunk volt egy, a szérumban Gc-globulin szint mérésére alkalmas gyors, immunturbidimetriás módszer adaptálása.

3. Az eddigi kutatások kapcsán nem került sor a két aktin scavenger fehérje együttes, gyors meghatározására. Végül célunk volt ezért a szérumban gelszolin és Gc-globulin szint gyors, immunturbidimetriás mérése és prediktív értékének vizsgálata szepszisben.

III. BETEGEK ÉS MÓDSZERTAN

1. Betegcsoportok

Vizsgálati protokollunkat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával (4327.316-2900/KK15/2011), a 2003-as Helsinkii Deklaráció etikai irányelveinek megfelelően kiviteleztük.

Első klinikai követéses vizsgálatunkba a Pécsi Tudományegyetem Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetében 2013. január és 2014. december között felvételre került SIRS-es (n=12), valamint súlyos szeptikus (n=32) betegeket vontunk be. A SIRS és a súlyos szeptikus kórállapotot a Szepszis-2 konszenzus panel (29) kritériumainak megfelelően definiáltuk. Végpontként a beleegyező nyilatkozat visszavonása vagy a vizsgálati periódus alatt bekövetkezett halál szolgált. A kontroll csoport korban és nemből illesztett, alapbetegségekben a kritikus betegekhez hasonló, ambuláns szemészetii betegekből (n=28) állt. Kizárásra kerültek a 18. életév alatti, illetve a vizsgálatban való részvételt elutasító betegek (cselekvőképzetlenség

esetén a beteg legközelebbi hozzátartozója döntött a vizsgálatba való beleegyezésről). A kontroll betegek körében kizárási kritériumnak számított a 18. életév alatti kor, valamint a fennálló akut gyulladáso/s/infektív megbetegedés. Klinikai vizsgálatunkban a 7 napos (túlélő szeptikus betegek: n=21; nem túlélők: n=11), illetve a hosszabb távú intenzív osztályos mortalitást egyaránt figyelembe vettük.

Második követéses klinikai vizsgálatunkba a 2013. január és 2016. augusztus között egyetemünk intenzív osztályára felvételre került betegeket vontuk be. A betegek osztályozása retrospektív módon történt a Szepszis-3 definíciók (3) szerint, nem szeptikus (n=28), szeptikus (n=33) és szeptikus sokkos (n=13) csoportokba. Kontrollként korban és nemben illesztett, alapbetegségeiben a kritikus betegekhez hasonló, ambuláns betegeket (n=35) választottunk. A szeptikus betegek körében a 14 napos mortalitást (túlélők: n=28; nem túlélők: n=18) vizsgáltuk. A kritikus állapotú betegek körében kizárási kritériumnak számított az ismert autoimmun betegség, májelégtelenség, vagy a 18. életév alatti kor. A kontroll csoport tagjainál kizárási kritériumként szerepelt az ismert akut gyulladáso/s vagy autoimmun betegség, valamint a 18. életév alatti kor. Klinikai vizsgálatunkban a betegeket az intenzív osztályos tartózkodásuk alatt követtük, melynek során a klinikai diagnózistól számított 1., 2., 3. és 5. napokon történt vérvétel.

2. Vérvétel

A vénás vérvétel (7,5 ml) zárt vérvételi rendszerben (BD Vacutainer[®]) történt. A mintavételt követő 30. perc után az alvadt vérmintákat 1500g-n 10 percen át centrifugáltuk és a szérumokat azonnal analizáltuk, vagy felhasználásukig –80°C-os mélyhűtőben tároltuk.

3. Szérum aktin és gelszolin koncentrációk meghatározása Western blottal

A szérum fehérje szinteket kvantitatív kemilumineszcenciás Western blot módszerrel határoztuk meg (21), 10%-os SDS poliakrilamid gélelektroforézis (30) alkalmazásával. Poliklonális primer (Nyúl Anti-Humán N-terminális Aktin, ref. szám: A2103, Sigma-Aldrich Co. LLC; Nyúl Anti-Humán Gelszolin, ref.szám: A0146, Dako A/S, Glostrup, Denmark), valamint torma-peroxidázzal jelölt szekunder antitesteket (Sertés Anti-Nyúl Immunglobulinok, ref.szám: Z0196, Dako, A/S) használtunk. A Western blot kvantifikálását tisztított nyúl vázizom G-aktin, valamint

Escherichia coli expressziós rendszerben (His-8) előállított rekombináns humán gelszolin antigénekkal végeztük.

4. Immunturbidimetriás assay a szérumbelgelszolin szint meghatározására

A szérumbelgelszolin immunturbidimetriás assay-t a Cobas 8000 analizátor c502-es moduljának nyitott csatornájára (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) applikáltuk. Gyári gelszolin kalibrátor hiánya miatt standardként *Escherichia coli*-ban termelt rekombináns humán gelszolinat használtunk. A rekombináns gelszolin kalibrátort főtális borjú szérumbal (FBS, ref. szám Ph. Euro. 2262, PAN Biotech, Aidenbach, Germany) hígítottuk. Kontrollként – gyári kontroll hiányában – egészséges egyének poolozott szérumbmintája szolgált. Az assay során dilúciós pufferrel (ref. szám S2005, Dako A/S) 1:4 arányban hígított poliklonális nyúl anti-humán gelszolin antitestet (ref. szám. A0146, Dako A/S), valamint reakciós puffert (ref. szám S2007, Dako A/S) alkalmaztunk, Christensen munkacsoportjának módszertani leírását (31) módosítva. Az assay-t az Eurochem irányelvek 2. kiadása (32) alapján validáltuk.

5. Immunturbidimetriás assay a szérumbGc-globulin szint meghatározására

A szérumbGc-globulin immunturbidimetriás assay-t a Cobas 8000 automata c502-es moduljának nyitott csatornájára applikáltuk. A szérumbGc-globulin koncentrációt Bangert (33) módosított módszertani protokollja alapján határoztuk meg, mely során dilúciós pufferrel (ref. szám S2005, Dako A/S) 1:5 arányban hígított poliklonális nyúl anti-humán Gc-globulin antitestet (ref. szám A0021, Dako A/S), reakciós puffert (ref. szám S2007, Dako A/S), humán szérumbprotein kalibrátort (ref. szám X0908, Dako A/S) és alacsony koncentrációjú humán szérumbprotein kontrollt (ref. szám X0939, Dako A/S) használtunk. A módszer analitikai teljesítményét az Eurochem irányelvek 2. kiadása (32) alapján ellenőriztük.

6. Rutin laboratóriumi paraméterek és klinikai pontszámok meghatározása

A konvencionális laboratóriumi paraméterek szintjét a rutin diagnosztikában használt automatákon mértük. Az Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) II,

Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II és Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) klinikai pontszámokat az intenzív osztályos kezelés első napjára adtuk meg. A quick SOFA (qSOFA) pontszámokat az intenzív osztályos felvételi paraméterek alapján számoltuk. Az artériás középnyomást (mean arterial pressure [MAP]) intraarteriális vérnyomásmérés során határozták meg az intenzív osztályon.

7. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, 22. verzió), valamint Origin Pro 8 programcsomagot használtunk. Adataink eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A betegcsoportok összehasonlítását és markereink prediktív értékét nem-parametrikus tesztekkel illetve regressziós analízissel vizsgáltuk. A korábbi Western blot, valamint az új gelszolin assay módszertani összehasonlítását Bland-Altman plottal végeztük. A statisztikai szignifikancia szintje $p < 0,05$ volt.

IV. EREDMÉNYEK

1. Szérum aktin, gelszolin szintek és aktin/gelszolin hányados vizsgálata SIRS-ben és szepszisben

Klinikai és laboratóriumi paraméterek

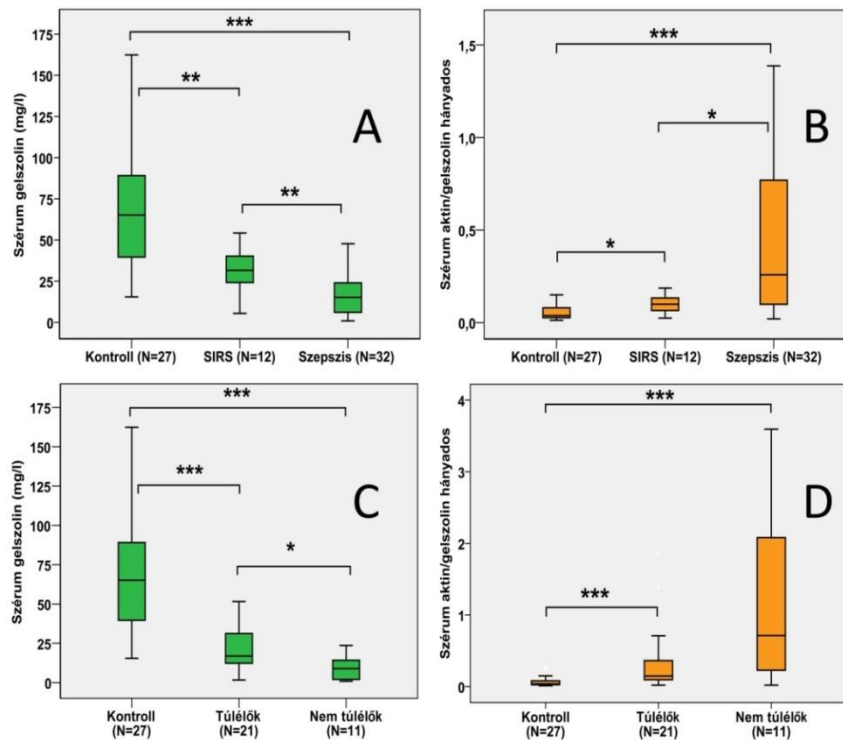
A betegek 63,6%-a sebészeti beavatkozást követően, míg 36,4%-a egyéb ok (pl.: akut légzési elégtelenség) miatt került intenzív osztályos felvételre. Szeptikus betegekben nagyobb első napi szérum PCT ($p < 0,001$), hsCRP ($p < 0,001$) szinteket, valamint nagyobb APACHE II ($p < 0,001$), SAPS II ($p < 0,001$) és SOFA ($p < 0,05$) klinikai pontszámokat észleltünk a SIRS-es betegekhez képest.

Szignifikánsan nagyobb ($p < 0,05$) első napi szérum PCT szinteket és klinikai pontszámokat észleltünk nem túlélő szeptikus betegekben a túlélőkhöz képest a 7 napos mortalitás vizsgálata során. A szeptikus betegek 65,6%-ában akut veseelégtelenség, 50%-ában akut tüdőszűrés, 21,8%-ában thrombocitopenia, míg 12,5%-ában akut májelégtelenség lépett fel. A hemokultúra

eredménye a betegek 18,8%-ában pozitív volt, míg 53,1%-ban a kórokozót egyéb forrásból (pl.: bronchoalveolaris lavage) sikerült azonosítani.

Szérum aktin, gelszolin szintek és aktin/gelszolin hányados kritikus állapotú betegekben

Az első napi szérum gelszolin szint nagyobb ($p < 0,01$) volt SIRS-ben mint szepszisben, míg a legnagyobb gelszolin koncentrációt a kontroll csoportban észleltük (1A ábra). A legnagyobb első napi aktin/gelszolin hányadosokat szepszisben mértük, ehhez képest kisebb ($p < 0,05$) értékeket kaptunk SIRS-ben, míg a legkisebb értékek a kontroll csoportban voltak ($p < 0,001$) (1B, D ábra). Túlélő szeptikus betegekben az első napi szérum gelszolin koncentráció a nem túlélőkhöz képest nagyobb ($p < 0,05$) volt (1C ábra). A követés során a 3. napon ugyancsak nagyobb gelszolin szinteket mértünk szeptikus túlélőkben a nem túlélőkhöz képest (22,95 vs. 3,69 mg/l; $p < 0,05$). Nagyobb medián szérum aktin szintet mértünk szeptikus nem túlélőkben a túlélőkhöz viszonyítva, bár ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Ezen túlmenően, szeptikus nem túlélőkben a túlélőkhöz képest nagyobb 2. napi szérum aktin/gelszolin hányadosokat észleltünk (medián: 2,18 vs. 0,19; $p < 0,05$).



1. ábra. Az első napi szérum gelszolin koncentrációk és aktin/gelszolin hányados értékek szeptikus, SIRS-es és kontroll betegekben (A, B), valamint szeptikus túlélőkben és nem túlélőkben, a 7-napos mortalitást figyelembe véve (C, D). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). SIRS: systemic inflammatory response syndrome

Spearman-féle korrelációs analízis

A szérumban gelszolin szintek negatívan korreláltak a szérumban PCT ($\rho = -0,38$, $p < 0,05$), hsCRP szintekkel ($\rho = -0,65$, $p < 0,01$), valamint a SAPS II ($\rho = -0,37$, $p < 0,05$) és SOFA ($\rho = -0,35$, $p < 0,05$) pontszámokkal. A szérumban gelszolin és albumin szintek pozitívan korreláltak egymással ($\rho = 0,43$, $p < 0,01$). Az aktin/gelszolin hányados értékek pozitívan korreláltak a hsCRP szinttel ($\rho = 0,43$, $p < 0,01$) valamint a SOFA pontszámmal ($\rho = 0,32$, $p < 0,05$).

A receiver operating characteristics (ROC) és a COX-féle regressziós analízisek eredményei

A SIRS/szepszis elkülönítése terén az első napi szérumban PCT ROC-görbe alatti terület értéke 0,95, hsCRP esetén 0,84, míg gelszolin esetén 0,77, az aktin/gelszolin hányados kapcsán 0,70 volt (mindegyik esetben $p < 0,05$).

A 7 napos mortalitás előrejelzésére a PCT ROC-görbe alatti területértéke 0,75, míg gelszolin esetén 0,74 volt (mindkét esetben $p < 0,05$). Az aktin/gelszolin hányados (0,70), valamint a hsCRP (0,66) vizsgálata során nem kaptunk szignifikáns értéket.

Az intenzív osztályos mortalitás előrejelzésére a COX-féle regressziós analízis során az APACHE II pontszám mellett (hazard ratio (HR)=1,208; 95%-os konfidencia intervallum (KI)=1,083 – 1,347; $p = 0,001$) csak az aktin/gelszolin hányados (HR=1,172; 95% KI=1,079 – 1,273; $p < 0,001$) bizonyult szignifikáns faktornak.

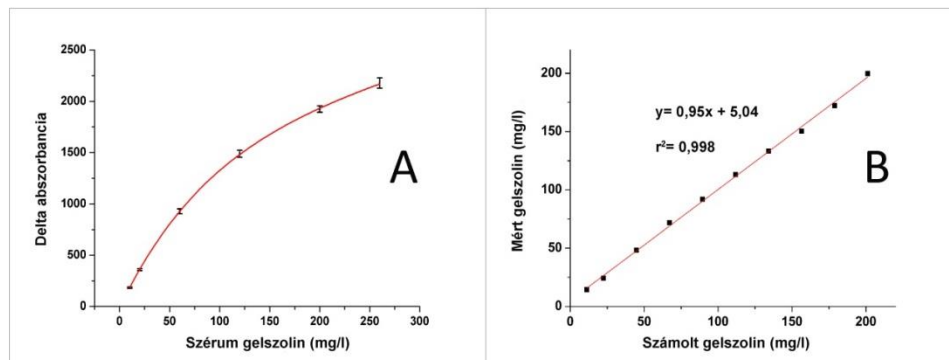
2. Módszerfejlesztés

2.1. Immunturbidimetriás assay a szérumban gelszolin szint mérésére

Analitikai paraméterek és stabilitás vizsgálat

A 2A ábra 9 független kalibráció összegzett görbáját mutatja. A vakhatár (limit of blank [LOB]) 0,47 mg/l, a kimutatási határ (limit of detection [LOD]) 0,72 mg/l, míg a meghatározási határ (limit of quantification, [LOQ]) 1,99 mg/l volt. Az intra- és inter-assay variabilitás vizsgálata során kapott variációs koefficiens (CV%) értéke az esetek többségében 5% alatt volt. A 4

különböző tartományban végzett visszanyerési (recovery) vizsgálat során 84,56 – 93,52% közötti értékeket kaptunk. A linearitás vizsgálatához egy szérumminta 10 különböző hígítását használtuk, mely során a számolt lineáris regressziós koefficiens adekvátnak bizonyult ($r^2 = 0,998$) (2B ábra). A 10 napos stabilitás vizsgálat alatt a minták szérum gelszolin szintje nem változott jelentősen a kezdeti értékekhez képest (96,70 – 117,36%), továbbá az 5 ismételt fagyasztási-olvasztási ciklus során sem tapasztaltunk lényeges változást.



2. ábra. Validálási eredmények. A: A gelszolin assay exponenciális illesztéssel nyert szummált (n=9) 6-pontos (10–260 mg/l) kalibrációs görbéje. B: A linearitás vizsgálat eredménye. Az egyenes pontjai átlagokat jelölnek. r^2 : regressziós koefficiens.

A Western blot és az immunturbidimetriás mérési eredmények összevetése

A szeptikus, SIRS-es, valamint a kontroll betegek Western blot és immunturbidimetriás mérési eredményeit Bland-Altman analízissel vetettük össze, mely a hibát 0,26-nak jelölte, míg a megfelelőségi tartományt $-0,79 - 1,09$ között adta meg.

2.2. A szérum Gc-globulin szint mérése immunturbidimetriás assay-vel

Analitikai paraméterek és stabilitás vizsgálat

Méréseink során a LOB 0,43 mg/l, a LOD 0,66 mg/l, míg a LOQ 1,85 mg/l volt. Az intra-assay pontatlanság 1,38 – 1,64% között mozgott, míg az inter-assay pontatlanság 5,03% volt. A linearitás vizsgálatához egy szérumminta 7 különböző hígítását (8 – 332 mg/l) használtuk, mely során a kapott regressziós koefficiens értéke ($r^2=0,995$) megfelelőnek bizonyult. A 6 napos

stabilitás vizsgálat (+4°C), valamint az 5 fagyasztási-olvasztási ciklus során mintáinkban nem tapasztaltunk érdemi szérumban Gc-globulin koncentráció-változást.

3. A gelszolin és a Gc-globulin prediktív értékének vizsgálata szepszisben

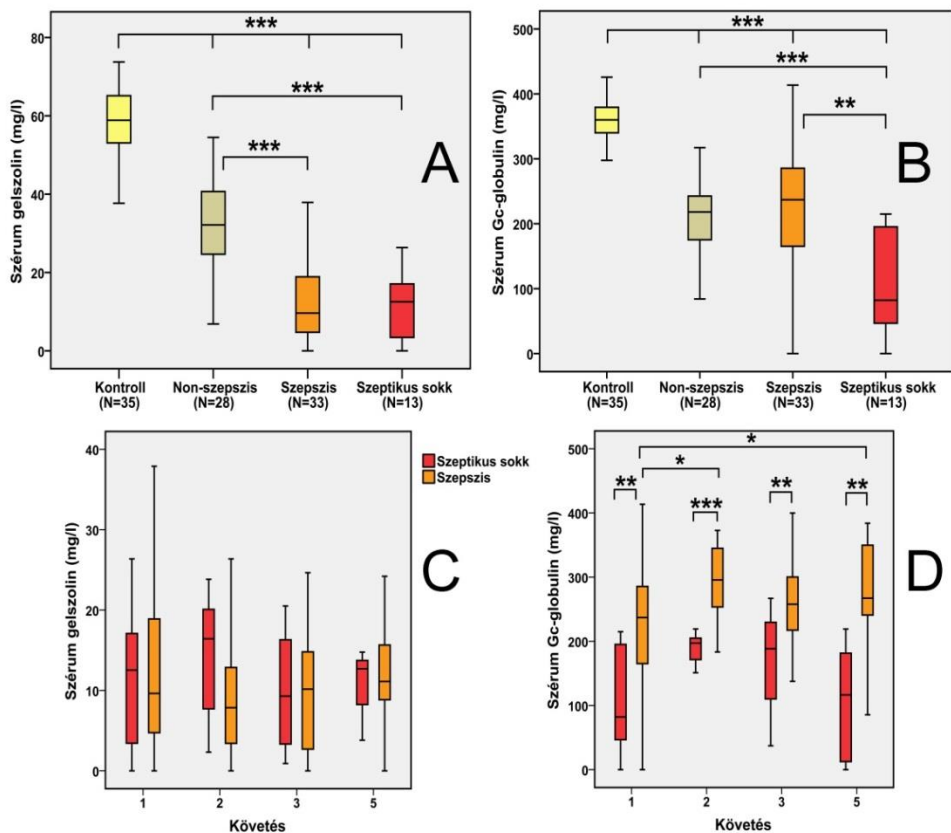
Klinikai és laboratóriumi paraméterek

Az intenzív osztályos betegcsoportok qSOFA pontszámai nem különböztek szignifikánsan. Mindhárom kritikus állapotú betegcsoport APACHE II pontszáma eltért egymástól ($p < 0,05$), míg a SAPS II pontszámok nagyobbak ($p < 0,01$) voltak a szeptikus és a szeptikus sokkos betegekben a nem szeptikus intenzív osztályos betegekhez képest. A szeptikus sokkos betegek felvételi SOFA pontszámai nagyobbak ($p < 0,01$) voltak, mint a szeptikus és a nem szeptikus betegek esetén észlelték. Szeptikus sokkos és szeptikus betegekben magasabb ($p < 0,001$) szérumban hsCRP és PCT értékeket mértünk, mint a nem szeptikus intenzív osztályos betegekben. A mikrobiológiai tenyésztés az esetek 76,8%-ban pozitívnak bizonyult.

Szérumban gelszolin és Gc-globulin szintek szeptikus sokkos, szeptikus és SIRS-es betegekben

Az első napi szérumban aktinotó fehérje szintek a kontroll csoportban nagyobbak ($p < 0,001$) voltak, mint az intenzív osztályos betegekben (3A, B ábra). A nem szeptikus intenzív osztályos betegekben nagyobb ($p < 0,001$) szérumban gelszolin koncentrációt mértünk, mint a szeptikus és a szeptikus sokkos páciensekben (3A ábra). Szeptikus sokkosban észleltük a legkisebb első napi szérumban Gc-globulin szinteket, míg ehhez képest nagyobb volt a Gc-globulin koncentráció szepszisben ($p < 0,01$) és SIRS-ben ($p < 0,001$) egyaránt (3B ábra).

Az 5 napos követés során mindvégig nagyobb ($p < 0,01$) szérumban Gc-globulin szinteket mértünk szepszisben, mint szeptikus sokkosban (3D ábra). Továbbá, szeptikus betegekben az első napi szérumban Gc-globulin értékekhez képest a 2. és az 5. napi szérumban Gc-globulin koncentráció nőtt ($p < 0,05$). A szérumban gelszolin szintek vizsgálatakor, a követési periódus során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a szeptikus és a szeptikus sokkos betegcsoportok között (3C ábra).



3. ábra. Szeptikus sokkos, szeptikus és nem szeptikus intenzív osztályos betegekben mért első napi szérum gelszolin (A), Gc-globulin szintek (B), valamint a követés során mért szérum gelszolin (C) és Gc-globulin (D) koncentrációk szeptikus és szeptikus sokkos betegekben. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Szérum gelszolin és Gc-globulin szintek szeptikus túlélő és nem túlélő betegekben a 14 napos mortalitás alapján

Az első napi szérum gelszolin szintek nagyobbak voltak a túlélő szeptikus betegekben, mint a nem túlélőkben (medián: 12,9 vs. 6,9 mg/l; $p<0,05$). Az 5 napos követés során nem tapasztaltunk további szignifikáns változást a szérum gelszolin koncentrációk terén.

A követés során növekvő trendet ($p<0,05$) figyeltünk meg a túlélő szeptikus betegekben az első és a 2. napi (medián: 212,8 vs. 271,9 mg/l), valamint az első és a 3. napi (medián: 212,8 vs. 235,2 mg/l) Gc-globulin szintek összehasonlításakor. Hasonló tendenciát tapasztaltunk a nem túlélő betegek első és 2. napi Gc-globulin koncentrációinak vizsgálatakor (medián: 155 vs. 267,1 mg/l; $p<0,05$).

Spearman-féle korrelációs analízis

A szérumbilirubin és Gc-globulin szintek pozitívan korreláltak egymással ($\rho = 0,48$, $p < 0,01$), továbbá mindkét fehérje szintje pozitívan korrelált a szérumbilirubin koncentrációval (bilirubin – albumin: $\rho = 0,54$; Gc – albumin: $\rho = 0,61$, $p < 0,01$) és negatívan a hsCRP szinttel (bilirubin – hsCRP: $\rho = -0,68$; Gc – hsCRP: $\rho = -0,43$, $p < 0,01$). Gc-globulin esetén negatív korrelációt tapasztaltunk a plazma laktáttal ($\rho = -0,64$, $p < 0,01$), PCT-vel ($\rho = -0,34$, $p < 0,01$), valamint a klinikai pontszámokkal (Gc – SAPS II: $\rho = -0,49$, $p < 0,01$; Gc – APACHE II: $\rho = -0,35$, $p < 0,05$; Gc – SOFA: $\rho = -0,52$, $p < 0,01$) egyaránt.

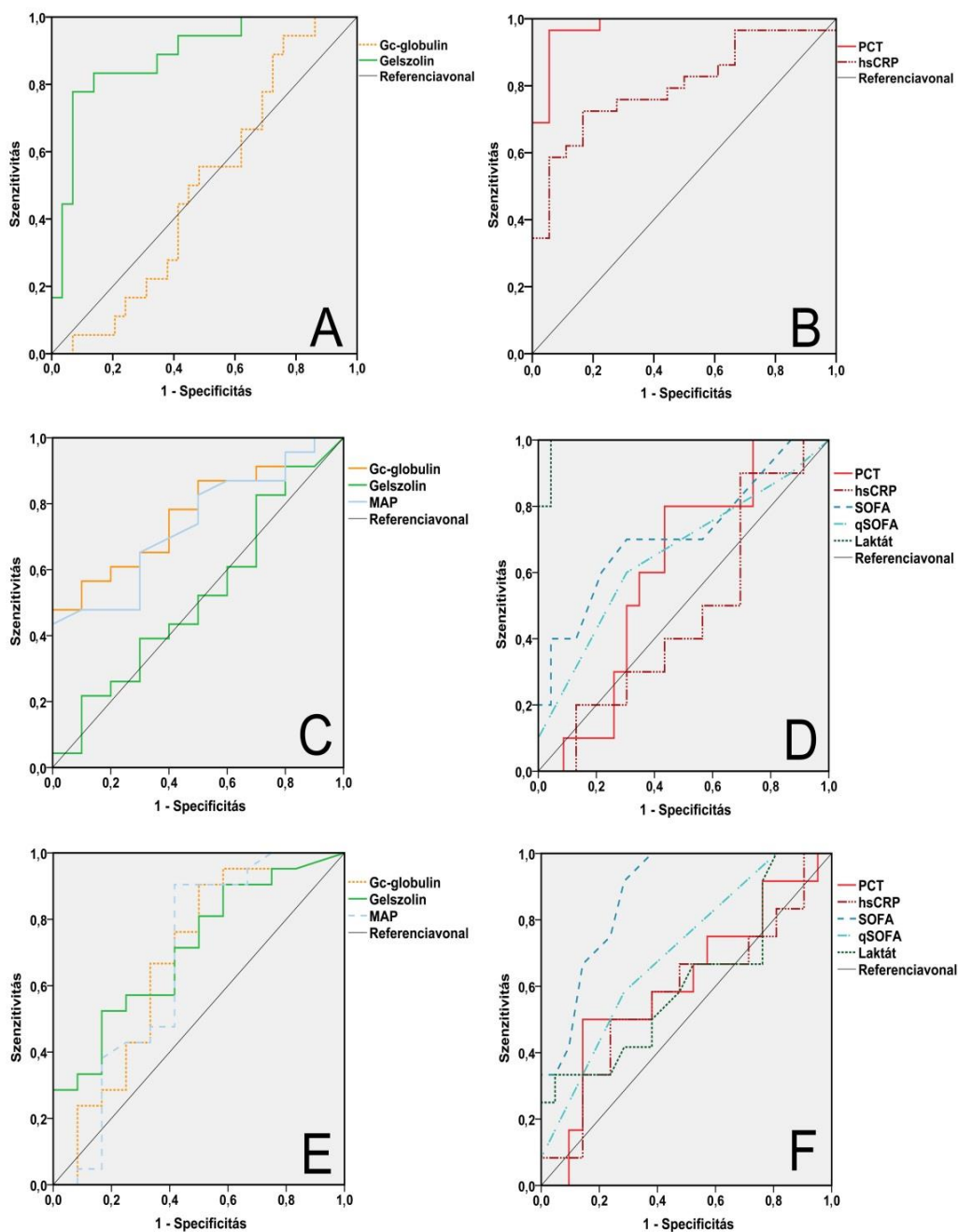
A ROC és logisztikus regressziós analízisek eredményei

A szeptikus/nem szeptikus intenzív osztályos betegek elkülönítése terén a PCT (AUC: 0,98, $p < 0,001$) és a hsCRP (AUC: 0,80, $p < 0,01$) mellett a bilirubint is diagnosztikus értékűnek találtuk (AUC: 0,88, $p < 0,001$). Az optimális bilirubin küszöbérték 22,29 mg/l volt (szensitivitás: 83,3%, specificitás: 86,2%) (4A, B ábra).

A szeptikus sokkos/szeptikus állapot elkülönítésére a plazma laktát szint (AUC: 0,99, $p < 0,001$) bizonyult a legjobb paraméternek, de emellett a Gc-globulin (AUC: 0,76) és az átlagos artériás közepnyomás (AUC: 0,74) is szignifikáns ($p < 0,05$) görbe alatti területértékkel bírt (4C, D ábra). Az optimális küszöbérték Gc-globulin esetén 116,5 mg/l volt (szensitivitás: 78,3%, specificitás: 60%).

A 14 napos mortalitás predikciója terén a SOFA pontszám (AUC: 0,88, $p < 0,001$) és a szérumbilirubin (AUC: 0,71, $p < 0,05$) szignifikáns eredményt adott (4E, F ábra). A bilirubin esetén meghatározott küszöbérték 8,7 mg/l volt (szensitivitás: 71,4%, specificitás: 58,3%).

Logisztikus regressziós analízis során a felvételi SOFA pontszám ($\beta = 0,53$; $p = 0,03$; OR=1,70; 95%-os KI: 1,03-2,79) mellett az első napi bilirubin szintek ($\beta = -0,15$; $p = 0,04$; OR= 0,87; 95%-os KI: 0,75-0,99) bizonyultak szignifikánsnak a szeptikus 14 napos mortalitásának előrejelzésére.



4. ábra. ROC (Receiver operating characteristic curves) analízis az első napi szérumban mérhető paraméterek és klinikai pontszámok összehasonlítására. A, B: szeptikus/nem szeptikus kórállapot elkülönítése; C, D: szeptikus sokk/szeptis differenciálása; E, F: 14 napos mortalitás előrejelzése szeptisben. hsCRP: high sensitivity C-reactive protein (magas szenzitivitású C-reaktív protein); MAP: mean arterial pressure (artériás középnyomás); PCT: prokalcitonin; qSOFA: quick Sequential Organ Failure Assessment; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

V. DISZKUSSZIÓ

1. Szérum aktin, gelszolin szintek és aktin/gelszolin hányados vizsgálata SIRS-ben és szepszisben

Első klinikai tanulmányunkban a Western blot módszerrel kimutatott szérum gelszolin és az új aktin/gelszolin hányados prediktív értékét vizsgáltuk. Fontos megfigyelésünk, hogy a szeptikus, 7 napos mortalitás szempontjából túlélő betegek első napi szérum gelszolin szintje szignifikánsan nagyobb volt a nem túlélőkhöz képest, hasonlóan Lee és munkatársainak eredményeihez (20, 21), azonban ellentétben Wang és munkatársainak megállapításával (22).

Vizsgálatunk során Lee (20, 21), valamint Wang és munkatársaival (22) ellentétben, szignifikáns különbséget találtunk a szeptikus túlélő és nem túlélő betegek szérum albumin szintje között. Hasonlóan megfigyelésünkhöz, Mounzer munkacsoportja (19) szintén pozitív korrelációt írt le a szérum albumin, valamint a gelszolin szintek tekintetében politraumatizált betegekben.

Vizsgálatunkban, Mounzer munkacsoportjához (19) hasonlóan, kisebb szérum aktin szintet mértünk szepszisben, mint Lee és munkatársai (21). Míg Lee munkacsoportja a szeptikus betegek 81%-ában detektált plazma aktint, és a kontroll egyének egyikében sem észlelt aktin pozitivitást, addig munkacsoportunk valamennyi vizsgált betegben kimutatott szérum aktint. A fenti különbséget az érzékenyebb aktin kimutatási technikánk is magyarázhatja.

Tanulmányunkban, a szeptikus betegekhez hasonló korú és nemű kontroll egyéneket vontunk be, ellentétben Lee munkacsoportjával (21), akik csak egészséges és fiatal egyéneket vizsgáltak a kontroll csoportban.

Belsky munkacsoportjának megfigyeléséhez (15) hasonlóan, a vizsgálati periódus alatt munkacsoportunk sem észlelt szignifikáns változást a szérum aktin szinteket illetően szepszisben. A szeptikus betegek napok közti szérum gelszolin szintjében, Lee és munkatársaihoz (20) hasonlóan, nem találtunk szignifikáns különbséget, ellentétben Mounzer (19) és Wang (22) munkacsoportjának eredményeivel.

2. Módszerfejlesztés

Eredményesen validáltunk egy gyors, precíz, kis mintaigényű immunturbidimetriás módszert a szérum gelszolin szint mérésére. Ehhez részben Christensen és munkacsoportjának (31)

módszertani leírását vettük alapul. Ismereteink szerint hasonlóan gyors assay a szérumban gelszolin koncentráció meghatározására jelenleg nem elérhető.

Christensen munkacsoportja (31) korábban kidolgozott egy immunturbidimetriás módszert a szérumban gelszolin szint mérésére, ami az általunk bevezetett assay-hez képest precízebb (CV: 4%) volt, és a LOD 2,7 U/l-nak bizonyult. A gelszolin kalibrátor és kontroll instabilitása miatt azonban az assay többé nem hozzáférhető. Dahl munkacsoportja (24) egy korábbi tanulmányban a plazma gelszolin szint mérésére alkalmas immunnephelometriás assay-t írt le, azonban nem közölt a rendszerrel kapcsolatos analitikai paramétereket.

Kísérleteinkben a szérumban gelszolin stabilitása megfelelő volt a 10 napos, +4°C-on végzett vizsgálat, és az 5 fagyasztási/olvasztási ciklus során egyaránt. Nem javasoljuk azonban a gelszolin szint mérését EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásgátlót tartalmazó mintavételi csőből, mivel ebben az esetben a gelszolin koncentráció a szérumban és a citrátos vérben mért értékekhez képest jelentősen csökken. Az EDTA-indukálta gelszolin szint csökkenés lehetséges okaként említhető, hogy az EDTA a nátrium-citráthoz képest erősebben köti a Ca^{2+} -t, valamint egyéb fémionokkal is kelátot képez (34), ami a gelszolin domének széteséséhez vezethet.

A szérumban Gc-globulin assay adaptálása során, Hamashima és munkatársaihoz hasonlóan (35), Bangert munkacsoportjának (33) eredményeihez képest kisebb LOD értéket kaptunk. A különbség feltehetően az eltérő reagens vak mintákból származik. Az intra-és inter-assay pontatlanság vizsgálata során Bangert munkacsoportjához hasonló eredményeket kaptunk. Hamashima és munkatársai a rendszerünkhöz hasonló intra-assay, azonban kisebb inter-assay pontatlanságot írtak le. Továbbá, az utóbb említett assay nagyobb mintaigényű volt a Bangert és munkatársai, valamint munkacsoportunk által prezentált módszerhez képest.

3. A gelszolin és Gc-globulin prediktív értékének vizsgálata kritikus állapotú betegekben

Vizsgálataink alapján a szérumban gelszolin a szepszis gyors diagnózisát segítő marker lehet. Hasonlóan eredményeinkhez, Lee munkacsoportja (20, 21) szintén nagyobb első napi szérumban gelszolin szinteket talált túlélő szeptikus betegekben a nem túlélőkhöz képest.

Nem találtunk összefüggést az első napi szérumban Gc-globulin szint és a szeptikus betegek mortalitása között, mely összhangban volt Leaf (26, 27), valamint Gressner munkacsoportjának (28) megfigyeléseivel.

Jeng és munkatársaival (25) ellentétben nem találtunk különbséget a szeptikus és a nem szeptikus intenzív osztályos betegek első napi Gc-globulin szintjében. A szeptikus betegek követése során a Gc-globulin szintek kis fokú növekedését figyeltük meg, hasonlóan Dahl munkacsoportjához (24). Az említett jelenség a Gc-globulin, mint akut fázis fehérje súlyos szöveti sérülés kapcsán megfigyelt fokozott szintézisével függ össze (23). A gelszolin szintézise ellenben szisztémás gyulladásban nem fokozódik (16), amit kutatócsoportunk, valamint Lee munkacsoportja (20) is alátámasztott.

Kutatócsoportunk vizsgálta elsőként immunturbidimetriás módszerrel a szérum gelszolin és Gc-globulin szintjét szepszisben. Korrelációs vizsgálatokkal szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a két aktinkötő fehérje között, ami a szinergisztikus aktin scavenger funkciójukra utalhat. Gressner kutatócsoportjával (28) ellentétben szignifikáns negatív korrelációt tapasztaltunk a szérum Gc-globulin, valamint a hsCRP, PCT szintek és a klinikai pontszámok között. Negatív összefüggést találtunk a szérum gelszolin és a hsCRP szintek között, amit korábbi vizsgálatunk is igazolt. Jelen tanulmányunkban, hasonlóan a korábbihoz, a szeptikus betegekhez korban és nemben illesztett, valamint alapbetegségekben hasonló kontroll csoportot vizsgáltunk annak érdekében, hogy a potenciális zavaró hatásokat kiküszöböljük.

Fontos megemlíteni, hogy egyik vizsgált aktinkötő fehérje sem specifikus szepszisre. A szeptikus állapoton túlmenően csökkent szérum gelszolin szinteket írtak le akut tüdőszérülés, politrauma, mionekrózis és akut májelégtelenség kapcsán egyaránt (16). Továbbá, csökkent szérum Gc-globulin szintet tapasztaltak májelégtelenségben szenvedő és politraumatizált sokkos betegekben (17). Mindazonáltal, mivel a szepszis egy sokarcú szindróma és nem egy definitív betegség, egyik laboratóriumi marker sem nyújthat 100%-os specificitást (4). Sokkal inkább mérvadó a szérum gelszolin és Gc-globulin szint csökkenésének mértéke és a megfelelő küszöbértékek megválasztása.

A PCT napjaink nagy szenzitivitású és specificitású gold standard szepszis markere. Mindemellett úgy gondoljuk, hogy a szérum gelszolin, aktin/gelszolin hányados és a Gc-globulin fontos, kiegészítő információt nyújt a szepszis súlyosságáról és a betegek immunstátuszáról.

VI. ÖSSZEGZÉS, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- Kidolgoztunk egy szenzitív Western blot módszert a szérumban az aktin szint meghatározására, mely további módszertani fejlesztések kiindulási pontja lehet.
- A szérumban az aktin és a gelszolin szinteket elsőként kutatócsoportunk monitorozta szimultán humán szepszisben.
- Bevezettünk egy új potenciális szepszis markert, a szérumban az aktin/gelszolin hányadost, mely az APACHE II pontszámhoz hasonlóan, szignifikáns prediktív értékkel bírt az intenzív osztályos mortalitást illetően.
- Validáltunk egy egyedülállóan gyors, kis mintaigényű, precíz assay-t a szérumban a gelszolin szint mérésére. Az új, gyors gelszolin assay az intenzív (szepszis) és a belgyógyászati (krónikus gyulladásos állapotok) ellátásban egyaránt hasznos lehet.
- Bizonyítottuk a gelszolin és a Gc-globulin szinergisztikus funkcióját, valamint a gyulladásos paraméterekkel való negatív korrelációját SIRS-ben és szepszisben, ami immunmodulátoros szerepüket feltételezi.
- A szérumban a gelszolin kiegészítő diagnosztikus és prediktív fehérje lehet szepszisben. A kritikus mértékben csökkent szérumban a Gc-globulin koncentráció ellenben szepszis sokkra utalhat.
- A szérumban a gelszolin és a Gc-globulin szint immunturbidimetriás mérése gyors, kiegészítő információt adhat a szepszis súlyosságáról.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339-46.
2. 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(6):1644-55.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10.
4. Molnar Z, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kumar A, Nierhaus A. Sepsis: Diagnostic and Therapeutic Challenges. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5786182.
5. Laszlo I, Trasy D, Molnar Z, Fazakas J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. *J Immunol Res*. 2015;2015:510436.
6. Anand D, Das S, Bhargava S, Srivastava LM, Garg A, Tyagi N, et al. Procalcitonin as a rapid diagnostic biomarker to differentiate between culture-negative bacterial sepsis and systemic inflammatory response syndrome: a prospective, observational, cohort study. *J Crit Care*. 2015;30(1):218 e7-12.
7. Schuetz P, Chiappa V, Briel M, Greenwald JL. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. *Arch Intern Med*. 2011;171(15):1322-31.
8. Poglazov BF. Actin and coordination of metabolic processes. *Biochem Int*. 1983;6(6):757-65.
9. Herman I. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5(1):48-55.
10. Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Role of plasma gelsolin and the vitamin D-binding protein in clearing actin from the circulation. *J Clin Invest*. 1986;78(3):736-42.
11. Janmey PA, Lind SE. Capacity of human serum to depolymerize actin filaments. *Blood*. 1987;70(2):524-30.
12. Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1381-5.
13. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med*. 1992;326(20):1335-41.
14. Sudakov NP, Klimenkov IV, Byvaltsev VA, Nikiforov SB, Konstantinov YM. Extracellular Actin in Health and Disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(1):1-12.
15. Belsky JB, Morris DC, Bouchebl R, Filbin MR, Bobbitt KR, Jaehne AK, et al. Plasma levels of F-actin and F:G-actin ratio as potential new biomarkers in patients with septic shock. *Biomarkers*. 2016;21(2):180-5.
16. Peddada N, Sagar A, Ashish, Garg R. Plasma gelsolin: a general prognostic marker of health. *Med Hypotheses*. 2012;78(2):203-10.
17. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(5):773-86.
18. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol*. 2002;9(2):131-6.

19. Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, Dinubile MJ. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 1):1673-81.
20. Lee PS, Drager LR, Stossel TP, Moore FD, Rogers SO. Relationship of plasma gelsolin levels to outcomes in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 2006;243(3):399-403.
21. Lee PS, Patel SR, Christiani DC, Bajwa E, Stossel TP, Waxman AB. Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PLoS One*. 2008;3(11):e3712.
22. Wang H, Cheng B, Chen Q, Wu S, Lv C, Xie G, et al. Time course of plasma gelsolin concentrations during severe sepsis in critically ill surgical patients. *Crit Care*. 2008;12(4):R106.
23. Dahl B, Schiødt FV, Rudolph S, Ott P, Kiær T, Heslet L. Trauma stimulates the synthesis of Gc-globulin. *Intensive Care Med*. 2001;27(2):394-9.
24. Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Wians F, Lee WM, Balko J, et al. Plasma concentration of Gc-globulin is associated with organ dysfunction and sepsis after injury. *Crit Care Med*. 2003;31(1):152-6.
25. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med*. 2009;7:28.
26. Leaf DE, Waikar SS, Wolf M, Cremers S, Bhan I, Stern L. Dysregulated mineral metabolism in patients with acute kidney injury and risk of adverse outcomes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):491-8.
27. Leaf DE, Croy HE, Abrahams SJ, Raed A, Waikar SS. Cathelicidin antimicrobial protein, vitamin D, and risk of death in critically ill patients. *Crit Care*. 2015;19:80.
28. Gressner OA, Koch A, Sanson E, Trautwein C, Tacke F. High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients--no enhancing effect by actin-free Gc-globulin. *Clin Biochem*. 2008;41(12):974-80.
29. 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(4):530-8.
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
31. Christensen P, Grønkjær K. Quantitative determination of human serum gelsolin. Development and validation of an automated turbidimetric immunoassay. *Clin Chim Acta*. 2005;355(Suppl):S221.
32. Magnusson B, Örnemark U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.). 2014.
33. Bangert K. Quantitative determination of human serum Gc globulin. Development and validation of an automated turbidimetric immunoassay. *Clin Chem Lab Med*. 2001;39(Suppl.):S378.
34. Wayne P. NCCLS. *Tubes and Additives for Venous Blood Specimen Collection; Approved Standard—Fifth Edition*. NCCLS document H1-A5. NCCLS. 2003.
35. Hamashima Y, Kanazawa T, Hirata A, Yamai Y, Fujihara H, Sekine K, et al. Measurement of vitamin D-binding protein in pleural fluids and sera by means of a turbidimetric immunoassay measuring system. *Clin Chim Acta*. 2002;321(1-2):23-8.

VIII. PUBLIKÁCIÓS LISTA

1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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):127-133. **IF: 2,584**
2. **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.* 2018;32(3). doi: 10.1002/jcla.22321. Epub 2017 Sep 5. **IF: 1,549**
3. **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. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis – a pilot study. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(8):1373-82. **IF: 3,556**

2. Egyéb közlemények

1. Kustán Péter, **Horváth-Szalai Zoltán**, Németh Balázs, Török Csaba, Ragán Dániel, Kőszegi Tamás, Mühl Diána: A szepszis diagnózisa napjainkban. *Magyar Epidemiológia.* 2016;XII. évf. 1-2. szám:59-66.
2. 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 (Zagreb).* 2016;26(3):421-430. **IF: 2,934**
3. 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: 3,556**
4. Tékus É, Váczi M, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Kőszegi T, Wilhelm M. Plasma Actin, Gelsolin and Orosomuroid Levels after Eccentric Exercise. *J Hum Kinet.* 2017;56:99-108. **IF: 0,798**
5. Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Mühl D. Nonconventional Markers of Sepsis. *EJIFCC.* 2017;28(2):122-133.
6. Kőszegi T, Sali N, Raknić M, **Horváth-Szalai Z**, Csepregi R, Končić MZ, Papp N, Poór M. A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2017;88 (Pt 2):153-159. **IF: 2,269**
7. Szirmay B, Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Wittmann I, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. *Bioanalysis.* 2018;10(6):377-384. **IF: 2,478**

Kumulatív impakt faktor: 19,724

3. Könyvfejezetek

1. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Kőszegi T. Laboratory diagnostics of sepsis. In: Methods for Diseases Diagnostic with Applicability in Practice. Editors: Kőszegi T, Chesca A. Lambert Academic Publishing, 2014. ISBN-13: 978-3-8473-4502-2, ISBN-10: 3847345028.
2. Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Biochemical Markers of Systemic Diseases. In: Methods for Diseases Diagnostic with Applicability in Practice. Editors: Kőszegi T, Chesca A. Lambert Academic Publishing, 2014. ISBN-13: 978-3-8473-4502-2, ISBN-10: 3847345028.
3. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Kőszegi T. New laboratory findings in sepsis. In: Laboratory techniques with applicability in medical practice. Editors: Tamás Kőszegi, Antonella Chesca. Lambert Academic Publishing, 2015. ISBN-13: 978-3-659-31724-8, ISBN-10: 3659317241.

4. Az értekezéssel összefüggő előadások, poszterek

1. Kőszegi T, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Györgyi E, Woth G, Mühl D, Kovács GL. Serum actin/gelsolin ratio: new biomarker in sepsis? A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 56. Nagygyűlése. Budapest, 2012. augusztus 30–szeptember 1. Clin Chem Lab Med. 50:(8) pp. eA1-eA46. (2012).
2. **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Új potenciális szérumbiomarkerek vizsgálata szepszisben: szabad aktin és aktin-kötő gelsolin. Tudományos Diákköri Konferencia, Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar. Pécs, 2012. április 17-18.
3. **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Új potenciális szérumbiomarkerek vizsgálata szepszisben. XVII. Korányi Frigyes Tudományos Fórum. Budapest, 2012. április 19-20.
4. **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Új potenciális szepszis biomarker: szérumbiomarker aktin/gelsolin arány. HMAA Nyári Konferencia. Balatonfüred, 2012. augusztus 18-19.
5. **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Új potenciális biomarker vizsgálata szepszisben. Tudományos Diákköri Konferencia, Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar. Pécs, 2013. február 7-8.
6. **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Új potenciális biomarker vizsgálata szepszisben. XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia. Szeged, 2013. április 2-5.
7. Kőszegi T, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Woth G, Mühl D, Kovács GL. Serum actin/gelsolin ratio: a new biomarker in sepsis? 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab). Milánó, Olaszország, 2013. április 19-23. Biochim Clin. 2013;37:(SS) p. S298.
8. **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. New potential biomarker in sepsis. 5th International Student Medical Congress in Kosice. Kassa, Szlovákia, 2013. június 26-28.
9. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Kőszegi T, Ludány A, Mühl D. New potential sepsis biomarker. 10th János Szentágotthai Transdisciplinary Conference and Student Competition. Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Pécs, 2013. november 4-5.
10. **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Mühl D, Kustán P, Bugyi B, Kőszegi T. Serum actin and gelsolin: new biomarkers in sepsis? IFCC WorldLab Istanbul 2014. Isztambul, Törökország, 2014. június 22-26. Clin Chem Lab Med. 2014; 52 (SS) p. S1365.

11. **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. Portoroz, Szlovénia, 2014. augusztus 23-29.
12. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Kőszegi T. Unusual protein markers of sepsis: serum actin and gelsolin. XX. Korányi Frigyes Tudományos Fórum. Budapest, 2015. március 12-13.
13. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Kőszegi T. Promising markers of sepsis: serum actin and gelsolin. XIV. International Congress of Medical Sciences (ICMS), Sofia. Szófia, Bulgária, 2015. május 7-10.
14. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Mühl D, Kőszegi T. Nem szokványos szepszis markerek: szérum aktin és gelsolin. Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság (MAITT) 43. Kongresszusa. Siófok, 2015. május 28-30. Aneszteziológia és Intenzív Terápia. 2015;45:(suppl.1.) p. 41.
15. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Unusual biomarkers in serum and urine of septic patients. 21st IFCC-ELM EuroMedLab Paris. Párizs, Franciaország, 2015. június 21-25. Clin Chem Lab Med. 2015;53 (SS) p. S547.
16. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Mühl D, Kőszegi T. New protein biomarkers in sepsis. International CEEPUS Summer School on Complex Diseases, Portoroz. Portoroz, Szlovénia, 2015. július 23-29.
17. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Szirmay B, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Serum Gc globulin and gelsolin as sepsis markers. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése. Szeged, 2016. augusztus 25-27. Clin Chem Lab Med. 2016;54:(10) p. eA200.
18. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Szirmay B, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Synergistic, predictive protein markers in sepsis: serum Gc globulin and gelsolin. 4th Joint EFLM-UEMS Congress, Warsaw. Varsó, Lengyelország, 2016. szeptember 21-24. Clin Chem Lab Med. 2016;54:(10) p. eA365.
19. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Szirmay B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Serum Gc globulin and gelsolin as potential early predictors of sepsis. 22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens. Athén, Görögország, 2017. június 11-15. Clin Chem Lab Med. 2017;55:(s1) p. S585.
20. **Horváth-Szalai Z**, Kustán P, Szirmay B, Mühl D, Kőszegi T. Aktinkötő fehérjék szepszisben. III. Mediterrán Intenzív Randevú (MIRA). Pécs, 2017. október 20-21.

5. Egyéb előadások, poszterek

1. Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Kőszegi T, Mühl D. Urinary orosomuroid and sepsis. 10th János Szentágotthai Transdisciplinary Conference and Student Competition. Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Pécs, 2013. november 4-5.
2. Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Kőszegi T, Mühl D. Vizelet orosomuroid szepszisben. Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság 42. Kongresszusa. Siófok, 2014. május 22.
3. Kustán P, Ludány A, Mühl D, **Horváth-Szalai Z**, Kőszegi T. Urinary orosomuroid in sepsis: Laboratory approaches. IFCC WorldLab Istanbul 2014. Isztambul, Törökország, 2014. június 22-26. Clin Chem Lab Med. 2014;52: p. 1368. 1 p.
4. Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Orosomuroid in urine. A useful biomarker? International CEEPUS Summer School, Portoroz. Portoroz, Szlovénia, 2014. augusztus 23-29.

5. Tékus É, Váczi M, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Kőszegi T, Wilhelm M. Plasma actin, gelsolin levels and exercise induced skeletal muscle damage. *Compass to health: 1st International Conference on Leisure, Recreation and Tourism*. Harkány, 2014. október 16-18.
6. Tékus É, Váczi M, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Kőszegi T, Wilhelm M. Edzés hatására létrejövő mikrosérülések és a plazma aktin, gelsolin, orozomukoid koncentrációja. XII. Országos Sporttudományi Kongresszus. Eger, 2015. június 4-6. *Magyar Sporttudományi Szemle*. 2015;16:(2) p. 69.
7. 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. Portoroz, Szlovénia, 2015. július 23-29.
8. Kustán P, Szirmay B, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Miseta A, Mühl D, Kőszegi T. Urinary orosomuroid- automated immunoturbidimetric test and its clinical relevance. *The 8th Conference of PhD Students*, Marosvásárhely. Marosvásárhely, Románia, 2015. december 9-10. *Acta Med Marisiensis*. 2015;61:(7) p. 8.
9. Kustán P, Szirmay B, **Horváth-Szalai Z**, Ragán D, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Novel urinary protein markers in sepsis. *Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 58. Nagygyűlése*, Szeged, 2016. augusztus 25-27. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:(10) pp. eA199-eA200.
10. Kustán P, Szirmay B, **Horváth-Szalai Z**, Ragán D, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. *4th Joint EFLM-UEMS Congress*, Warsaw. Varsó, Lengyelország, 2016. szeptember 21-24. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:(10) pp. eA324-eA325.
11. Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Szirmay B. Urinary Orosomuroid as a Potential Diagnostic Marker of Sepsis. *13th International Medical Postgraduate Conference*, Hradec Kralove. Királyvárad, Csehország, 2016. november 24-25.
12. Kustán P, Szirmay B, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Mühl D, Kőszegi T. Monitoring of novel urinary protein markers in sepsis. *22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens*. Athén, Görögország, 2017. június 11-15. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:(s1) p. S588.
13. Szirmay B, Kustán P, **Horváth-Szalai Z**, Ludány A, Kőszegi T. Urinary cystatin-C: a new automated particle-enhanced immune turbidimetric test for the routine evaluation of kidney tubular function. *22nd IFCC-EFLM EuroMedLab Athens*. Athén, Görögország, 2017. június 11-15. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:(s1) p. S803.
14. Kustán P, Szirmay B, **Horváth-Szalai Z**, Németh B, Mühl D, Ludány A, Kőszegi T. Vizelet orosomuroid: új, gyulladáisos biomarker szepszisben. *DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban*, Pécs. Pécs, 2017. október 28.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak, aki diákkörös koromtól fogva mentorált és bevezetett a tudományos kutatás világába. Szakmai professzionalitása, kritikus gondolkodása, és embersége példaként szolgál számomra.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Ludány Andreának a tudományos kutatásban nyújtott folytonos, elengedhetetlen támogatásáért és tanácsaiért.

Köszönöm intézetvezető igazgatónk, Prof. Dr. Miseta Attila támogatását, hogy lehetőséget biztosított kutatásainkra. Köszönöm Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, hogy a Laboratóriumi Medicina Intézet mellett a Szentágotthai János Kutatóközpontban is támogatta kísérleteinket.

Köszönöm Prof. Dr. Kellermayer Miklósnak az aktin citoszkeleton vizsgálatával kapcsolatos úttörő munkásságát, ami Intézetünk számos kutatásának alapját képezte, beleértve a kutatócsoportunkét is.

Köszönöm Dr. Mühl Diána elengedhetetlen klinikai szakmai segítségét és türelmét.

Köszönöm Dr. Bugyi Beáta, Dr. Huber Tamás, valamint Dr. Vig Andrea módszertani segítségét.

Ugyancsak köszönöm Dr. Lakatos Ágnesnek az immunturbidimetriás assay beállítása terén nyújtott technikai segítségét.

Köszönöm kollégáim, Dr. Kustán Péter és Dr. Szirmay Balázs ösztönző szakmai tanácsait és barátságát.

Köszönöm Györgyi Erzsébetnek, hogy bevezetett a laboratóriumi munka rejtelmeibe és támogatta kísérleteinket. Szeretném megköszönni Rózsa Ágnes valamint Intézetünk valamennyi laboratóriumi dolgozójának segítségét is.

Hálásan köszönöm családomnak, különösen feleségemnek, hogy tanácsaikkal és szerető gondoskodásukkal segítették munkámat.