

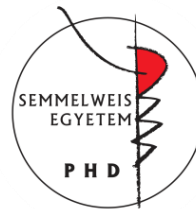
**A DPP4 enzimaktivitás és a GLP-1 hormonszintjének vizsgálata gesztációs
diabetes mellitusszal szövődött terhességből született újszülöttekben, valamint
egyek gyakori anyai génvariánsok szerepe**

Doktori tézisek

Dr. Al-Aissa Zahra

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola 2/1



Témavezető: Dr. Firneisz Gábor Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tőke Judit Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Szaleczky Erika Ph.D., osztályvezető helyettes főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kalabay László Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Farkas Klára Ph.D., adjunktus

Dr. Nagy Gyula Richárd Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2018

Rövidítések jegyzéke

AGA	Appropriate for gestational age
AT	Ausztriai terhes populáció
BMI	Testtömegindex (Body Mass Index)
CI	Konfidencia intervallum
DPP4	Dipeptidyl peptidáz-4 enzim
EFSF	European Foundation for the Study of Diabetes
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GDM	Gesztációs Diabetes Mellitus
GLP-1	Glucagon like peptide-1
HUN	Magyarországi terhes populáció
HWE	Hardy-Weinberg egyensúly
IADPSG	International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups
IDF	Nemzetközi Diabetes Szövetség (International Diabetes Federation)
IFCC	Nemzetközi Klinikai Kémiai Szövetség (International Federation of Clinical Chemistry)
KASP™	Kompetitív allél specifikus PCR genotipizáló rendszer
KZS	Köldökszínór
LGA	Large for gestational age
MAF	Minor allél frekvencia
MTNR1B	MTNR1B gén
OGTT	Orális glükóztolerancia-teszt
OR	Esélyhányados (Odds ratio)
PG	Plazma glükóz
sDPP4	Szérum DPP4
SGA	Small for gestational age
SNP	Egy pontos-nukleotid polimorfizmus (Single-nucleotide polymorphism)
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

Világviszonylatban, az IDF adatai szerint, minden 7-ik terhesség szövődik GDM-mel. Egy újabb magyar vizsgálat adatai alapján a hazai prevalenciát 8,1-14,8% közöttinek találták a diagnosztikus kritériumtól függően. [1]

A GDM a terhesség során először felismert hyperglykaemia. A terhesség alatt jelentkező diabetes leggyakoribb formája a GDM (kb. 90%), ami elkülönítendő a terhességet megelőzően diagnosztizált (pregesztációs) cukorbetegségtől és a „diabetes in pregnancy” (diabetes terhességben) kategóriától. [2] A graviditás diabetogén hatása több tényezőnek tulajdonítható, hozzájárulnak a terhesség alatt fiziológiásan bekövetkező hormonális változások, aminek következtében a terhesség 2. és 3. trimeszterében inzulinrezisztens állapot alakul ki. A csökkenő inzulinérzékenységhez társuló emelkedett inzulinigény majdnem a terhesség végéig fokozódik (34-36. hétig). GDM kialakulása azokban a terhesekben várható, akikben a terhesség és esetleg az ehhez társuló/ azt megelőzően fennálló elhízás okozta inzulinrezisztenciával, a hasnyálmirigy adaptációt jelentő béta-sejt plaszticitás nem képes megfelelően lépést tartani és a megnövekedett inzulinigényt biztosítani.

Az élettani adaptáció lehetőségét több tényező határozza meg, így ebben szerepe van az adipokin és az inkretin hormonrendszereknek, az inkretinek bontásán és inaktiválásán keresztül a DPP4-nek is, továbbá genetikai tényezőknek. Ennek megfelelően a beszűkülő adaptáció okai között is a fenti tényezőkben bekövetkező változások jönnek szóba. A DPP4-inkretin rendszer szerepéről neonatalis, GDM terhességben fellépő, szövődmények kialakulásában a vizsgálataink előtti időszakból érdemi klinikai vizsgálat nem állt rendelkezésre. Ugyanakkor az anyai kórtani jelenségek közül az *MTNR1B* gén rs10830963 variáns *G* alléljának hordozása következtében (az európai populáció közel felére jellemző a hordozás) kialakuló korai inzulinválasz károsodása már korábban leírt, de túlnyomó részben csak ázsiai vizsgálatokban megfigyelt tényező GDM kialakulásában.

2. Célkitűzések

I. DPP4-inkretin rendszer vizsgálata GDM és kontroll (75 g OGTT során normális szénhidrát anyagcseréjű) terhességből született újszülöttekben

Ezzel összefüggésben a következő célokat tűztük ki:

I/1. DPP4 KZS szérum:

- megmérjük a GDM terhességből születettek KZS vérében mért szérum DPP4 enzimaktivitást és a nem GDM terhességből születettek KZS szérum DPP4 enzimaktivitását
- amennyiben a DPP4-nek mérhető enzimaktivitása van a KZS szérumban, akkor a két csoport aktivitás értékeit egymással összehasonlítjuk

I/2. GLP-1 KZS plazma:

- ezzel összefüggésben megmérjük a GDM terhességből születettek KZS vérplazma biológiailag aktív GLP-1⁷⁻³⁶ koncentrációt és a nem GDM terhességből születettek aktív GLP-1⁷⁻³⁶ koncentrációit
- amennyiben a GLP-1⁷⁻³⁶ koncentráció mérhető KZS plazmában, a két csoport koncentrációit egymással összehasonlítjuk.

II. MTNR1B rs10830963 anyai génvariáns szerepének vizsgálata GDM-ben

Lehetőségem volt bekapcsolódni egy nagyobb volumenű nemzetközi vizsgálatba (EFSD New Horizons), amelynek célja 77, korábban 2-es típusú diabeteshez, GDM-hez vagy egyéb releváns metabolikus jelleghez asszociált génvariáns szerepének vizsgálata volt GDM kialakulásában egy osztrák-magyar terhespopulációban. A vizsgálatban való részvételem kapcsán lehetőségem adódott arra, hogy az *MTNR1B* rs10830963 génvariáns szerepére vonatkozó eredményeket magyarul a doktori tézisem kiegészítő részeként bemutassam.

3. Módszerek

1. Köldökzsínór DPP4 szérumaktivitás és aktív GLP-1⁷⁻³⁶ plazmaszint vizsgálata GDM és nem GDM terhességből született egyéneken

3.1.1. Vizsgálatba bevont személyek

A vizsgálatban résztvevő alanyokat a budapesti Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinikájáról, az I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról, majd a vizsgálat későbbi szakaszában a budapesti Szent Imre Egyetemi Oktatókórház Szülészeti és Nőgyógyászati Osztályáról vontuk be (ETT TUKEB szám: 485/PI/11., 15100-2/2011-EKU). A nemzetközi vizsgálat jellegéből fakadóan a betegek egy részét a bécsi Allgemeines Krankenhaus Szülészeti Osztályáról vonták be az EFSD vizsgálatba. Vizsgálatunkba összesen 568 (210 GDM, 358 kontroll) várandóست vontunk be a 24-28. terhességi hét között végzett 75 g OGTT-t követően, írásos tájékoztató biztosítása és a beleegyező nyilatkozat aláírását követően. Mintavétel sajnos csak kevesebb újszülöttnél volt lehetséges különböző okok miatt: beleegyező nyilatkozat visszavonása, KZS punctió elmulasztása, szülészeti szituáció adta vagy egyéb technikai körülmények. A sDPP4 meghatározására 270 (111 GDM, 159 kontroll) KZS szérum mintában került sor. A biológiailag aktív GLP-1⁷⁻³⁶ plazmaszint meghatározása céljából 112 (40 GDM, 72 kontroll) anya újszülöttjétől gyűjtöttünk KZS vérmintát. [3]

3.1.2. GDM diagnózisa és kontroll csoport

A várandósokat a terhesség 24-28. hete között végzett OGTT eredménye alapján soroltuk be GDM illetve kontroll csoportba, ahol a kontroll azt jelenti, hogy az OGTT eredmény nem kóros és a terhesség során később sem igazolódott GDM vagy „overt diabetes”.

A cukorterhelés Magyarországon és Ausztriában egyaránt 75 g-os OGTT módszerrel történt. Magyarországon az 1999-es módosított WHO kritériumrendszer szerint (éhomiai plazma glükóz (PG) $\geq 6,1$ mmol/L, 120' PG $\geq 7,8$ mmol/L), Ausztriában pedig a 2011-es IADPSG kritérium (éhomiai PG $\geq 5,1$ mmol/L, 60' PG $\geq 10,0$ mmol/L, 120' PG $\geq 8,5$ mmol/L) szerint történt a szűrés. [3]

3.1.3. Mintavételi módszerek

A maternalis vérvételek cubitalis vénából történtek. A KZS vérmintákat a szülés után azonnal, a köldökzsinór elszorítását követően a V. umbilicalisból vettük le. A DPP4 enzimaktivitás meghatározásához használt vérmintákat natív, alvadásgátló-mentes kémcsövekbe gyűjtöttük, majd az ebből, centrifugálást követően, nyert szérumot használtuk.

Az aktív GLP-1⁷⁻³⁶ meghatározása során alkalmazott vérminták gyűjtése egy speciális kémcsöbe történt, amely EDTA-t, sitagliptint és proteáz-inhibitor cocktailt tartalmazott. A plazma mintákból legfeljebb 30 percen belül centrifugálással (20 perc, 2000 rpm) különválasztottuk a plazmát, amelyet ezt követően átmenetileg -20 C°-on tároltunk. A mintákat vonalkóddal jelöltük és az etikai engedélynek megfelelően anonimizált formában tároltuk.

3.1.4. DPP4 szérum enzimaktivitás meghatározása

A DPP4 enzimaktivitás meghatározása microplate alapú kinetikus módszerrel történt 96 wellben. Wellenként 9,4 µL-nyi KZS szérum mintát használtunk fel. Szubsztrátként Gly-Pro-pNA-t (Glycin-Prolin-Paranitroanilin) használtunk. A mérések duplikátumban történtek, teljes reakcióvolumen 125 µL, a Gly-Pro-pNA tozilát (Bachem, Bubendorf, Svájc) végső koncentrációja 2 mmol/l volt, pufferként 115,6 µL, 7,6 pH, 10 mM Tris-HCl-t használtunk. A felszabaduló pNA mérés 404 nm-en, 37 C°-on, Varioskan Flash (Thermo Scientific) berendezéssel történt 7'3" időközökkel, összesen 30 perc időtartammal. Az enzimaktivitást nmol/mL/min (U/L) mértékegységben adtuk meg, amelyet a pNA hidrolízisből számoltunk ki.

3.1.5. GLP-1⁷⁻³⁶ plazma koncentrációk mérése

A GLP-1⁷⁻³⁶ ("aktív") KZS plazma koncentrációk meghatározására standard ELISA kittel került sor (Merck Millipore, MA, USA), minden mérés duplikátumban történt 100 µL KZS plazma minta felhasználásával, 2-100 pM közötti standard GLP-1⁷⁻³⁶ koncentráció alkalmazásával. A fluoreszcencia leolvasása 355 nm/ 460 nm hullámhosszon történt Varioskan Flash (Thermo Scientific) berendezéssel. A KZS vér aktív GLP-1⁷⁻³⁶ koncentrációt pmol/L mértékegységben fejeztük ki.

3.1.6. Statisztikai értékelő módszerek

A DPP4 és GLP-1⁷⁻³⁶ eredmények adataeloszlásának vizsgálatára a Shapiro-Wilks és Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmazva határoztuk meg a normalitást. Nem paraméteres Mann-Whitney U teszt segítségével hasonlítottuk össze az átlagokat és határoztuk meg a különbségeket a normál eloszlást nem mutató változók esetében, valamint kétmintás T-próbával egymástól független, normál eloszlású változók esetén. Kruskal-Wallis ANOVA és Newman-Keuls post-hoc próbát alkalmaztunk többszörös összehasonlítás, valamint Pearson és Kendall Tau tesztet a lehetséges korrelációk vizsgálata során. A Statistica (10. verzió, StatSoft) statisztikai elemző szoftver segítségével történtek a számítások.

II. *MTNR1B rs10830963 génvariáns vizsgálata*

3.2.1. Vizsgálatba bevont személyek

Az EFSD New Horizons nemzetközi program keretében 960 (vizsgálatból való kizárás és dropoutok után 820) várandós nő vizsgálatba való bevonása történt, két ország összesen három vizsgálócentrumából. A két országból (Magyarország, Ausztria) bevont személyek mindkét GDM kritériumrendszer szerint reklasszifikálva lettek. Ezt követően az esetszámok a következőképpen alakultak: módosított 99' WHO kritériumok szerint 303 GDM, 517 kontroll, IADPSG kritériumok szerint 287 GDM, 533 kontroll várandós nő lett bevonva az eset-kontroll vizsgálatba. [4]

3.2.2. DNS izolálási technika

A genomiális DNS izolálása mágneses gyöngy alapú technikával (Hamilton Robotics, Magna Starlet), DNS izoláló magTM kit (LGC) segítségével történt, összesen 200 µL EDTA-val antikoagulált vérmintából. A protokoll a gyakori technológián alapul, amely során a DNS mágneses részecskékhez kötődik, előnye, hogy gyors, könnyen automatizálható és a manuális izolálási módszerekhez képest kevesebb vérmennyiség is elegendő, illetve nagyobb mennyiségű DNS izolálható.

3.2.3. Az *MTNR1B* genotipizálás

PCR-alapú KASP genotipizáló próba (LGC Genomics) alkalmazásával valósult meg az SNP-k biállélikus elkülönítése. A Kompetitív allél specifikus PCR genotipizáló rendszer (KASP™) homogén, fluoreszcenciát alkalmazó, végpont genotipizálási technológia. A KASP genotipizáló módszer két összetevőből áll:

- SNP specifikus KASP assay mix: két különböző, allélspecifikus, forward és egy reverse primert tartalmaz
- a különböző allélspecifikus forward primereket különböző jelölőkkel látták el (pl. FAM és HEX)
- univerzális KASP Master mix: FRET kazettát és Taq polimerázt tartalmaz optimalizált buffer oldatban.

Az assay összetevői: DNS minta, KASP assay mix és KASP master mix.

A PCR első lépése az allélspecifikus primerek és a cél SNP-t tartalmazó genomiális DNS szakaszok összekapcsolódása, majd a reverz primer által a célzott régió amplifikációja. Ezt követően egy kiegészítő kópia készül az allélról. A PCR további lépéseiben az allélspecifikus szakaszok meghosszabbodnak. A FRET kazetta jelölt része komplementáris az új allélrésszel, ehhez kötődik, ezt követően a megfelelő szignál detektálhatóvá válik.

3.2.4. Statisztikai értékelő módszerek

Az *MTNR1B* genotípus eredmények társulását a bináris jelleggel (GDM beteg / nemdiabetese) logisztikus regressziós modellel, a kvalitatív jellegeket pedig lineáris regressziós modellel vizsgáltuk. Az analízist additív és domináns genetikai modellek szerint is értékeltük. Esélyhányadosokat (OR), genetikai hatásnagyságot és p-értéket számoltunk, a p-értékeket Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltuk. A Hardy–Weinberg ekvilibríumtól (HWE) való deviációt Khi négyzet próbával vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

I. Köldökzsínór DPP4 szérumaktivitás és aktív GLP-1⁷⁻³⁶ plazmaszint vizsgálat

4.1.1. Bevont betegek és újszülöttek klinikai jellemzői

Maternalis klinikai eredmények

A legfontosabb maternalis klinikai eredményeket (75 g OGTT során mért 0', 60', 120' PG, terhesség előtti BMI, átlagéletkor, terhesség alatti testsúlygyarapodás, HbA_{1c}) az 1. táblázatban tüntettük fel.

1. táblázat: Maternalis klinikai eredmények

	Időpont/Csoport	n	Átlag	95% CI
75 g OGTT plazma glükózértékek GDM csoport (mmol/L)	0'	199	5	4,91-5,09
	60'	114	9,49*	9,11-9,89
	120'	199	7,78*	7,55-8,02
75 g OGTT plazma glükózértékek kontroll csoport (mmol/L)	0'	330	4,40*	4,35-4,45
	60'	136	6,77*	6,51-7,02
	120'	330	5,48*	5,36-5,60
Terhesség előtti BMI (kg/m²)	GDM	195	27,77*	26,15-29,41
	Kontroll	326	23,49	23-23,98
Anyai életkor (évek)	GDM	210	32,85**	32,09-33,60
	Kontroll	358	31,44	30,89-32,00
Terhesség alatti súlygyarapodás (kg)	GDM	181	10,15***	8,78-11,51
	Kontroll	326	11,94	11,22-12,66
HbA_{1c} [% (IFCC egység - mmol/mol)]	Magyarország	43	5,14 (32,7)	5,03-5,25 (31,5-33,9)
	Ausztria	70	5,35 (35)	5,25-5,45 (33,9-36,1)

* $p < 10^{-4}$ (t-próba, MWU), ** $p = 0,0031$ (kétmintás t-próba), *** $p = 0,012$ (kétmintás t-próba)

Újszülött klinikai eredmények

SGA, AGA és LGA újszülöttek aránya a kontroll és a GDM csoportban

A magyar és osztrák GDM valamint kontroll csoportokban megfigyelhető SGA, AGA, LGA újszülöttek arányát a 2. táblázatban tüntettük fel.

2. táblázat: LGA, AGA, SGA újszülöttek aránya a két ország kontroll és GDM csoportjában

Magyarország (99' mWHO)	LGA (%)	AGA (%)	SGA (%)	Ausztria (IADPSG)	LGA (%)	AGA (%)	SGA (%)
GDM (n=90)	22,22	72,22	5,56	GDM (n=120)	24,17	70,0	4,17
Kontroll (n=194)	23,71	70,62*	5,67	Kontroll (n=164)	20,12	77,4*	2,44

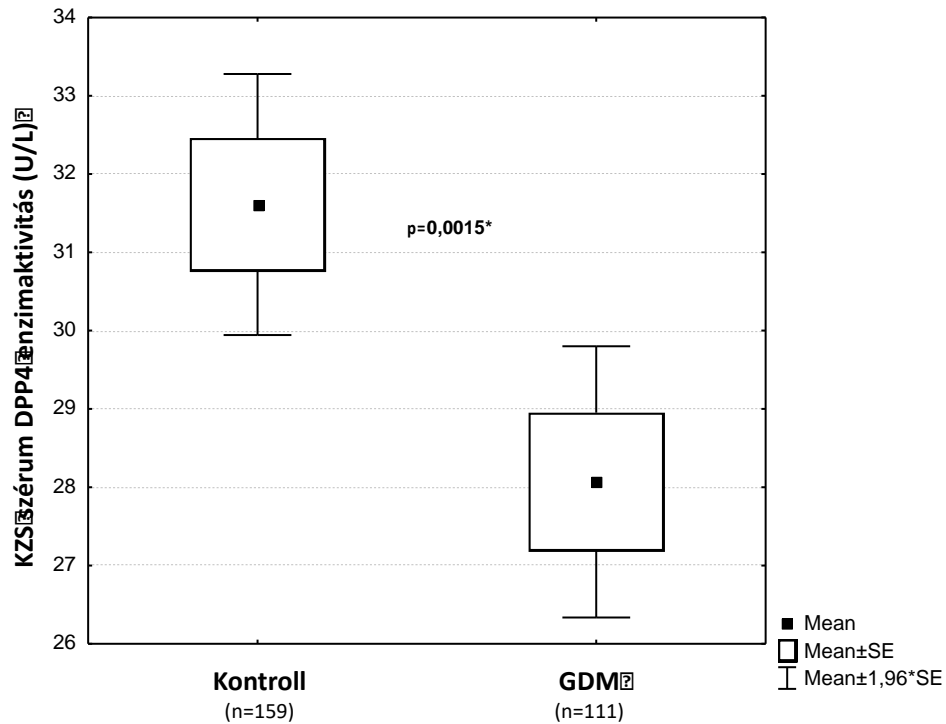
*A későbbiekben, a mintaelemszám bővülését követően (genetikai vizsgálati rész), a súlypercentilis megoszlások országok közötti eloszlásában talált szignifikáns különbség megszűnt.

C-peptid

Nem találtunk szignifikáns eltérést az újszülöttek köldökzsinórvéréből mért C-peptid érték elemzése során a kezelt GDM (átlag=1,46 ng/mL, 95% CI: 1,04-1,88 ng/mL, n=87) és kontroll (1,29 ng/mL, 95% CI: 1,16-1,43 ng/mL, n=159) csoport között (MWU teszt).

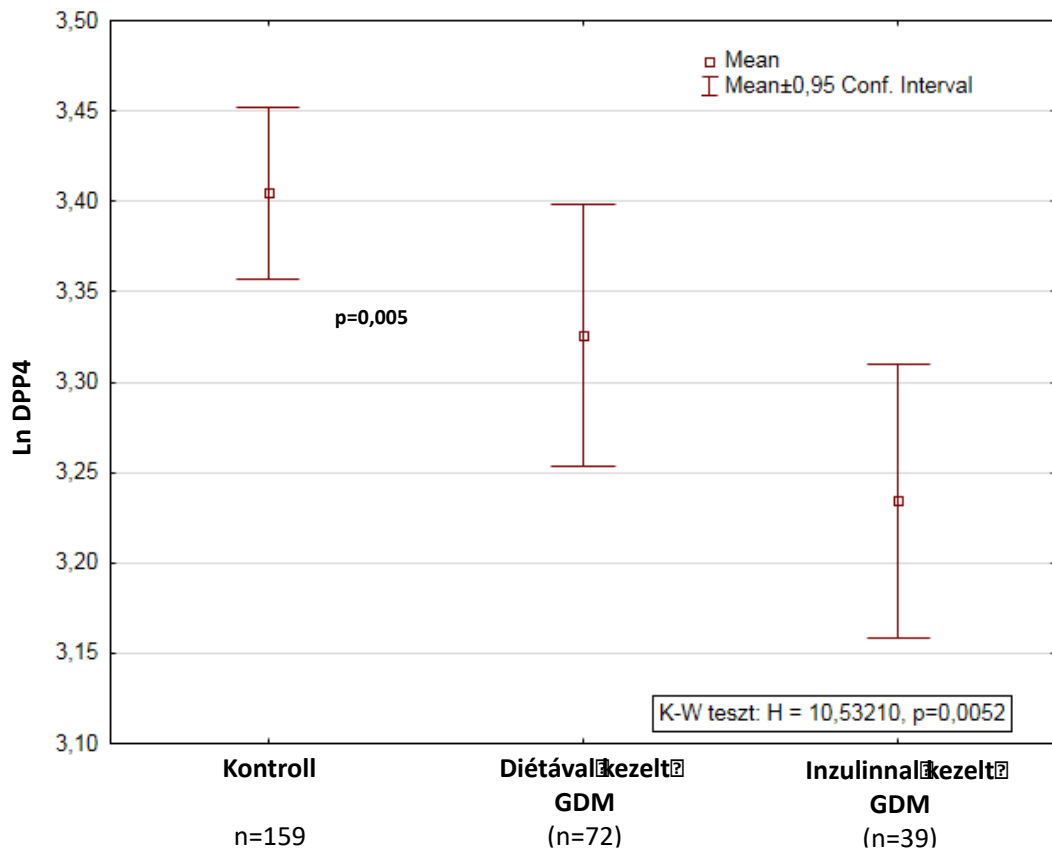
4.1.2. Köldökzsinórvér szérum DPP4 enzimaktivitás

A sDPP4 aktivitás GDM KZS szérumban (átlag=28,1 U/L (95% CI: 26,3–29,8), n=111) alacsonyabb, mint a kontrollokban (átlag=31,61 U/L (95% CI: 29,9–33,3), n=159, p=0,0015, MWU) (1. ábra). A nem diabeteses terhességből születettek KZS vérében mért sDPP4 aktivitás megközelíti egészséges felnőtt kontroll (40,3 U/l, 95% CI: 37,8-42,8) személyek szérumában detektált aktivitási értéktartományát. A statisztikai erőt is meghatároztuk a talált eltérések értelmezése során, amely 81%-osnak bizonyult. Az átlag LnDPP4 érték szignifikánsan (MWU, p=0,0015) alacsonyabb maradt a GDM csoportban (átlag=3,29) a kontroll csoporthoz (átlag=3,41) viszonyítva. [3]



1. ábra: Köldökzsínór szérumban DPP4 enzimaktivitás változása GDM és nem diabeteses terhességből született egyéneknél

A kezelés típusa szerint (inzulin terápia vagy diéta) egy alcsoport analízist végeztünk, és a következő eredményeket kaptuk: a legalacsonyabb LnDPP4 érték az inzulinnal kezelt (átlag=3,245, 95% CI: 3,17–3,32, n=39) GDM csoportban, ennél magasabb érték az inzulinnal nem kezelt GDM csoportban (átlag=3,32, 95% CI: 3,25–3,40, n=72), a legmagasabb LnDPP4 érték a kontrollokban (átlag=3,41, 95% CI: 3,36–3,45, n=158, Kruskal-Wallis, p=0,005) volt (2. ábra).



2. ábra: Köldökszínór szérumban DPP4 enzimaktivitás változása nem diabeteses és GDM terhességből született egyéneknél kezelés típusa szerint

A különböző diagnosztikai kritériumok hatásának vizsgálata céljából, a GDM és kontroll csoportokban a KZS szérumban DPP4 aktivitásában talált eltéréseket újraszámoltuk a módosított 99' WHO kritérium osztrák csoportban, illetve az IADPSG kritérium magyar populáción való alkalmazásával. A KZS szérumban DPP4 aktivitásban leírt különbségek szignifikánsak maradtak, amikor a módosított 99' WHO [GDM: n=77, átlag LnDPP4=3,29 (95% CI: 3,22-3,36), kontroll: n=171, átlag LnDPP4=3,39 (95% CI: 3,35-3,44, p=0,0048] és az IADPSG [GDM: n=71, átlag LnDPP4=3,27 (95% CI: 3,20-3,34), kontroll: n=177, átlag LnDPP4=3,4 (95% CI: 3,35-3,44), Kruskal-Wallis, Newman-Keuls post hoc, p=0,0019] diagnosztikus kritériumrendszerek szerint a betegeket újraklasszifikálva számoltuk ki az eredményeket. Az eltérő diagnosztikai kritériumoknak nem volt szignifikáns jelentőségük az GDM-es terhességből született KZS vérében leírt sDPP4 aktivitás csökkenés szempontjából. [3]

4.1.3. Köldökzsinórvér GLP-1 plazma szintek

Az aktív GLP-1⁷⁻³⁶ KZS plazma szintek az alsó mérési határ (2 pmol/L) közelében voltak, szignifikáns mértékben nem tértek el a két csoportban (GDM: n=40, átlag = 3,61 pM (95% CI: 2,96-4,28 pM, kontroll, n=72, átlag=3,43 pM, 95% CI: 3,04-3,82 pM, MWU test, p=0,6). Az aktív GLP-1⁷⁻³⁶ köldökzsinórvér plazma szintek alacsonyak voltak. [3]

II. *MTNR1B rs10830963 maternalis genotipizálás eredményei*

4.2.1. Genetikai vizsgálatba bevont terhesek klinikai jellemzői

Éhomi és 120. perces vércukorérték

A 24-28. terhességi héten mért OGTT értékek a magyar (HUN) populációban eltérést mutattak a kontroll (n=408) és GDM (n=195) csoportban: 0' plazma glükóz (PG) 4,52 mmol/L vs. 4,96 mmol/L, (GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 0,34-0,54, p<10⁻⁴), 120' PG 5,45 mmol/L vs. 8,72 mmol/L (GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 3,06-3,47, p<10⁻⁴).

A 24-28. terhességi héten mért OGTT értékek az osztrák (AT) terhespopulációban szintén eltérést mutattak a kontroll (n=183) és GDM (n=147) csoportban: 0' plazma glükóz 4,38 mmol/L vs. 5,14 mmol/L, (GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 0,63-0,87, p<10⁻⁴), 60' PG 6,80 mmol/L vs. 9,68 mmol/L (GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 2,47-3,28, p<10⁻⁴), 120' PG 5,42 mmol/L vs. 7,38 mmol/L (GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 1,61-2,30, p<10⁻⁴).

A két ország 75g OGTT értékeinek és egyéb klinikai adatainak összehasonlításakor az alábbi eltérések voltak megfigyelhetőek:

- kontroll csoportban valószínűsíthetően a diagnosztikai kirtériumrendszerek közötti különbségek következtében a 0' PG érték (HUN>AT, 4,52 mmol/L vs. 4,38 mmol/L, p<0,05) és a terhesség alatti súlygyarapodás (HUN>AT 13,80 kg vs. 9,47 kg, p<0,05) mutatott szignifikáns eltérést a két ország résztvevőit összehasonlítva

- GDM csoportban a 0' PG (AT>HUN 5,14 mmol/L vs. 4,96 mmol/L, $p<0,05$) és a 120' PG (HUN>AT 8,72 mmol/L vs. 7,38 mmol/L, $p<0,05$) értékek, valamint az anyai életkor (HUN>AT 33,7 év vs. 32,04 év, $p<0,05$) szempontjából találtak szignifikáns eltérést a magyar és osztrák vizsgálati populációk között.

BMI

Az OGTT plazma glükózértékekben talált szignifikáns eltérések mellett a terhesség előtti BMI (HUN: $n=195/408$, GDM 26,78 kg/m² vs. kontroll 23,32 kg/m², GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 2,55-4,36, AT: $n=147/183$, GDM 28,31 kg/m² vs. kontroll 23,40 kg/m², GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 2,72-7,09, $p<10^{-4}$) a várakozásnak és korábbi irodalmi adatoknak megfelelően jelentős eltéréseket mutatott a GDM és kontroll populációban mindkét országban.

Átlagéletkor

Szignifikáns eltéréseket találtak a GDM és kontroll populációban mindkét országban az anyai életkor szempontjából is (HUN: GDM 33,7 év vs. kontroll 31,25 év, GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 1,54-3,36, AT: GDM 32,04 év vs. kontroll 30,51 év, GDM és kontroll csoport közötti különbség 95% CI: 0,08-2,97, $p<0,05$).

HbA_{1c}

Általánosságban megjegyezhető, hogy a HbA_{1c} értékekből levonható következtetések limitáltak: részben a terhesség során megváltozó vörösvértest turnover miatt, részben pedig azért, mert a magyar betegeknek csak 53,1%-ban, az osztrák betegek 63,2%-ban történt HbA_{1c} szint meghatározás. A HbA_{1c} átlag értéke a magyar populációban 5,20% [33 mmol/mol, 95% CI: 5,10-5,30 (32-34)], az osztrák populációban pedig 5,30% [34 mmol/mol, 95% CI: 5,21-5,38 (33-35)]. [3]

4.2.2. Az *MTNR1B* rs10830963/G kockázati allél asszociációja a GDM kialakulásával (mint bináris jelleggel) a nemzetközi eset-kontroll vizsgálatban

A genetikai asszociációs vizsgálatot több szempont alapján is elvégeztük. Egyfelől a nagyobb nemzetközi vizsgálat keretében lehetőségünk volt mind a 77 SNP esetében a domináns és az additív genetikai modellek szerinti asszociációs vizsgálat elvégzésére a GDM kialakulásával összefüggésben. A HWE-től való deviációt Khi négyzet próbával

vizsgáltuk. Szignifikáns deviációt a mért és várt MAF-tól nem mutattunk ki a vizsgált 77 gén variánsban. Továbbá – tekintettel a két országban használt különböző diagnosztikai kritériumrendszerekre – az asszociációs vizsgálatokat a betegek újraklasszifikálását követően mindkét diagnosztikai rendszer szerint elvégeztük. Továbbá, az eredeti közleményben, az anyai életkor, valamint az életkor és egyidejűleg terhesség előtti BMI szerint korrigált asszociációs eredmények is fel vannak tüntetve mind a 77 SNP vonatkozásában. A jelen keretek között összességében a GDM kialakulásával legrobosztusabb összefüggést mutató *MTNR1B* rs10830963 génvariáns *G* kockázati alléljára vonatkozó eredmények magyar nyelvű bemutatására kaptam lehetőséget. Az *MTNR1B* rs10830963 génvariáns *G* minor allél frekvenciája (MAF) magasabb volt a GDM csoportban, mint a kontroll csoportban mindkét diagnosztikai kritériumrendszer alkalmazása esetén (IADPSG: 36% vs. 28%, m99'WHO: 36% vs. 28%; GDM vs. kontroll). Az *MTNR1B* rs10830963 genotípus a betegség kialakulására vonatkozó hatásának pontosabb jellemzéséhez a genetikai hatás nagyságát tükröző esélyhányados (OR) értékek a két diagnosztikai kritériumrendszer szerinti reklaszifikációt követően, anyai életkorral, valamint a korrall és egyidejűleg BMI-vel korrigálva ennek megfelelően az alábbiak szerint alakultak:

OGTT diagnosztikai kritériumrendszer	OR	p	Genetikai modell	Korrekción
m 99' WHO	1,67	$3 \times 10^{-3*}$	D	anyai életkor
IADPSG	1,80	$3 \times 10^{-3*}$	D	anyai életkor
m 99' WHO	1,41	5×10^{-3}	A	anyai életkor
IADPSG	1,47	2×10^{-3}	A	anyai életkor
m 99' WHO	1,64	$6 \times 10^{-3*#}$	D	anyai életkor és pregesztációs BMI
IADPSG	1,85	$7 \times 10^{-4*+}$	D	anyai életkor és pregesztációs BMI
m 99' WHO	1,39	0,012	A	anyai életkor és pregesztációs BMI
IADPSG	1,48	3×10^{-3}	A	anyai életkor és pregesztációs BMI

* Az asszociáció szignifikáns maradt Benjamin-Hochberg p-korrekción követően is ($p < 0,05$). ⁺ Statisztikai erő = 90%, [#] Statisztikai erő = 73%. D=domináns genetikai modell, A=additív genetikai modell

Az eredményekben megfigyelhetőek a következők:

Az *MTNR1B* rs10830963 genotípus és a GDM kialakulásának összefüggése tekintetében nagyobb a genetikai hatásnagyság a domináns modell szerint, mint az additív modell szerint mind az anyai életkorhoz, mind az életkor és egyidejű terhesség előtti BMI-hez való igazítást követően is. Habár ilyen mélységű elemzés a téziseim tárgyát nem képezi, összességében is megfigyelhető, hogy a GDM kialakulására a vizsgált 77 egyponos génvariáns közül az *MTNR1B* genotípusnak van a legrobosztusabb hatása (azaz a genetikai hatás nagysága a legnagyobb), továbbá az eredmények Benjamini-Hochberg p-korrekción eljárást követően is szignifikánsak maradnak és a statisztikai erő is megfelelő. [4]

4.2.3. Az *MTNR1B* rs10830963/G kockázati allél asszociációja a standard időpontban végzett 75g OGTT plazma glükóz értékekkel terhesekben

Az alábbiakban részletezett összefüggések és az ezzel kapcsolatosan leírt genetikai hatások az egész terhespopulációra vonatkozó érvényűek, ugyanis a 24-28. terhességi héten mind Magyarországon, mind Ausztriában minden várandós személyben történik 75g-os OGTT. Az *MTNR1B* rs10830963 G kockázati allél hordozásnak volt a legnagyobb hatása a vizsgált 77 SNP közül az éhomi PG értékekre (átlagos hatásérősség G kockázati allél hordozókban a CC genotípussal rendelkezőkhöz képest: 0,21 mmol/L (95% CI: 0,11-0,3 mmol/L) emelkedés a plazma glükózsintre, $p < 5 \times 10^{-4}$). A 120 perces PG értékekre is az *MTNR1B* rs10830963 G kockázati allél hordozása volt a legnagyobb hatással a vizsgált 77 SNP közül (átlagos hatásérősség G kockázati allél hordozókban 0,61 mmol/L (95% CI: 0,3-0,89 mmol/L) emelkedés a plazma glükózsintre, $p < 5 \times 10^{-4}$). [4]

5. Következtetések

I. Köldökszínór DPP4 szérum enzimaktivitás és aktív GLP-1⁷⁻³⁶ plazmaszint vizsgálata

- A sDPP4 enzimnek mérhető aktivitása van a GDM és nem diabeteses terhességből születettek KZS vérében.
- A KZS sDPP4 aktivitása a GDM terhességből született egyéneknél szignifikánsan alacsonyabb (11%-os csökkenés), mint a nem diabeteses terhességből születettekben.
- A köldökszínórvér sDPP4 aktivitásában jelentkező fenti különbségek magyarázata jelenleg nem tisztázott, felmerülhet a terhességi cukorbetegség újszülöttjeinek csökkent adaptív fetális válasza vagy egy korai regulációs zavar lehetősége is a DPP4-inkretin tengelyben.
- A megfigyelt KZS sDPP4 aktivitás csökkenés – elméletileg – hozzájárulhat a GDM egyes neonatalis klinikai szövődésének kialakulásához (pl. hypoglykaemia, polycythaemia), azonban erre vonatkozóan az eredmények direkt evidenciaként egyelőre nem interpretálhatóak.
- Az aktív GLP-1⁷⁻³⁶ köldökszínórvér plazma szintek alacsonyak, az alsó mérési határ közelében mérhetőek.
- A jelenlegi (korlátozott) mintaelemszámok mellett szignifikáns eltérés nem volt észlelhető a GDM terhességből született és nem diabeteses terhességből született egyénektől származó mintákban mért aktív GLP-1⁷⁻³⁶ KZS plazma szintek között.
- A GLP-1⁷⁻³⁶ és az inkretin szabályozórendszer (egyfajta "baseline" szekréció lehetséges) – az alacsonyabb hormonszintek alapján – funkcionálisan valószínűsíthetően nem teljesen aktív az orális táplálás megkezdése előtt, de az erre vonatkozó további adatok a születést követően limitáltak.

II. *MTNR1B* rs10830963 maternalis genotipizálás eredményei

- Az EFSD New Horizons kutatásban a vizsgált 77 egy pontos génvariáns asszociációs vizsgálatok az *MTNR1B* rs10830963/ *G* allélhordozásnak volt a legnagyobb genetikai hatása a magyar és az osztrák terhes személyekben a GDM kialakulásra.
- Az *MTNR1B* rs10830963 *G* allélhordozás GDM kialakulására vonatkoztatott esélyhányados értéke – az alkalmazott diganosztikai kritériumrendszerrel függetlenül - meghaladta (OR 1,6-1,9) a poligénes hajlammal rendelkező betegségekben a gyakori kockázati génvariáns hordozás esetén típusosan jellemző (1,5 alatti OR) kockázatonövekedés mértékét.
- Az *MTNR1B* rs10830963 *G* allél hordozása mind a terhesség 24-28. hete között végzett 75g OGTT során mért éhomi és 2 órás plazma glükóz értékek emelkedését eredményezi, a genetikai hatás nagysága klinikailag is jelentős, a 2 órás érték tekintetében meghaladja a 0,5 mmol/L-es PG különbséget.
- Az *MTNR1B* rs10830963 *G* kockázati allél frekvenciája Magyarországon is gyakori, egyező a 1000 genomes program keretében mért európai minor allél frekvenciával (MAF, súlyozott magyar populációs átlag: 29%), azaz a magyar nők közel fele (49%) hordozza a *G* kockázati allélt.
- A genetikai hatás nagysága és a *G* kockázati allél frekvenciája alapján az *MTNR1B* rs10830963 genotípushoz tartozó kockázatonövekedésnek hazánkban is számottevő szerepe lehet a GDM kialakulásában. Az *MTNR1B* rs10830963 génvariánsnak - saját eredményeink alapján is - esetleg szerepe lehet a személyre szabott GDM orvoslásban a jövőben.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent teljes terjedelmű közlemények

Al-Aissa Z, Rosta K, Hadarits O, et al.: Cord serum dipeptidyl-peptidase 4 activity in gestational diabetes. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45(2), 196-203. IF: 2,714

Rosta K, *Al-Aissa Z*, Hadarits O, et al.: Association Study with 77 SNPs Confirms the Robust Role for the rs10830963/G of MTNR1B Variant and Identifies Two Novel Associations in Gestational Diabetes Mellitus Development. *PLoS One*, 2017, 12(1), e0169781. IF: 2,806

Firneisz G, Rosta K, *Al-Aissa Z*, et al.: The MTNR1B rs10830963 Variant in Interaction with Pre-Pregnancy BMI is a Pharmacogenetic Marker for the Initiation of Antenatal Insulin Therapy in Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 23; 19(12). IF: 3,687

Az értekezés témájában megjelent összefoglaló közlemény

Al-Aissa Z, Hadarits O, Rosta K, et al.: A brief history of gestational diabetes mellitus, risk factors and current criteria of diagnosis. *Orv Hetil*, 2017, 158(8), 283-290. IF: 0,349

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Zóka A, Barna G, Somogyi A, Múzes G, Oláh Á, *Al-Aissa Z*, Hadarits O, Kiss K, Firneisz G: Extension of the CD4(+) Foxp3(+) CD25(-/low) regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 2015, 48(5), 289-297. IF: 2,917

Zóka A, Barna G, Hadarits O, *Al-Aissa Z*, Wichmann B, Múzes G, Somogyi A, Firneisz G: Altered crosstalk in the dipeptidyl peptidase-4-incretin-immune system in type 1 diabetes: A hypothesis generating pilot study. *Hum Immunol*, 2015, 76(9), 667-672. IF: 2,127

Hadarits O, Zoka A, Barna G, et al.: Increased Proportion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Population in Cord Blood of Neonates Born to Mothers with Gestational Diabetes Mellitus. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(1), 13-17. IF: 3,562

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó összefoglaló közlemény

Zóka A, Múzes G, Somogyi A, Varga T, Szémán B, *Al-Aissa* Z, Hadarits O, Firneisz G: Altered immune regulation in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013, 254874. IF: 2,934

7. Irodalomjegyzék

1. Kun A, Tornoczky, J., Sudar, Z., Kerenyi, Z., Tabak, A.G.: Pregnancy outcomes of women with untreated GDM (according to the WHO 2013 diagnostic criteria). European Association for the Study of Diabetes 51th Annual Meeting; 14-18 September, 2015; Stockholm 2015. *Diabetologia*2015.
2. Al-Aissa Z, Hadarits O, Rosta K, et al.: [A brief of gestational diabetes mellitus, risk factors and current criteria of diagnosis]. *Orv Hetil*, 2017, 158(8), 283-290.
3. Al-Aissa Z, Rosta K, Hadarits O, et al.: Cord serum dipeptidyl-peptidase 4 activity in gestational diabetes. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45(2), 196-203.
4. Rosta K, Al-Aissa Z, Hadarits O, et al.: Association Study with 77 SNPs Confirms the Robust Role for the rs10830963/G of MTNR1B Variant and Identifies Two Novel Associations in Gestational Diabetes Mellitus Development. *PLoS One*, 2017, 12(1), e0169781.