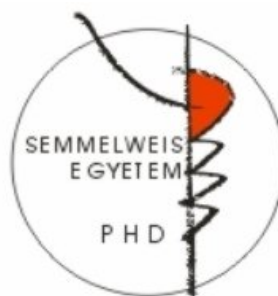


Bakteriális infekciók és a komplementrendszer működésének összehasonlítása 2-es típusú diabéteszes és cukorbetegségben nem szenvedő egyénekből

Doktori tézisek

Dr. Barkai László József

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hosszúfalusi Nóra, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Szabó János, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Várkonyi Tamás, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerő László, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Jermendy György, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Sárman Beatrix, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2019

1. Bevezetés

1.1. Diabetes mellitus és infekciók

A cukorbetegség (diabetes mellitus) egyike a vezető morbiditási és mortalitási tényezőknek. Hazánkban 2017-es populációs gyakoriságát a 20-79 éves életkorúak közöttiek esetén 9,5%-ra teszik, döntő hányaduk 2-es típusú diabéteszes csoportba sorolandó. Egyes becslések szerint a fertőzésekkel kapcsolatos kórházi kezelések 6%-ban, illetve ezen esetek halálózása 12%-ban a diabétesznek tulajdoníthatók. Az ezzel kapcsolatos epidemiológiai tanulmányok eredményei azonban nem mindig egységesek. A téma kiemelkedő fontossága ellenére hazai vizsgálati eredmények szinte alig lelhetőek fel.

Fertőzés gyakoriság diabetes mellitusban

Már kb. 1000 évvel ezelőtt kapcsolatot találtak a diabétesz és a tuberkulózis fertőzés gyakorisága között. Szoros összefüggés ismert a cukorbetegség és a malignus otitis externa, az emphysemás pyelonephritis, az emphysemás cholecystitis, a *Klebsiella pneumoniae* baktérium okozta májtályog, valamint a melioidosis kórképekkel egyaránt. Ezek a kórállapotok (bár napjainkban meglehetősen ritkák) főleg csak cukorbetegekben jelentkezik. Ugyanakkor diabéteszben nem elsősorban a fentiekkel, hanem az átlagpopulációban előforduló infekciókkal találkozunk leginkább.

Egy több, mint 500 000 cukorbeteg és ugyanennyi nem cukorbeteg adatait feldolgozó kanadai tanulmány - a vizsgált egyéves követési periódus alatt - a diabéteszeseknél magasabb relatív infekciós kockázatot talált alsó légúti (RR: 1,18), húgyúti (RR: 1,39) valamint bőr- és lágyszövet-fertőzésekre (RR: 1,81) vonatkozóan, mint a nem diabéteszes populációban. Ausztrál, Egyesült Államokból származó és kanadai adatok abban is megegyeznek, hogy a cukorbetegek infekcióhoz társuló kórházi fekvőbeteg ellátása gyakoribb a nem cukorbetegekhez képest. A cukorbetegek rosszabb fertőzési kockázatának oka nem kellően tisztázott. Vannak, akik mindezt megkérdőjelezzik: egyesek a cukorbetegek nagyobb arányú orvoshoz fordulását, mások a cukorbetegek ismétlődő fertőzéseit emlegetik, melyek szerintük torzíthatják az infekciós gyakoriságról alkotott képünket.

Infekciós mortalitás diabetes mellitusban

Bár elfogadott nézet, hogy a diabétesz ronthatja a fertőzések prognózist, az e témával kapcsolatos irodalom meglehetősen hiányos, olykor ellentmondásos. Számos vizsgálatban pozitív összefüggés mutatkozott a cukorbetegség és a fertőzések kapcsán bekövetkező mortalitás, valamint az infekció miatti hosszabb kórházi tartózkodás között. Emiatt egyesek az infekciót a diabétesz szövődményeként emlegetik. Mások nem találtak halálozást illető különbséget a cukorbeteg és nem cukorbeteg között, sőt léteznek vizsgálatok, melyek ennek ellenkezőjéről, a cukorbeteg jobb túléléséről számolnak be szépszisben. A nem összefüggő adatok hátterében a beteg beválasztási kritériumok, a vizsgálatok felépítése és típusa (retrospektív vagy prospektív), a bevont egyének száma és életkora, a betegségek súlyossága, az egyes országoként eltérő terápiás protokollok (antibiotikum kezelés, diabétesz ellátás), valamint a statisztikai elemzések heterogenitása állhatnak.

1.2. Az infekciók elleni csökkent védekezőképesség diabetes mellitusban

Jelenleg is kutatás tárgya, miként befolyásolhatja a cukorbetegség a fertőzések gyakoriságot és mortalitást. Egyesek a cukorbetegséget az infekciós mortalitás független rizikófaktoraként emlegetik. Mások a diabéteszhez társuló krónikus szövődményeket, a glikációt, vagy magát a hiperglikémiát teszik felelőssé. Az emelkedett vércukrot a nem cukorbeteg rosszabb halálozási adataival is összefüggésbe hozták kórházi felvételt igénylő bakteriális infekciók során, ez cukorbetegben is a hiperglikémia fontosságát hangsúlyozhatja. A Fremantle Diabetes Study ezzel szemben nem talált egyértelmű kapcsolatot a diabéteszesek fokozott infekciós rizikója és a HbA_{1c} között.

Eltérő kórokozó spektrum diabetes mellitusban

Számos adat szól a cukorbeteg infekcióinak eltérő kórokozó spektrumáról, agresszívabb ágensek jelenlétéről. Húgyúti infekció esetén nagyobb arányban fordulnak elő *Klebsiella*, *Aerococcus*, B csoportú *Streptococcus*, valamint *Proteus* és *Enterococcus* törzsek, mint a nem cukorbeteg hasonló típusú fertőzéseiben. Az *E. coli* jobban

kötődhet a diabéteszesek uroepithelsejtjeihez azok glikációja miatt. Egyes közlemények fokozott antibiotikum (ofloxacin és cefixim) rezisztenciáról számolnak be baktériumtípustól függetlenül, és elterjedtebb az aszimptomatikus bacteriuria. Légúti fertőzésekkel kapcsolatosan leírták, hogy a *Pneumococcus* gyakrabban okoz bacteriaemiát, továbbá olyan kórokozó is állhat a háttérükben, mely nem cukorbetegekben meglehetősen ritkán fordul elő (pl. *Streptococcus agalactiae*). Lágyrész infekciókat tekintve a diabéteszes láb mára egy önálló klinikai entitássá vált. Általában polimikróbás fertőzésként jellemezhető, a leginkább gyakori Gram-pozitív aerob kórokozók mellett nagy számban fordulhatnak elő Gram-negatív és anaerob patogének is. Gondolni kell továbbá MRSA-ra és egyéb multirezisztens törzsekre.

A megváltozott immunválasz diabetes mellitusban

A szervezet kórokozó ágensek elleni védelmében az ún. „barrier” védelmi mechanizmusok (intakt bőr és nyálkahártyák), a sejtes és a humorális immunitás, a citokin és kemokin produkció és a reaktív oxigén gyökök vesznek részt. Cukorbetegknél ezen szintek mindegyikének valamilyen szintű diszfunkcióját leírták. Ismert a neutrofil granulociták integrin és az endotélium adhézios molekuláinak megnövekedett expressziója, mely szerepet játszik a neutrofilek fokozott adhézios képességében (A glükóz önmagában is képes az endotél sejtek ICAM-1 expresszióját stimulálni). A kemotaxisal kapcsolatos eredmények némiképp megoszlanak, ám úgy tűnik, az is zavart szenved diabétesz kapcsán. A neutrofilek fagocitózisa indirekt módon, a csökkent opszonizáció eredményeként romlik. A bekebelezett baktériumok elpusztítása („intracellular killing”) alapesetben szuperoxid anionokkal és más szabadgyökökkel történik. Diabéteszben számos kórokozóra nézve ennek a folyamatnak is leírták már a defektusát (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*), mely a glikémiás kontrollal párhuzamosan javulni képes. Egyes eredmények csökkent degranulációról, valamint a citokin és kemokin gének alacsonyabb expressziójáról számoltak be. A monocitákról leírták károsodott kemotaxisukat, fagocitózisukat és fokozott adherenciájukat, erőteljesebb intracelluláris killing mechanizmusuk a toxikus szabadgyökök fokozott termelése révén pedig akár sejtkárosodáshoz is vezethet. Főleg 1-es típusú cukorbetegekben találtak csökkent limfocita transzformációs választ. Ezen

túlmenően cukorbetegekben ismert a T-sejtek antigénre adott károsodott proliferációja is. A megváltozott humorális immunitáshoz kapcsolódik a neutrofilek fent már említett fagocitózisának csökkent opszonizáció révén való károsodása, de a rossz HbA_{1c}-vel rendelkező 1-es típusú cukorbetegek alacsonyabb immunglobulin (IgG) szintjeit, és az IgG nem enzimátikus glikációját (mely az antigén-antitest kapcsolódás gátlását okozhatja) is kimutatták. Nem cukorbeteghez viszonyítva alacsonyabb agglutinin választ találtak tífusz elleni vakcina, és csökkent antitest választ többek között hepatitis A, diftéria, hepatitis B, sőt egyesek influenza vakcina oltását követően is.

A komplementrendszer idáig főleg a cukorbeteg szövődményei kapcsán került előtérbe, a diabéteszesek infekcióiban való lehetséges szerepe kevésbé ismert. Egyik kulcselemének, a C3-nak emelkedett koncentrációját írták le elhízáshoz társuló hiperinzulinémiában (melyek 2-es típusú cukorbetegségben jelen vannak), továbbá feltételezik, hogy a cukorbeteg csökkent opszonizációs képessége a C3 glikációjával kapcsolatosan történik, mivel az így nem képes a bakteriális felszínhez kötődni. A C5 és C8-as komplementek emelkedett szintjeit találták MODY típusú diabéteszben. Egy lehetséges magyarázat mindezen eltérésekre a glikált immunglobulinok komplementrendszerre gyakorolt aktiváló hatása. *In vitro* eredmények alapján az emelkedett glükóz koncentráció a klasszikus és az alternatív komplement aktivációs útvonalakra úgy tűnik, hogy nincs hatással, azonban a mannózkötő fehérje- (MBL) mediált lektin útvonal esetén csökkent aktivációt találtak.

1.3. A komplementrendszer és működése

A komplementrendszer a veleszületett humorális immunitás részeként egy a vérben és más testnedvekben többnyire inaktív formában jelen lévő glikoproteinekből álló kaszkárendszer. Fiziológiásan megfelelő inger hatására, szabályozott proteolízis révén képes aktiválódni és hatását kifejteni. A veleszületett immunitás részeként aspecifikusan, azaz T-sejtek és antitestek jelenléte nélkül is képes aktiválódni. Újabb adatok szerint a komplementrendszer mindezekén túl fontos szerepet játszik az adaptív immunitással való kommunikációban, illetve a patogének T és B sejtek általi eliminálásában és az immunológiai memória kialakításában is.

Főbb hatásai a lízis (vírusok, baktériumok, gombák, protozoonok, bizonyos sejtek „feloldása”), az opszonizáció (veszélyes antigének komplement fehérjék általi megjelölése, mely így a fagocitózist segíti elő), a gyulladáshoz vezető reakció kialakítása (inflammatorikus sejtek toborzása, migrációjuknak valamint aktivációjuknak elősegítése), az immunkomplexek és sejttermelékek eliminálása, valamint az alvadási, a fibrinolitikus és a kinin/kallikrein rendszerekkel való kapcsolódás és azok regulációja.

A komplementrendszer és aktivációs útvonalai

A komplementrendszer hatékony működése fontos szerepet játszik a veszélyes ágensek eltávolításában, ugyanakkor ez a folyamat a saját szervezetet is károsíthatja. Kulcsfontosságú ezért a saját-nem saját antigén elkülönítése, amiben az úgynevezett patogén-asszociált-, valamint a stressz- vagy veszély-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern, DAMP: Damage/Danger-Associated Molecular Pattern) játszanak szerepet. PAMP-ok a mikrobákra jellemző általános mintázatok (pl. baktérium felszínén lévő szénhidrátstruktúra, LPS), DAMP-ok pedig a stressz hatására megjelenő struktúrák (pl. sejtek nekrozisa vagy sérülése során kiszabaduló DNS, intracelluláris fehérjék). Ezeket a molekuláris mintázatokat az immunrendszer számos sejtjén, makromolekuláján jelen lévő mintázat felismerő molekulák és receptorok (PRM: Pattern Recognition Molecule, PRR: Pattern Recognition Receptor) képesek azonosítani és ezáltal az immunválaszt beindítani.

A komplementrendszer lényegében három útvonalon keresztül képes aktiválódni: 1.) Klasszikus út, 2.) Lektin út és 3.) Alternatív út. A C3 komplement enzimátikus hasítása és annak ezáltal bekövetkező aktivációja kulcsfontosságú, amit az egyes komplement útvonalak során eltérő módon kialakuló, különböző struktúrájú, de azonos funkciójú C3-konvertázok katalizálnak. A három reakcióút ettől a ponttól összekapcsolódik egy negyedik, végső közös (terminális vagy lítikus) útvonallá, melynek végén létrejön az úgynevezett terminális komplement komplex (TCC), ami a lízisért felelős.

A klasszikus útvonal aktiválása antitest-antigén komplexek, CRP, XII véralvadási faktor, vírusok és mycoplasmák, intracelluláris komponensek révén történhet. A C1 komplex antigéhez való kötődését követően C4 majd C2 hasítás történik, a létrejövő C4b2a-t nevezzük a klasszikus útvonal C3-konvertázának. A C3 hasítás kapcsán kialakul a klasszikus út C5-konvertáza, mely a TCC képződés során bír fontos szereppel. A „melléktermékként” keletkező molekulák anafilatoxinként viselkedhetnek, illetve részt vehetnek az opszonizációban. A C4 aktiváció melléktermékeként (klasszikus és lektin út esetén) C4d molekula keletkezik, melynek biológiai funkciója ismeretlen, stabilitása miatt azonban lehetőséget ad a C4 aktiváció jellemzésére. Emiatt a C4d-nek fontos szerepe van a komplement diagnosztikában.

A C1-észteráz inhibitor (C1-inhibitor) szerin-proteáz gátló működéssel bíró fehérje, mely az aktivált C1 komplexen és a lektin úton fejt ki hatását. Emellett fontos gátló szereppel bír a kinin-kallikrein, a véralvadás (aktivált XII-es faktoron keresztül), valamint a fibrinolysis rendszereire is.

A lektin útvonal nevét a folyamat iniciátorairól, a lektinekről kapta: mannózkötő lektin (MBL), fikolin-1, fikolin-2, fikolin-3, kollektin-10 és kollektin-11. Ezek a PRM-ek a mikróbák felszínén lévő oligoszacharid oldalláncokat képesek megkötni és ezáltal aktiválni a lektin komplement útvonalat. A lektinek szerin-proteáz tulajdonságú effektorokat, az MBL-asszociált szerin-proteázokat (MASP) képesek aktiválni. A MASP-ok a nevüket az MBL-hez való kapcsolódásuk után kapták, azóta azonban más lektinekről is kiderült, hogy képesek a MASP-okkal komplexeket alkotni. Egyes tanulmányok a fikolin-3-at tekintik a lektin útvonal legerősebb aktivátorának. A MASP-1 és a MASP-2 a lektin út aktivátorai, a C4 és C2 hasítás révén C3-konvertáz létrejöttében játszanak szerepet. A folyamat innentől a klasszikus útnál leírtakhoz hasonlóan folytatódik. A MASP-3 a lektin útvonalon regulátor/inaktivátor szerepet tölt be, újabban továbbá alternatív utat aktiváló funkcióját is leírták. A C1-inhibitor a már említett, a lektin utat reguláló szerepét a MASP-2-n keresztül fejt ki.

Az alternatív útvonal kis mértékű aktiválódása normál esetben is megtörténik a C3 molekula spontán hidrolízise révén, melynek eredményeként C3b képződik. A folyamatot LPS, és „idegen” (szialosavtól megfosztott) felszínek fokozhatják. A C3b B- és D-faktoriall való interakciója kapcsán létrejön az alternatív út C3-konvertáza. A C3-konvertáz további

C3 molekula hidrolízisére képes egy önerősítő folyamatot generálva, amit amplifikálódásnak nevezünk. Az ennek kapcsán keletkező komplex (C3bBbC3b) az alternatív út C5-konvertáza.

A különböző utakon kialakult C5-konvertáz enzimek a C5-nek a C5a-ra és C5b-re való fragmentációját végzik. A C5a igen erős anafilatoxin. A C5b C6-ot, C7-et, C8-at és C9-et köt kialakítva a TCC-t. A TCC létrejöhet a lizálandó ágens felszínén: membránkárosító komplex (MAC), vagy leválhat arról, és a keringésből szolubilis formában válhat kimutathatóvá (sC5b-9).

2. Célkitűzés

Megválaszolendő kérdések:

1. Van-e különbség a területen szerzett, bakteriális infekció miatt belgyógyászati fekvőbeteg osztályon hospitalizációt igénylő 2-es típusú cukorbeteg és nem cukorbeteg között az alábbi szempontok tekintetében:
 - a. az infekció helye,
 - b. a kórokozó spektruma,
 - c. a kórházon belüli és a felvételt követő 3 hónapos mortalitás?

2. Van-e különbség a komplementrendszer működésében az infekció alatt a területen szerzett, bakteriális infekció miatt belgyógyászati fekvőbeteg osztályon hospitalizációt igénylő 2-es típusú cukorbeteg és nem cukorbeteg között:
 - a. Eltér-e a komplement útvonalak elemeinek koncentrációja és az útvonalak funkcionális aktiválódása a két csoportban?
 - b. Összefügg-e a komplementrendszer működése egyes klinikai paraméterekkel és a halálozással?

3. Módszerek

3.1. A vizsgálat felépítése

Prospektív, obszervációs vizsgálatunkba közösségben szerzett bakteriális infekció klinikai diagnózisa miatt hospitalizált, 18 éves életkort betöltött betegeket válogattunk be konzekutív módon. A betegeket két csoportra osztottuk a 2-es típusú cukorbetegség WHO kritériumok szerinti megléte (T2DM) és hiánya (ND) alapján. A statisztikai power-analízis alapján célunk mindkét csoportba 200-200 beteg bevonása volt. Bármely hematológiai, onkológiai vagy immunológiai alapbetegség a vizsgálatból való kizárást eredményezte. A betegek utánkövetése során a kórházba kerüléstől számított 3 hónapos időtartamban bekövetkező halálozást elemeztük. A vizsgálati protokollt a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB 396/2013-31584/2013/EKU) engedélyezte.

A betegek kórlapjait és orvosi dokumentumait rögzítettük. Minden, a kutatásban résztvevő esetén regisztráltuk az általános klinikai, a fertőzésre, valamint a hospitalizációra vonatkozó jellemzőiket, és meghatároztuk az általános, a vércukor és glikációs paraméterekre vonatkozó laboreredményeiket, komplement paramétereiket.

3.2. A komplement és rutin klinikai laboratóriumi paraméterek meghatározása

Mindkét csoport esetén szérum, EDTA-antikoagulált és nátrium-citrát-antikoagulált plazma mintákat gyűjtöttünk a bentfekvés első 3 napjában. A komplement paraméterek meghatározására szánt vérminták esetén a sejteket a felülúszóiktól centrifugálással elkülönítettük (2000x g), majd az egyenlő részekre osztott szérum és plazma mintákat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

A fikolin-3-mediált lektin (F3-LP), az MBL-mediált lektin (MBL-LP) és az alternatív (AP) komplement útvonalak aktiválhatóságának vérszérumból való funkcionális meghatározása az *in vitro*, szelektíven aktivált útvonalak során keletkezett terminális komplement komplex koncentrációjának mérésével történt. Ehhez kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitéket használtunk a gyártó utasításai szerint (Wieslab, Eurodiagnostica, Malmö, Svédország). Referencia intervallumok az egészséges

donorokból származó minták eredményei alapján: F3-LP: 25-130%, MBL-LP: 30-130%, AP: 70-125%. A klasszikus útvonal aktiválhatóság (CP) szérumbeli meghatározása (referencia érték: CH50 48-103 U/ml) laboratóriumunk standardizált juh-eritrocita hemolitikus titrációs tesztjével történt. Fontos, hogy ezen vizsgálatok a vérminta reziduális, azaz maradék komplement aktiválhatóságát mérik, tehát csökkent *in vitro* érték fokozott *in vivo* aktivációra/konzumpcióra utal.

A fikolin-1 (F1), fikolin-2 (F2), fikolin-3 (F3) és MBL szérumbeli koncentrációk mérése standardizált ELISA technikával, szendvics-módszer elvén történt. Az ELISA lemezeket az egyes fehérjékre specifikus monoklonális ellenanyagokkal vontuk be, majd a minták inkubációját követően biotinilált ellenanyagokat alkalmaztunk, végül a detektáláshoz streptavidin/HRP komplexeket használtunk. Referencia intervallumok: F1: 10–1890 ng/mL, F2: 1,00–12,20 µg/mL, F3: 3–54 µg/mL, MBL: 0–5000 ng/mL. A vérszérumok komplement C3 és C4 koncentrációk meghatározása turbidimetriás módszerrel (Beckman Coulter, Brea, CA), a C1-inhibitor (C1-észteráz inhibitor, C1-inh.) antigén szintje radiális immundiffúziós módszerrel, poliklonális kecske anti-humán C1-inhibitor (Quidel, San Diego, CA, USA) segítségével történt. Referencia értékek: C3: 0,90–1,80 g/L, C4: 0,15–0,55 g/L, C1-inh.: 0,15–0,30 g/L. A C4d és az sC5b9 szintjeinek mérése kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitékkel (Quidel, San Diego, CA, USA) történt. Referencia intervallumok: C4d: 0,70–6,30 µg/mL, sC5b-9: 110–252 ng/mL.

A CRP-t (hsCRP) turbidimetriás módszerrel (Beckman Coulter, Brea, CA), a többi klinikai labor paramétert Beckman Coulter (Brea, CA) vagy Cell-Dyn 3500 hematology analyzer-rel határoztuk meg. A vércukrot hexokináz assay-vel, a fruktózamin szinteket Roche Fructosamine kolorimetriás kittel (nitrotetrazolium blue chloride, Beckman Analyzer AU680, referenciaszint: 205-280 µmol/l), a HbA_{1c}-t ioncsere nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC, referenciaszint: 4,0-6,0%) határoztuk meg. A Késői glikációs végtermékeket (AGE) a bőrből, noninvazív autofluoreszcens technika (AGE Reader mu, DiagnOptics) segítségével adtuk meg.

3.3. A szepszis és a társbetegségek definiálása, statisztika

A szepszist a SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) kritériumok alapján definiáltuk: 1. testhőmérséklet $>38^{\circ}\text{C}$ vagy $<36^{\circ}\text{C}$, 2. szívfrekvencia $>90/\text{perc}$, 3. légzésszám $>20/\text{perc}$ vagy artériás $\text{PCO}_2 <32 \text{ Hgmm}$, 4. fehérvérsejtszám $>12000/\text{mm}^3$ vagy $<4000/\text{mm}^3$. A társbetegségeket a Charlson Komorbiditás Index (CCI) kalkulálásához szükséges pontrendszer alapján adtuk meg. A CCI a betegek (társ)betegségeit a pontozási skála alapján összesítve képes a 10 éves túlélésüket %-os érték szerint megbecsülni. A két csoport komorbiditásának összehasonlíthatósága végett meghatároztuk CCI pontjainak átlagát az alábbi faktorok figyelembevételével: az anamnézisben szereplő miokardiális infarktus, pangásos szívelégtelenség, perifériás érbetegség, stroke/TIA, demencia, COPD, peptikus fekély, májelégtelenség, hemiplégia, veseelégtelenség és AIDS betegség. A T2DM csoport CCI pontjaiba a cukorbetegségből adódó értékeket nem számoltuk bele.

A statisztikai számításokat GraphPad Prism 5 (Graphpad Software, USA, www.graphpad.com) szoftver segítségével végeztük. A folyamatos változókat median és 25-75% percentilisben, a kategorikusakat N; %-ban adtuk meg. A két független csoport közti különbséget Mann-Whitney, Fisher egzakt teszttel vagy khi-négyzet próbával kalkuláltuk. A változók közti összefüggést Spearman korreláció segítségével adtuk meg. Minden statisztikai analízis kétoldali (two-tailed) volt, a szignifikancia határa $p=0,05$.

4. Eredmények

4.1. Klinikai eredmények

A 205 T2DM és 202 ND beteg általános klinikai és laboratóriumi jellemzőiben, életkor és nembeli megoszlásukban, valamint a komorbidításokat jellemző Charlson Komorbiditás Indexükben (CCI) nem találtunk eltérést. A fertőzést jellemző klinikai laboratóriumi eredmények (CRP, PCT, fehérvérsejtszám) mindegyike meghaladta a felső a referencia határt. A szepszis prevalencia T2DM esetén 56%, ND során 61% felett volt. A két csoport között különbséget egyik paraméter esetén sem találtunk.

Az infekciók anatómiai lokalizáció szerinti jellemzése

A fertőzéseket a lokalizáció szerint négy csoportra osztottuk: légúti, húgyúti, bőr és lágyrész (SSTI) és egyéb infekciók. A leggyakoribb típus a cukorbetegben a bőr- és lágyrész-fertőzés (37,1%), nem cukorbetegben a légúti infekció volt (37,1%). Ezeket mindkét csoportban a húgyúti infekciók követték (31,2% vs. 31,7%). A két betegcsoport egyes infekció típusait összehasonlítva T2DM betegeknél a bőr- és lágyrész-lokalizációjuk nagyobb, míg a légúti infekciók kisebb arányban fordultak elő, mint az ND csoportban (37,1% vs. 22,8%, $p=0,0017$ az SSTI-re, 22,4% vs. 37,1%, $p=0,0024$ a légútira vonatkozóan). Húgyúti és egyéb fertőzések előfordulását illetően nem találtunk eltérést a két csoport között.

Kórokozó spektrum és mikrobiológiai eredmények

A betegek tüneteinek megfelelően vett mikrobiológiai tenyésztési (hemokultúra, vizelet- és sebváladék-tenyésztés) eredmények a cukorbetegek 55,1%-nál és a nem cukorbetegek 48,5%-nál bizonyultak pozitívnak. A kórokozókat Gram-festés szerint csoportosítottuk: csak Gram-pozitív (Gram+), csak Gram-negatív (Gram-), és Gram+ és Gram-kórokozókat egyaránt tartalmazó alcsoportok. A Gram+ és Gram- kórokozókat egyaránt tartalmazó tenyésztések száma a T2DM csoportban magasabb volt, mint a nem cukorbetegéknél (pozitív tenyésztések 23,1%-a vs. 9,2%-a, $p=0,0089$), ezt a különbséget infekció helyét tekintve leginkább a bőr- és lágyrész-fertőzések okozták (23/76 vs. 5/46, $p=0,0149$).

A húgyúti infekciók elemzése során a patogéneket a pozitív vizelet és/vagy hemokultúra tenyésztések alapján az alábbi csoportokra osztottuk: csak *Escherichia coli* (*E. coli*), csak *Klebsiella* törzsek, egyéb monopatógenes, és polimikróbás. A polimikróbás csoportba azon tenyésztési eredmények kerültek, melyekből több, mint egy uropatógen tenyésztett ki. Az összes pozitív tenyésztési gyakoriságot illetően nem találtunk különbséget a T2DM és ND csoport között (73,4 vs. 82,8%, NS). A T2DM csoport polimikróbás infekciói nagyobb arányban fordultak elő, mint ND esetén (34% vs. 15,1%, $p=0,0335$).

Halálozások

Sem a bentfekvéskori, sem a felvételt követő 3. hónapos mortalitásban nem találtunk eltérést a két csoport között (10,7% és 19,0% a T2DM vs. 9,9% és 20,8% az ND betegek esetén). Vezető halálozás a T2DM esetén a bőr- és légyszív-fertőzés (23,7%), nem cukorbetegknél pedig a légúti fertőzés (17,4%) volt.

4.2. Komplement eredmények

A vizsgálati csoportok komplement paramétereinek összehasonlítása

Ahhoz, hogy a komplementrendszerrel széleskörű, részletes képet alkosshassunk, megmértük a lektin út szénhidrátfelismerő molekulák (fikolin-1,-2,-3, és MBL), a központi komplementek (C3, C4), a klasszikus és lektin út aktivációs termékének (C4d) és a komplement aktiválódást teljességében jellemző terminális komplex (sC5b-9) koncentrációját. Meghatároztuk továbbá a fikolin-3-mediált (F3-LP) és az MBL-mediált lektin út (MBL-LP), valamint a klasszikus (CP) és az alternatív (AP) komplement út funkcionális aktiválhatóságait.

A mindkét betegcsoportnál talált magas sC5b9 koncentrációk erős komplement aktivációra utalnak az fertőzés alatt, a T2DM esetén azonban az ND csoporthoz viszonyítva kevésbé emelkedett (457 vs. 516 ng/mL, $p=0,0022$) terminális út aktiválódást tapasztaltunk. A komplement aktivációs útvonalak közül a klasszikus esetén (CP) nem találtunk különbséget a két csoport között. Ezzel szemben a cukorbetegnek F3-LP és AP aktiválhatóságai *in vitro* magasabbak voltak, mint a kontrollokéi (64 vs. 45%, $p=0,0354$ és 75 vs. 28%, $p=0,0013$). Kulcsfontosságú hangsúlyozni, hogy ezen *in vitro* értékek a reziduális, azaz maradék komplement aktiválhatóságot jelentik, vagyis alacsonyabb *in vivo* aktivációra és/vagy konzumpcióra utalnak. A diabéteszesek (*in vivo*) gyengébb F3-LP és AP aktivációja nem az eltérő szénhidrátfelismerő molekulák vagy központi komplementek (F1, F2, F3, MBL, C3, C4) szintjeiből fakadt, mivel ezek a T2DM csoport esetén nem voltak alacsonyabbak, mint az ND betegekéi, a C3 esetén pedig némileg még magasabb értéket is találtunk ($p=0,0482$). MBL aktiválhatóság-beli (MBL-LP) eltérést

nem észleltünk a csoportok között. A cukorbetegéknél csökkent C4d aktivációs termék szintet ($p=0,0063$) találtunk az ND csoporthoz viszonyítva, ami összefüggésben áll az alacsonyabb *in vivo* F3-LP aktivációval. Ehhez hasonlóan a T2DM csoport magasabb C1-inhibitor koncentrációi (0,30 vs. 0,27 g/L, $p<0,0001$) is csökkent F3-LP aktivációt és/vagy konzumpciót tükrözhetnek.

A konzumpciók részletesebb megértése céljából elemeztük és összehasonlítottuk a két csoport különböző komplementútjainak (CP, AP, F3-LP) párhuzamos aktivációit. A konzumpciót az egyes komplementutak referencia tartományának alsó határa szerint definiáltuk (CP: <48 U/mL, AP: $<70\%$, F3-LP: $<25\%$): „konzumpció hiányának” az ezen határral egyenlő vagy a felett lévő értékek számítottak. Az ND csoport esetén polarizált megoszlást tapasztaltunk: a betegek jelentős hányada esett a konzumpció nélküli alcsoportba (CP/AP során 38%, F3-LP/AP esetén 41%), míg szintén nagy arányban találtunk két útvonalbeli konzumpciót (CP/AP esetén 45%, F3-LP/AP során 44%). Ezzel szemben a T2DM csoportnál más eloszlás figyelhető meg: CP/AP konzumpció hiánya a betegek 42%-ában, F3-LP/AP hiánya 59%-ukban fordult elő, míg két útvonal párhuzamos aktivációja CP/AP-ra nézve csak 28%, F3-LP/AP-t tekintve pedig csak 21%-ban mutatkozott. A T2DM betegek esetében az ND csoporthoz viszonyítva szignifikánsan kisebb arányban találtunk párhuzamos konzumpciót F3-LP és AP-ra nézve ($p=0,0007$).

Mindhárom útvonalat együtt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy párhuzamos aktiváció és konzumpció az ND betegek 48%-ában, míg a T2DM egyéneknek csupán 27%-ában fordult elő; ez szignifikáns eltérésnek bizonyult ($p=0,037$). Ezt a különbséget főként a cukorbetegéknél csökkent F3-LP és AP aktivációja magyarázza.

F3-LP és AP aktiváció és konzumpció különböző infekció típusokban

Ismét kiemelendő, hogy a mérés során észlelt nagyobb *in vitro* aktiválhatóság kisebb *in vivo* aktivációra/konzumpcióra utal. A T2DM csoport ND-hez viszonyított alacsonyabb *in vivo* F3-LP és AP aktivációja (konzumpció hiánya) legkifejezettebben a húgyúti infekciónál volt megfigyelhető: F3-LP-re nézve T2DM esetén átlagosan 30%-al (67%

vs. 37%, $p=0,0456$), AP-t tekintve pedig mintegy 51%-al (73% vs. 22%, $p=0,0092$) magasabb *in vitro* funkcionális aktiválhatóságot mértünk, mint az ND csoportnál. Azon cukorbetegben, akiknek mikrobiológiai tenyésztési eredményük *E. coli* baktériumot tartalmazott mind az F3-LP (70% vs. 33%, $p=0,0286$), mind az AP aktiváció *in vivo* (87% vs. 6%, $p=0,0003$) alacsonyabbnak bizonyult (magasabb *in vitro* értékek), mint a hasonló infekcióban szenvedő ND betegekéi. A nem *E. coli*-mediált húgyúti fertőzéseknél ilyen eltérés nem látszódott.

AP-re nézve a cukorbeteg légúti infekciói esetén is gyengült aktiválódást tapasztaltunk *in vivo* (77% vs. 17%-os *in vitro* értékek, $p=0,0276$). A többi lokalizációban nem találtunk különbséget a két csoport között.

A komplement aktiváció klinikai paraméterekkel és halálózással való összefüggése

A komplement aktiváció és a klinikai, beleértve a glikációs paraméterek viszonyának meghatározására Spearman korrelációt végeztünk. Sem az F3-LP, sem az AP nem mutatott összefüggést a vércukor szinttel, a fruktózámmal, vagy a HbA_{1c}-vel, azonban a T2DM csoportban gyenge, de szignifikáns inverz korrelációt tapasztaltunk az F3-LP és a hosszútávú glikációs marker, az AGE között ($p=0,0143$, $r = -0,2765$).

Halálózásbeli különbséget nem találtunk a két csoport között, azonban a T2DM betegek F3-LP és AP aktiváció/konzumpció hiánya összefüggést mutatott a 3 hónapos mortalitással (F3-LP esetén $p=0,012$ és AP esetén $p=0,025$): míg a meghalt ND betegek esetén a CP, F3-LP és AP aktiváció a betegek 77, 62 és 76%-ában fordult elő, ez a tendencia a T2DM csoport esetén nem látszódott. Az elhunyt cukorbeteg 60%-ában megfigyelhető volt CP aktiváció és konzumpció, míg F3-LP-re nézve mindez csak 29%, AP-t illetően pedig 25% volt. Szepszist illetően komplement konzumpció előfordulásbeli különbséget nem találtunk a két csoport között.

5. Következtetések

A területen szerzett bakteriális infekció miatt belgyógyászati fekvőbeteg osztályos hospitalizációt igénylő 2-es típusú cukorbeteg és nem cukorbeteg klinikai jellemzőinek és komplement aktiválódásának összehasonlítását célzó kutatásunk érdemi konklúziói az alábbiak:

1. a.) A cukorbeteg esetén gyakoribb bőr- és lágyrész- eredetű fertőzés előfordulást tapasztaltunk a nem cukorbeteghez viszonyítva, ami a nemzetközi adatokhoz képest is nagy arányúnak mutatkozott. Mindez a primer prevenció fontosságára és hazai elégtelenségére hívja fel a figyelmet 2-es típusú cukorbetegségben.
 - b.) Kórokozó spektrumot tekintve a cukorbeteg bőr- és lágyrész-fertőzés kórokozóiaként leggyakrabban Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok együttes jelenlétét tudtuk kimutatni, ami eltérést mutat a nem diabéteszes csoport hasonló típusú infekcióihoz viszonyítva. Húgyúti fertőzés során nagyobb valószínűséggel találkozhatunk polimikróbás infekcióval a cukorbeteg körében.
 - c.) Nem találtunk különbséget sem a kórházon belüli, sem a felvételt követő 3 hónapos halálozás tekintetében az infekció miatt hospitalizált cukorbeteg és nem cukorbeteg között, mely a hasonló nemzetközi irodalmi adatok támogató bizonyítékeként szolgál. Mindkét típusú mortalitásra vonatkozóan, mindkét csoport elhunytjai között magasabb Charlson Komorbiditás Index pontokat, a nem diabéteszes csoportban ezen túlmenően magasabb életkort regisztráltunk.
2. a.) 2-es típusú cukorbetegségben bakteriális infekció alatt kevésbé emelkedett terminális komplement komplex képződést, és alacsonyabb *in vivo* fikolin-3-mediált lektin és alternatív útvonal aktiválódást tapasztaltunk a nem cukorbeteghez képest. Az MBL-mediált lektin és a klasszikus útvonal komplement aktiválódása nem különbözött a két csoport között. A fikolin-3-

mediált lektin, a klasszikus és az alternatív útvonalakra vonatkozó párhuzamos konzumpció a cukorbetegség kisebb hányadában volt kimutatható, mint a nem cukorbetegségben. Mindezek arra utalnak, hogy a 2-es típusú cukorbetegség csökkent komplement aktiválásában a fikolin-3-mediált lektin és az alternatív útvonal játszik szerepet.

b.) A cukorbetegség esetén a fikolin-3-mediált lektin és az alternatív útvonalak nem mutattak egyértelmű összefüggést a glikációs paraméterekkel. E két útvonal aktivációja/konzumpciója elmaradt a bentfekvéstől számított 3 hónapon belül elhunyt cukorbetegségben.

6. Saját publikációk jegyzéke

Megjelent közlemények összesített impakt faktora (IF): **9,856**

6.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

Barkai LJ*, Sipter E*, Csuka D, Prohaszka Z, Pilely K, Garred P, Hosszúfalusi N. (2019) Decreased Ficolin-3-mediated Complement Lectin Pathway Activation and Alternative Pathway Amplification During Bacterial Infections in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Immunol*, 10: 509. **IF: 4,716**

(*megosztott első szerzők)

Barkai LJ, Sipter E, Csuka D, Baló T, Nébenführer Zs, Máthé A, Karádi I, Pánczél P, Prohaszka Z, Hosszúfalusi N. (2019) 2-es típusú diabéteszesek és nem-cukorbetegék területen szerzett, belgyógyászati osztályos felvételt igénylő bakteriális infekcióinak klinikai összehasonlítása. *Orv Hetil*, 160(41): 1623–1632. **IF: 0,564**

6.2. A disszertáció témájától független publikációk

Kempler M, Baló T, Varga É, **Barkai LJ**, Körner A, Pánczél P, Hosszúfalusi N. (2019) Időnként semmi sem az, aminek látszik - A klasszifikáció jelentősége a cukorbetegség kezelésében négy eset kapcsán. *Diabetol Hungarica*, 27(2):73-78.

Barkai LL, **Barkai LJ**. Pancreatic and islet cell transplantation. In: Tripathi K, Saboo B (szerk.), *Sadikot's International Textbook of Diabetes*. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, London, Panama, 2019: 796-801.

Lukacs K, **Barkai LJ**, Palik E, Szabo AJ, Madacsy L, Hosszúfalusi N. (2016) Primary Hyperlipidemia, Acute Pancreatitis and ketoacidosis in an Adolescent with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Metab*, 7: 651.

Szalai B, **Barkai LJ**, Turu G, Szidonya L, Varnai P, Hunyady L. (2012) Allosteric interactions within the AT1 angiotensin receptor homodimer: role of the conserved DRY motif. *Biochem Pharmacol*, 84: 477. **IF: 4,576**