

Szérum dipeptidyl-peptidáz-4 enzim aktivitás és T-lymphocyta felszíni CD26 expresszió vizsgálata diabétesz mellituszban

Doktori értekezés

Dr. Varga Tímea

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola 2/1



Témavezető: Dr. Somogyi Anikó, egyetemi tanár, MTA doktora

Konzulens: Dr. Firneisz Gábor Ph.D. egyetemi adjunktus

Hivatalos Bírálók: Dr. Putz Zsuzsanna Ph.D. egyetemi tanársegéd

Dr. Nádás Judit Ph.D. főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerő László egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prechl József Ph.D. MTA Tudományos Főmunkatárs

Dr. Reismann Péter Ph.D. egyetemi tanársegéd

Budapest

2012

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTER	9
1.1 A diabétesz és jelentősége napjainkban	9
1.2 A szénhidrát anyagcserezavarok kóroki osztályozása	11
1.3 Anyagcsere változások diabétesz mellituszban.....	13
1.4 A diabétesz mellitusz szövődményei	13
1.5 Az 1-es típusú diabétesz.....	14
1.5.1 Az 1-es típusú diabétesz formái	14
1.5.2 Az 1-es típusú diabétesz epidemiológiája	14
1.5.3 Az autoimmun mechanizmusú diabétesz kialakulásának rizikófaktorai.....	15
1.5.4 Az autoimmun mechanizmusú diabétesz kialakulásának pathomechanizmusa	19
1.5.5 Az autoimmun diabétesz kialakulásának immunológiai háttere	22
1.5.5.1 A CD3+ T-lymphocyták és szerepük az immunfolyamatokban	22
1.5.5.2 Th1/Th2 egyensúly eltolódás autoimmun diabéteszben	24
1.5.6 Humorális autoimmun markerek T1DM-ben	24
1.5.7 Az autoimmun mechanizmusú diabétesz és a társbetegségek.....	28
1.5.8 A T1DM gyógyszeres kezelése	28
1.6 A 2-es típusú diabétesz	29
1.6.1 A T2DM epidemiológiája	30
1.6.2 A T2DM kialakulásának rizikófaktorai.....	30
1.6.3 A T2DM kialakulásának patomechanizmusa	32
1.6.4 A T2DM gyógyszeres kezelése	33
1.7 A szénhidrát anyagcsere folyamata, az enteroinzuláris szabályozás	34
1.7.1 Az enterohormonok és szerepük a szénhidrát anyagcsere folyamatban. Az inkretinek	34
1.7.1.1 A GLP-1 hormon élettani szerepe	36
1.7.1.2 A GIP hormon élettani szerepe	37
1.7.2 A DPP-4 és szerepe a szénhidrát anyagcsere folyamatban	38
1.7.3 A DPP géncsalád	39
1.7.4 A DPP-4 biológiai szerepe	42
1.7.4.1 A CD26 szerepe az immunfolyamatokban	45
2. CÉLKITŰZÉSEK	47
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	50
3.1 A szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása	53
3.2 A szérum ICA és GAD antitestek meghatározása ELISA kit-tel.....	53
3.3 A CD26 expresszió meghatározása	54
3.4 A klinikai laboratóriumi paraméterek meghatározása.....	55
3.5 Statisztikai módszerek.....	55
3.6 Vizsgálatok.....	55
3.6.1 Szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása cukorbetegekben éhomi és postprandialis állapotokban.....	56

3.6.2	<i>Szérum DPP-4 aktivitás és lymphocyta felszíni CD26 expresszió vizsgálata T1DM-ben és kontroll személyekben</i>	56
4.	EREDMÉNYEK	57
4.1	Szérum DPP-4 enzimaktivitás cukorbetegben éhomi és postprandiális állapotokban.....	57
4.2	Az emelkedett szérum DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálatára irányuló, szérum DPP-4 aktivitás és lymphocyta membránhoz kötött CD26 expresszió T1DM-ben	60
4.3	Autoimmun ICA és GADA aktivitás vizsgálata a szolubilis szérum DPP-4 valamint a lymphocyta felszínhez kötött CD26-al való összefüggésében T1DM betegekben.....	65
5.	MEGBESZÉLÉS	68
5.1	Szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása cukorbetegben éhomi és postprandiális állapotokban.	68
5.2	Az emelkedett szérum DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálata a szérum DPP-4 aktivitás és a lymphocyta membránhoz kötött CD26 expresszió függvényében T1DM-ben.....	69
1.	A GLP-1 SZINT SZIGNIFIKÁNSAN KÜLÖNBÖZÖTT A DIAGNÓZIS FELÁLLÍTÁSÁT KÖVETŐEN 6 ILLETVE 12 HÓNAPNÁL REMISSZIÓBA KERÜLŐ BETEGEK ESETÉBEN /ALACSONYABB GLP-1 SZINTET MÉRTEK/ A REMISSZIÓBA NEM KERÜLŐ BETEGEKTŐL.....	71
2.	A GLP-1 SZINT POZITÍVAN KORRELÁLT A POSZTPRANDIÁLIS GLÜKÓZ SZINTTEL	71
3.	A GLP-1 SZINT POZITÍVAN KORRELÁLT A PROINZULIN SZINTTEL 1 HÓNAPNÁL, EZ AZ ÖSSZEFÜGGÉS AZONBAN 6 ÉS 12 HÓNAPNÁL MEGFORDULT.	71
4.	EGY HÓNAPNÁL A 90 PERCNÉL MÉRHETŐ POSZTPRANDIÁLIS GLP-1 ÉRTÉKE ELŐRE JELZI, A 6 HÓNAP MÚLVA BEKÖVETKEZŐ REMISSZIÓT – MAGASABB GLP-1 SZINTEKHEZ ALACSONYABB REMISSZIÓS RÁTA TÁRSUL.....	71
	A VIZSGÁLATBAN MEGÁLLAPÍTOTTÁK, HOGY A GLP-1 INKRETIN HORMON FONTOS SZEREPLŐ LEHET A REMISSZIÓS FÁZISBAN LÉVŐ EGYES TÍPUSÚ CUKORBETEGEK BEN AZONBAN EBBEN A VIZSGÁLATBAN SEM TÖRTÉNT SZÉRUM DPP-4 ENZIM AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁS, AMELY A MI MUNKÁNK ALAPJÁT KÉPEZTE. MINDEZEN EREDMÉNYEK MEGERŐSÍTIK AZT A TÉNYT, HOGY AZ ENTEROINZULÁRIS RENDSZER MŰKÖDÉSE T1DM-BEN IS MEGVÁLTOZIK, EZÉRT ENNEK TOVÁBBI VIZSGÁLATA MIND ELMÉLETI MIND GYAKORLATI TERÁPIÁS SZEMPONTBÓL ÉRDEMES.	71

5.3 Autoimmun ICA és GADA aktivitás vizsgálata a szolubilis szérumban DPP-4 valamint a lymphocyták felszínéhez kötött CD26-al való összefüggésében T1DM betegekben..... 72

6. KÖVETKEZTETÉSEK..... 74

EREDMÉNYEINK KLINIKAI JELENTŐSÉGÉT JELZI ÉS A TÉMA ÚJSZERŰSÉGÉRE UTAL, HOGY A DPP-4 GÁTLÓ SZITAGLIPTIN HATÁSÁNAK VIZSGÁLATRÓL T1DM-BEN MINDEZIDÁIG MINDÖSSZE EGYETLEN KÖZELMÚLTBAN PUBLIKÁLT VIZSGÁLAT SZÁMOL BE. ELLIS ÉS MUNKACSOPORTJA 20 BETEG BEVONÁSÁVAL 8 HETES, KETTŐS VAK, VÉLETLEN BESOROLÁSÚ, CROSSOVER VIZSGÁLAT SORÁN A BETEGEKET KÉT CSOPORTRA OSZTVA 100MG SITAGLIPTIN ILLETVE PLACEBO ADÁSÁT KÖVETŐEN SZÉRUM GLÜKÓZ, HBA1C VALAMINT A SZÜKSÉGES INZULIN DÓZISÁNAK VÁLTOZÁSÁT VIZSGÁLTA T1DM BETEGEK BEN⁸⁰. A KÜLÖNBÖZŐ KEZELÉST A „KÉT KARON” LÉVŐ BETEGEKEN 4 HÉT MÚLVA MEGCSERÉLTÉK. A VIZSGÁLAT MEGÁLLAPÍTOTTA, HOGY A 100MG SZITAGLIPTIN KEZELÉS SZIGNIFIKÁNSAN JAVÍTOTTA A HBA1C SZINTET ÉS CSÖKKENTETTE AZ INZULINIGÉNYT. A DPP-4 GÁTLÓK ALKALMAZÁSÁNAK T1DM BETEGEKRE VALÓ KITERJESZTÉSÉRE IRÁNYULÓ FELVETÉSEINK TEHÁT HELYTÁLLÓNAK BIZONYULNAK A NAPJAINKBAN ELVÉGZETT KLINIKAI VIZSGÁLATOK ALAPJÁN..... 74

TEKINTETTEL ARRA, HOGY A DPP-4 GÁTLÓK NEMCSAK – DE SZÁMOTTEVŐEN - AZ INKRETIN TENGELYEN KERESZTÜL HATNAK, ÉRDEMES MEGEMLÍTENI, HOGY MÁR VANNAK PUBLIKÁLT ADATOK GLP-1 MIMETIKUM LIRAGLUTIDE ALKALMAZÁSÁVAL KAPCSOLATBAN IS T1DM-BEN. KIELGAST ÉS MUNKATÁRSAI 2010-BEN PUBLIKÁLT EREDMÉNYEI SZERINT EGY 4 HETES 29 T1DM BETEG BEVONÁSÁVAL KÉSZÜLT TANULMÁNYBAN A KEZELÉS LIRAGLUTIDDAL TÖRTÉNŐ KIEGÉSZÍTÉSE AZ INZULIN DÓZIS CSÖKKENÉSÉT EREDMÉNYEZTE MIND A C-PEPTID POZITÍV (10 BETEG) MIND A C-PEPTID NEGATÍV (19 BETEG) KEZELÉSÉBEN AZ ANYAGCSERE PARAMÉTEREK ROMLÁSA NÉLKÜL. A LIRAGLUTID KEZELÉS MELLETT FOLYAMATOS GLÜKÓZ MONITOROZÁS SORÁN AZT TALÁLTÁK, HOGY SZIGNIFIKÁNSAN CSÖKKENT AZON IDŐTARTAM A C-PEPTID POZITÍV BETEGEK BEN - DE A C-PEPTID NEGATÍVAKBAN IS TRENDSZERŰ CSÖKKENÉS VOLT MEGFIGYELHETŐ - AMELYET A PÁCIENS 3,9 MMOL/L VÉRCUKORSZINTEN TÖLT^{81.82}. KLINIKAI GYAKORLATI JELENTŐSÉGE ENNEK A MEGFIGYELÉSNEK HOSSZÚTÁVON KÜLÖNÖSEN FONTOS LEHET, HISZEN A LEGODAADÓBB KEZELÉS MELLETT IS MINDENNAPI PROBLÉMÁT JELENT A HYPOGLYCAEMIAS ÁLLAPOTOK FELLÉPÉSE A T1DM BETEGEK BEN..... 74

7. ÖSSZEFOGLALÁS 78

A VIZSGÁLATAINKBAN ÉSZLELT EMELKEDETT DPP-4 ENZIM AKTIVITÁS ÉS AZ EZZEL FELTÉTELEZHETŐEN KAPCSOLATBAN ÁLLÓ

AUTOIMMUN DYSREGULÁCIÓS FOLYAMATOK TEKINTETÉBEN ELSŐKÉNT VETETTÜK FEL A LEHETŐSÉGÉT A DPP-4 GÁTLÓK KLINIKAI ALKALMAZÁSÁNAK KIBŐVÍTÉSÉRE T1DM-BEN. HASONLÓ IRODALMI EREDMÉNYEK, HIPOTÉZISEK EBBEN A TÉMÁBAN CSAK KORLÁTOZOTT SZÁMBAN VOLTAK HOZZÁFÉRHETŐEK, JELENLEGI ISMERETEINK SZERINT EZ AZ EGYETLEN VIZSGÁLAT EBBEN A TÉMÁBAN.....	78
VIZSGÁLATUNKIG MINDEZIDÁIG AUTOIMMUN DIABÉTESSZEL KAPCSOLATBAN PUBLIKÁLT CD26 EXPRESSZIÓ VAGY SZÉRUM DPP-4 MEGHATÁROZÁS SEM TÖRTÉNT. EREDMÉNYINK EZÉRT EZEN A TÉREN IS ÚTTÖRŐ JELENTŐSÉGGEL BÍRhatnak és ALAPJÁT KÉPEZHETIK TOVÁBBI ILYEN IRÁNYÚ VIZSGÁLATOKNAK.	79
MUNKACSOPORTUNK ÁLTAL ELVÉGZETT VISZONYLAG NAGY BETEGANYAGON VÉGZETT VIZSGÁLATAINK JELENTŐSÉGÉT A KÖZELMÚLTBAN ÉS NAPJAINKBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK IGAZOLJÁK. REMÉLHETŐLEG MUNKÁNK HASZNOS ALAPJÁT KÉPEZI MAJD TOVÁBBI KUTATÁSOKNAK ÉS SEGÍTHETI A BETEGSÉG PATHOMECHANIZMUSÁNAK PONTOSABB MEGISMERÉSÉT, AZ AUTOIMMUN DIABÉTESZ EDDIG ISMERT KEZELÉSI LEHETŐSÉGEINEK KITERJESZTÉSÉT IS.....	79
8. SUMMARY	80
9. IRODALOMJEGYZÉK	82
80. KAAS A, ANDERSEN ML, FREDHEIM S, HOUGAARD P, BUSCHARD K, PETERSEN JS, DE BEAUFORT C, ROBERTSON KJ, HANSEN L, MORTENSEN HB, NIELSEN LB. (2012) PROINSULIN, GLP-1, AND GLUCAGON ARE ASSOCIATED WITH PARTIAL REMISSION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH NEWLY DIAGNOSED TYPE 1 DIABETES. PEDIATR DIABETES. 13:51-58.	91
84. HADJIYANNI I, SIMINOVITCH KA, DANSKA JS, DRUCKER DJ. (2010) GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 RECEPTOR SIGNALLING SELECTIVELY REGULATES MURINE LYMPHOCYTE PROLIFERATION AND MAINTENANCE OF PERIPHERAL REGULATORY T CELLS. DIABETOLOGIA. 53:730-740.....	92
85. CONSOLI A, DI BIAGIO R. (2011) PROTECTIVE EFFECTS OF GLUCAGONE-LIKE PEPTIDE-1 ON BETA-CELLS: PRECLINIAL AND CLINICAL DATA. G. ITAL CARDIOL. 12::5-9.	92
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	93
10.1 Az értekezés témájában megjelent teljes terjedelmű közlemények	93
10.2 Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények	93
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95

Rövidítések jegyzéke

ABCC8	ATP-binding cassette, sub-family (CFTR/MRP), member8
ADA	Adenozin-dezamináz
ADIPOQ	Adipocyte, C1q and collagen domain-containing protein
ADRB3	Adrenoceptor beta 3
APC	Antigén prezentáló sejt
ANOVA	Variancia analízis
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
BNP	B-típusú natriuretikus peptid
BMI	Testtömeg index (body mass index)
CRP	C-reaktiv protein
CAPN10	Calcium-activated neutral proteinase 10
CARD11	Caspase recruitment domain family, member 11
CD	Cluster of differentiation
CTLA4	Citotoxikus T-lymphocyta aktivátor
DPL-1	Dipeptidyl peptidáz-like protein -1
DPL-2	Dipeptidyl peptidáz-like protein -2
DPP-4	Dipeptidyl peptidáz -4
DPP-8	Dipeptidyl peptidáz -8
DPP-9	Dipeptidyl peptidáz -9
EASD	European Association for the Study of Diabetes
ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphatase 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FABP2	Fatty acid binding protein 2
FAP	Fibroblast aktiváló protein
FPG	Éhomi vércukor (Fasting plasma glucose)
FOXP3	Forkhead box P3
FOXO1	Forkhead box O 1
FOXA2	Forkhead box A2

GADA	Glutamic acid decarboxylase antibody
GCGR	Glucagon receptor
GCK	Glucokinase (hexokinase 4)
GIP	Glükózdependens inzulinotrop peptid
GLP-1	Glukagon-like peptid-1
GLP-2	Glukagon-like peptid-2
GYS1	Glycogen synthase 1
HbA1c	Hemoglobin A1c
HCV	Hepatitis C vírus
HIV	Human immundeficiencia vírus
HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
IA2-A	Insulinoma associated protein-tyrosine phosphatase antibody
IAA	Insulin autoantibody
IAPP	Islet amyloid polypeptide
ICA	Islet cell antibody
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IGF	Insulin-like growth factor 1
IL-12	Interleukin-12
INS	Insulin
INSR	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
IRS1/2	Insulin receptor substrate 1/2
LADA	Latent Diabetes of Adulthood
LDL	Low density lipoprotein
KCNJ11	Potassium inwardly-rectifying channel J11
MHC	Major hisztokompatibilitási komplex
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NF-κB	Nuclear factor-κB
NK-sejt	Natural killer- sejt
NNT	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NOS3	Nitric oxide synthase 3

NPY	Neuropeptid-Y
PAS	Polyendocrin autoimmun szindróma
PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor, coactivator1 α
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1
POP	Prolyl oligopeptidáz
PPAR γ	Peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor- γ
PPP1R3A	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A
PTPN22	Lymphoid tirozin foszfatáz
RBP4	Retinol binding protein 4
RIA	Radioimmun assay
ROC	Receiver Operating Characteristic
SLC2A2	Solute carrier fam2facilitated glucostransportermember2
SIRT1	Sirtuin 1
TCF7L1/2	Transcription factor 7-like 1/ 2
T1DM	1-es típusú cukorbetegség
T2DM	2-es típusú cukorbetegség
Th1	T helper 1 lymphocyta
Th2	T helper 2 lymphocyta
UCP2	Uncoupling protein 2
VIP	Vazoaktív intesztinális peptid

1. Bevezetés, irodalmi háttér

1.1 A diabétesz és jelentősége napjainkban

A cukorbetegség a XXI. század elejének egyik legjelentősebb népegészségügyi problémájává nőtte ki magát és előkelő helyet foglal el a nem fertőző úgynevezett civilizációs betegségek sorában. Jelentőségét fokozza a betegség egyre fiatalabb korban való megjelenése valamint a betegek számának ugrásszerű és progresszív növekedése.

Bár a betegség központjában a szénhidrát anyagcsere zavara áll, a kórfolyamat következményesen érinti a zsír és a fehérje anyagcserét is. A kórlefolyás alatt létrejövő patofiziológiai eltérések számos szerv működését károsíthatják. Az akut és krónikus szövödmények megnövelik a kockázatát a szív- és érrendszeri, neurológiai megbetegedéseknek és a várható élettartam csökkenésével társulnak. A szövödmények és az alapbetegség kezelése nagy terhet jelent a betegnek és a társadalomnak egyaránt. A korai felismerés a szűrővizsgálatok rendszeresítésével, a megelőzés lehetőségei pedig a már fiatal korban elkezdődő, egészséges életmódra irányuló étkezési és aktivitási szokások bevezetésével javíthatóak.

A szűrővizsgálatok eredményeképpen már egyszerű labordiagnosztikai módszerekkel is van lehetőség a cukorbetegség felismerésére. A klinikai kép alapján azonban a betegség klasszifikációja nem mindig egyértelmű. Az éhomi C-peptid vagy inzulinszint mérése, további segítséget nyújthat, azonban egyes esetekben a cukorbetegség típusának eldöntéséhez a költségesebb autoimmun marker kimutatás vagy genetikai vizsgálatok elvégzésével juthatunk közelebb. Új entitásként megjelent a „double diabétesz” amelyben a betegben megjelennek mind az egyes-, mind a kettes-típusú diabéteszre jellemző tünetek. További nehézséget jelenthet a feltehetően nem autoimmun 1-es típusú diabétesz mellitusz diagnózisa is. A késői, felnőtt korban jelentkező autoimmun 1-es típusú diabétesz besorolása az autoimmun markerek kimutatásával egyértelművé válhat. Az auto-antitestek kimutathatósága azonban idővel csökken, a költségesebb genetikai vizsgálatok lehetősége mellett egyéb laboratóriumi marker, amely az autoimmun diabétesz diagnózisát kiegészítené, vagy alátámasztaná jelenleg nem ismert.

A cukorbetegség megjelenésének oka, a betegség patomechanizmusa számos ponton vet fel eddig még nem tisztázott kérdéseket. Nem tudjuk, hogy vajon a környezeti faktorok oki tényezők, akcelerátorok vagy védő faktorok, esetleg több ponton, több mechanizmussal működnek-e. Az immunmediált diabétesz patomechanizmusa sokrétű, és különböző hajlamosító génkombinációkat hordozó betegcsoportokban alternatív molekuláris útvonalak felelősek a béta-sejtek pusztulásáért. Pathomechanizmusának T-sejtes elemei kiterjedt vizsgálatok tárgyát képezik, a publikált eredmények azonban az egyes sejtpopulációk diabetogén jellege, a sejtes immunválaszt kiváltó autoantigének azonosítása, a béta-sejtek pusztulásában szerepet játszó citokinek szekréciója tekintetében nagyon ellentmondóak. A problémát a metodikák összehasonlíthatóságának és az eredmények reprodukálhatóságának hiánya okozza ezért nincs egyértelmű celluláris immunmarker (citokin, T- vagy B-sejtfelszíni marker) amely segítené a diabetogén folyamat felismerését, monitorozását. Emiatt a jól reprodukálható humorális immunmarkereket használjuk az 1-es típusú autoimmun diabétesz előrejelzésére.

A jelenleg 2-es típusú diabéteszben (T2DM) használt, a DPP-4 enzim gátlásán alapuló DPP-4 (dipeptidyl peptidáz-4) gátlók elsősorban az enzim az inkretinekre gyakorolt hatásának blokkolását használja ki a cukorbetegség gyógyításában. A fehérjét azonban számos betegséggel kapcsolatban is vizsgálták. Aktivitásának illetve a membránhoz kötött forma expressziójának eltérései alapján nyilvánvalóvá vált, hogy alapvető szerepe van többek között a gyulladáshoz, autoimmun és daganatos folyamatokban is. Vajon ez multifunkcionális fehérje hogyan jelenik meg egy komplex, autoimmun hátterű szénhidrát anyagcserezavar, az autoimmun diabétesz vetületében? Vizsgálatainkban erre a kérdésre kerestük a választ.

1.2 A szénhidrát anyagcserezavarok kóroki osztályozása

A diabétesz számos típusa, besorolása ismert, klinikai tünetei a betegség típusától függően változnak. A jelenlegi WHO osztályozás alapján a betegség kóroktanilag négy főcsoportba sorolható:

1. A cukorbetegek kisebb csoportját alkotják az *1-es típusú diabétesz mellituszban* (T1DM) szenvedő betegek. A kórkép jellemzően klasszikus klinikai tünetekkel 35 éves életkor előtt jelenik meg. A betegség kialakulása során létrejövő béta-sejt pusztulás következtében abszolút inzulin hiány jön létre. Felnőtt korban kialakuló késői formája a *Latent Autoimmun Diabetes of Adulthood (LADA)*. A betegség patomechanizmusát tekintve ezen az osztályon belül még két alapvető diabétesz formát különítünk el:
 - az autoimmun mechanizmusú (1A)
 - és az idiopathiás (1B) típusú diabétesz formákat.

2. A 2-es típusú diabétesz csoport

Ebbe a csoportba az:

- inzulin rezisztencián alapuló, relatív inzulinhiánnyal társuló,
- az elsődlegesen szekréciós zavarra visszavezethető és inzulinrezisztenciával társuló
- vagy anélkül megjelenő megbetegedési formák tartoznak.

A T2DM-ben szenvedő betegek alkotják a cukorbetegek nagyobb hányadát. Egészen a közelmúltig a T2DM a felnőtt, idősebb korosztályt érintette és csak ritkán jelent meg 50 év alatti betegekben. Napjainkban azonban a klinikai vizsgálatok arra utalnak, hogy a korábbiakhoz képest egyre gyakrabban diagnosztizálható a T2DM a gyermekek és a serdülők között is. Ez kapcsolatban állhat azzal a megfigyeléssel, hogy az utóbbi időben emelkedett a kórosan elhízott gyermekek száma^{1,2}.

3. *Egyéb diabétesz formák*

A cukorbetegek egy kisebb hányadát képezik az *egyéb diabéteszes formákhoz* tartozó kórképek:

- a béta-sejt működés (MODY-maturity-onset diabetes of the young) és az inzulinhatás genetikai zavarai,
- a hasnyálmirigy exocrin állományának megbetegedéseivel társuló formák,
- endocrinopathiákhoz csatlakozó,
- gyógyszerek és kémiai anyagok kiváltotta diabétesz,
- a fertőzéshez társuló formák illetve
- az immunmechanizmusú cukorbetegség szokatlan formái és
- más, esetenként diabéteszrel társuló genetikai szindrómák.

4. Csoportot képeznek még a cukorbetegeken belül az első ízben, a terhesség során diagnosztizált, különböző súlyosságú hyperglycaemiát okozó szénhidrátanyagcsere-zavarban szenvedő *gestációs diabéteszes* betegek^{1,3}.

1.3 Anyagcsere változások diabétesz mellituszban

Diabéteszben a szénhidrát és a zsír anyagcsere zavarai mellett a fehérje anyagcsere is zavart szenved. A zsír anyagcsere zavarait jelzi diabéteszben, hogy a zsírsavszintézis kulcsenzime az acetyl-CoA-karboxiláz kevésbé aktivált, mint normálállapotban így a zsírsavak és a trigliceridek szintézise lecsökken. Az inzulin szenzitív aminosav transzport csökkenése következtében csökken a fehérjeszintézis a szívben és a májban, ezzel ellentétben a vese és a bélrendszer sejtjeiben a fehérjeszintézis fokozódik.

Az inzulin hatásmechanizmusában és annak zavaraiiban az izom,- a zsírszövet és a máj működése a legmeghatározóbb. Az izmokban az abszolút inzulinhiány vagy az inzulin elégtelen hatása, csökkent glükóz felvételt okoz. A zsírszövetben szintén csökken a glükóz felhasználása és metabolizmusa. A máj glükóz termelése az inzulin abszolút vagy relatív hiánya esetén szabályozatlanná válik, és a máj által termelt glükóz, a perifériás szövetek glükóz felvételének elégtelensége miatt tovább növeli a vércukorszintet¹.

1.4 A diabétesz mellitusz szövődményei

A cukorbetegség szövődményeinek időbeli fennállását tekintve heveny és idült, a hagyományos felosztás szerint pedig kis ér (microvascularis vagy microangiopathiás) illetve nagy ér (macrovascularis vagy macroangiopathiás) eredetű szövődményeket különíthetünk el. Akut szövődmény a diabéteszes ketoacidózis, a hyperosmoláris nem ketotikus kóma, a laktátacidózis valamint a hypoglycaemia. Krónikus szövődmények közé a vasculáris és a neuropáthiás eredetű elváltozásokat soroljuk. A vasculáris eredetű elváltozások során a kis erek károsodásának kitüntetett helyei a retina (retinopathia), a vese glomerulusai (nephropathia), az idegszövet (neuropathia) és a cardiomyocyták (cardiopathia). A diabéteszes macroangiopathia a szervezet összes nagy és közép nagy artériáit érintheti. Klinikai megjelenése és a kialakulását elősegítő tényezők azonosak a nem diabéteszes eredetű atherosclerosiséval. A diabéteszben kialakuló atheromás pakk instabil természetű, amelynek helyi és szisztémás okai vannak. Jellemző megjelenési

formáit a coronaria rendszer, a fej-nyaki erek, és az alsó végtagi artériák megbetegedései képezik¹.

1.5 Az 1-es típusú diabétesz

1.5.1 Az 1-es típusú diabétesz formái

Az autoimmun 1-es típusú diabétesz

Az autoimmun mechanizmusú 1-es típusú (1A) diabéteszben a béta-sejtek pusztulása T-sejt által közvetített autoimmun reakció következménye. A Langerhans-szigetekben zajló folyamatot a szérumból kimutatható inzulin, illetve szigetsejt-specifikus autoantitestek jelzik. Az 1-es típusú cukorbetegség döntő többségének - legalábbis a kaukázusi népességben - kimutathatóan autoimmun mechanizmusú cukorbetegsége van.

Az idiopathias 1-es típusú diabétesz

Az esetek kis hányadában laboratóriumi módszerekkel nem mutathatóak ki autoimmun markerek, ilyenkor az 1-es típusú diabétesz 1B típusáról vagy idiopathiás formájáról beszélünk. A vérben nincsenek specifikus szigetsejt ellenes antitestek és a Langerhans-szigetben nincs lymphocytás infiltráció. Az 1B altípust szintén a progresszív és irreverzibilis béta-sejtpusztulás jellemzi, éppen úgy, mint az 1A típust, de a béta-sejtek pusztulásának oka nem tisztázott. A betegség öröklődő, de az autoimmun mechanizmusú 1-es típusú diabéteszre kockázatot jelentő HLA gének hordozása nem jellemző.

1.5.2 Az 1-es típusú diabétesz epidemiológiája

Az 1A típusú diabétesz epidemiológiáját tekintve a betegség prevalenciáját a világban 0,2%-ra, Európában 0,5%-ra, Magyarországon 0,3%-ra becsülik. A leggyakrabban Finnországban észlelhető, a legritkább Kína egyes területein. A nemek között nincs jelentős eltérés a gyakoriságban². Az 1B idiopathiás diabétesz előfordulása elsősorban Afrikában, Ázsiában valamint az Egyesült Államokban jellemző⁴.

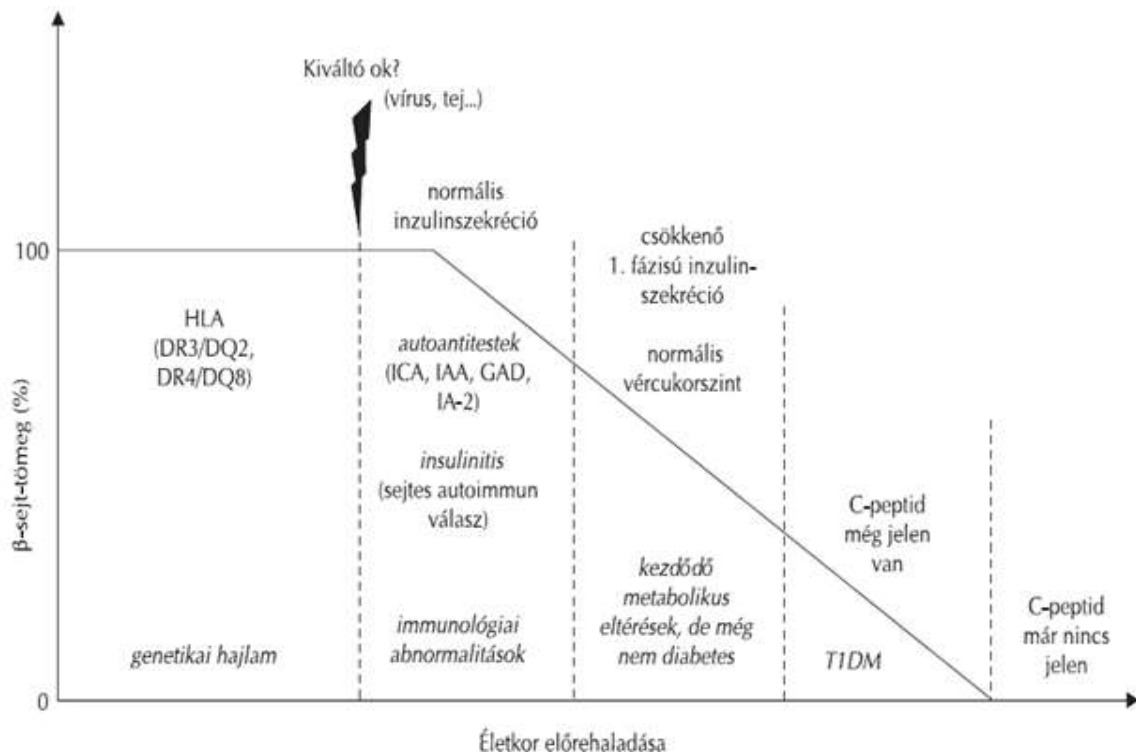
1.5.3 Az autoimmun mechanizmusú diabétesz kialakulásának rizikófaktorai

A korábbi „tradicionális” szemlélet szerint az autoimmun 1-es típusú diabétesz mellituszhoz vezető kórfolyamat négy stádiumra osztható:

1. stádium: genetikai fogékonyság;
2. stádium: korai prediabetes - kiváltó triggertényező (pl.: enterovírusok) fellépte - külső környezeti hatásra megindul az autoimmunitás, immunológiai eltérések észlelhetőek (insulitis, autoantitest-pozitivitás);
3. stádium: késői prediabetes; az immunológiai zavarokhoz metabolikus eltérések (pl. csökkent korai inzulinszekréció) társulnak. Ez az immunmediált sejtkárosodás időszaka, amely során fokozatosan csökken a béta-sejtek mennyisége;
4. stádium: a cukorbetegség manifesztálódása: a béta-sejtek körülbelül 80-90%-a már elpusztult.

A mai „modern” elképzelés a korábinál dinamikusabb, összetettebb. Azt valószínűsíti, hogy a genetikai fogékonyság feltehetően a hajlamosító és védő gének, génszakaszok bonyolult egymásra hatásának következménye. Ebben a periódusban is jelentős szerepük van a környezeti hatásoknak. Azt azonban, hogy valamely környezeti tényező milyen választ vált ki az adott egyénben, az illető genetikai adottsága határozza meg. Genetikai és környezeti hatások tehát egymásra épülve, egymást befolyásolva játszanak szerepet az autoimmun mechanizmusú diabétesz kialakulásában^{1,5}. Feltehetően nem egy tényező indítja el az autoimmun reakciót.

A sejtpusztulás sebességét ugyancsak genetikai és környezeti tényezők valamint a béta-sejt „sérülékenysége” befolyásolhatja. A béta-sejtek tömege a betegség kialakulása során fokozatosan csökken majd a C-peptid eltűnése jelzi, hogy nincs működőképes béta-sejt. Az autoimmun béta-sejt pusztulás legkönnyebben a keringő autoantitestek jelenlétével mutatható ki. Az antitestek közül legkorábban az inzulin ellenes autoantitest (IAA) jelenik meg^{6,7} (1. ábra).



1. ábra Az 1-es típusú diabétesz mellitusz kialakulása⁷. Forrás: Kis J, Engelmann P, Heyam J, Orbán T. (2006) Az immunológiai prevenció lehetősége 1-es típusú diabetes mellitusban. LAM, 16: 771-773.

Genetikai tényezők:

A T1DM patomechanizmusában a béta-sejt specifikus autoimmunitás megjelenésében alapvető fontosságú a genetikai faktorok szerepe. A T1DM iránti genetikai hajlam poligénes öröklésmentű, az eddigi vizsgálatok alapján több mint 25 génrégióval hozták összefüggésbe. Tíz százalékban familiáris, 90%-ban sporadikus előfordulású.

A humán leukocita antigéneket (HLA) a 6-os kromoszóma p21.3 régiója, az úgynevezett major hisztokompatibilitási komplex (MHC) kódolja. Itt több mint 100 gén helyezkedik el melyeket a kromoszómán való elhelyezkedésük és funkciójuk alapján több osztályba sorolnak.

- Az I. osztályba tartozó HLA antigének (HLA A, B, C) megtalálhatók minden maggal rendelkező sejten és a thrombocytán. Sejtfelszíni antigéneket kódolnak, és CD8+ citotoxikus T-lymphocytákkal reagálnak.

- A II. osztályú HLA-antigének (HLA DR, DQ, DP) B-lymphocytákon, aktivált T-sejteken, monocytákon és macrophagokon fordulnak elő, szintén sejtfelületi antigéneket kódolnak, és CD4+ helper T-lymphocytákkal lépnek kapcsolatba.

Az ismert genetikai tényezők közül a legfontosabb szerepe a második osztályú HLA géneknek van, a genetikai kockázat 40-50%-ban e génszakaszokhoz köthető. Mai ismereteink szerint az 1A típusú diabéteszre a legnagyobb fogékonyságot:

- a HLA- DQA*0301-DQB1*0302 haplotípus (ez a HLA-DQ8 szerotípusnak felel meg)
- valamint a HLA-DQA1*0501-DQB1*0201 haplotípus (HLA DQ2 szerotípus) jelenti.

A két haplotípus közül a DQ8 hordozása jár a betegség nagyobb kockázatával. A DQ alléleknek a diabéteszre hajlamosító hatását a velük együtt öröklődő HLA-DRB1 allélek módosíthatják. A DQ8 haplotípus leggyakrabban DRB1*04 allélcsoporttal (DR4 szerotípus) fordul elő. Ezen allélcsoporton belül bizonyos allélek (DRB1*0401, 0402, 0405) fokozzák, mások (DRB1*0403,0406) csökkentik a DQ8 hajlamosító hatását. A DQ2 haplotípus a DRB1*03 allélcsoporttal fordul elő gyakran. A DQ2 hordozáshoz köthető kockázatért a DRB1*03 allélcsoport jelenléte a felelős.

Az autoimmun mechanizmusú cukorbetegségre a legnagyobb kockázatot a HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 genotípus jelenti, amikor az egyén mindkét szülőtől nagy kockázatú haplotípust örökölt (az átlagnépességhez képest 24-szeres kockázat). A védő allélek, haplotípusok hordozása az IA típusú diabéteszben nagyon ritka: a védő HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotípus (HLA-DQ6 szerotípus) előfordulása az 1A típusú cukorbetegben 1%-nál kevesebb. A betegségre hajlamot, illetve védelmet jelentő allélek együttes jelenléte esetén a védő gén szerepe meghatározó^{1,6-8}

A második osztályú HLA géneken kívül egyéb génekkel is kapcsolatba hozható az autoimmun diabéteszre való hajlam:

- A CTLA4 (citotoxikus T-lymphocytákkal asszociált fehérje 4) gén -a citotoxikus T-lymphocyták működésének gátlásában van szerepe,

- a PTPN22 (lymphoid tirozin foszfatáz 22) gén -béta-sejt specifikus autoimmunitás progressziójának szabályozásában, a prediabéteszes állapotból a manifeszt diabétesz kialakulásában, és valószínűleg az inzulinspecifikus autoimmunitás elindításában van szerepe,
- az Inzulin gén - mutációi nagyon ritka monogénes diabetes-formákat okoznak.

Bár az 1A típusú cukorbetegség kialakulásának kockázata kb. 10-szer nagyobb a cukorbeteg egyén rokonaiban, mint az átlagos népességben, az új betegek döntő többségének nincs a betegségben szenvedő első fokú rokona. A hajlamosító gén hordozása sem jelenti feltétlenül a betegség kialakulását. Ha az autoimmun mechanizmusú 1-es típusú cukorbetegség és a 2-es típusú diabétesz öröklődését összehasonlítjuk, akkor az utóbbi kialakulásában nagyobb szerepet játszanak az öröklött tulajdonságok^{1,8}.

Környezeti tényezők:

Eddig egyetlen vizsgált környezeti tényezőről sem igazolható egyértelműen, hogy az 1A típus kialakulásában szerepe van. A legtöbbet vizsgált környezeti tényezők: a vírusfertőzések, a korai tehéntejes táplálás - ideértve a hagyományos csecsemő tápszereket is. Feltételezhető, hogy a külső körülmények bizonyos időszakokban elősegítik, máskor csökkentik a betegség kialakulásának valószínűségét. A hatás attól is függhet, hogy milyen életkorban jelentkezik és milyen súlyos - például a vírusfertőzés. Erre utalhat az a megfigyelés is, hogy a perinatalis életkorban elszenvedett fertőzések hajlamosítanak az autoimmun diabetesre míg a későbbi, óvodáskori fertőzések inkább védenek a betegséggel szemben.

Vírusfertőzés szerepe, molekuláris mimikri:

Ha egy patogén ellen termelődött antitest keresztreakciót ad egy autoantigénnel, az autoantigén és a mikroorganizmus közötti úgynevezett molekuláris mimikri miatt ez az immunrendszer érzékenyítéséhez vezethet. A jellegzetes incidenciát és szezonalitást figyelembe véve leginkább olyan vírusfertőzések jöhetnek szóba, amelyeknek kórokozói a hideg évszakban virulensek. A „gyanúsított” ágensek köze sorolhatók a Coxsackie-vírusok, a cytomegalovírus, bizonyos entero-vírusok, a mumps

és a rubeola vírusa. A Coxsackie-B4-vírus P2-C proteinje és a GAD-protein (glutaminsav-dekarboxiláz) közötti kémiai hasonlóság alapján joggal feltételezhető, hogy ez a vírusfertőzés szerepet játszik az 1-es típusú diabétesz kialakulásában. Ezt támasztják alá azok az eredmények is amelyeknél újonnan diagnosztizált eseteknél emelkedett Coxsackie-vírus elleni antitest titert (IgM típus) mértek, másrészt boncolási anyagból származó hasnyálmirigyből is sikerült a vírust kitenyészteni, harmadrészt állatkísérletben kimutatták, hogy a Coxsackie B4-fertőzés a béta-sejtek akut citolízise révén inzulinfüggő cukorbetegséget eredményezett. Újabb kutatások az enterovírus pathogén szerepét emelik ki az újonnan 1-es típusú diabéteszben rizikó génnek tekinthető IFIH1 (interferon-induced helicase C domain-containing protein1) gén tekintetében⁹⁻¹¹.

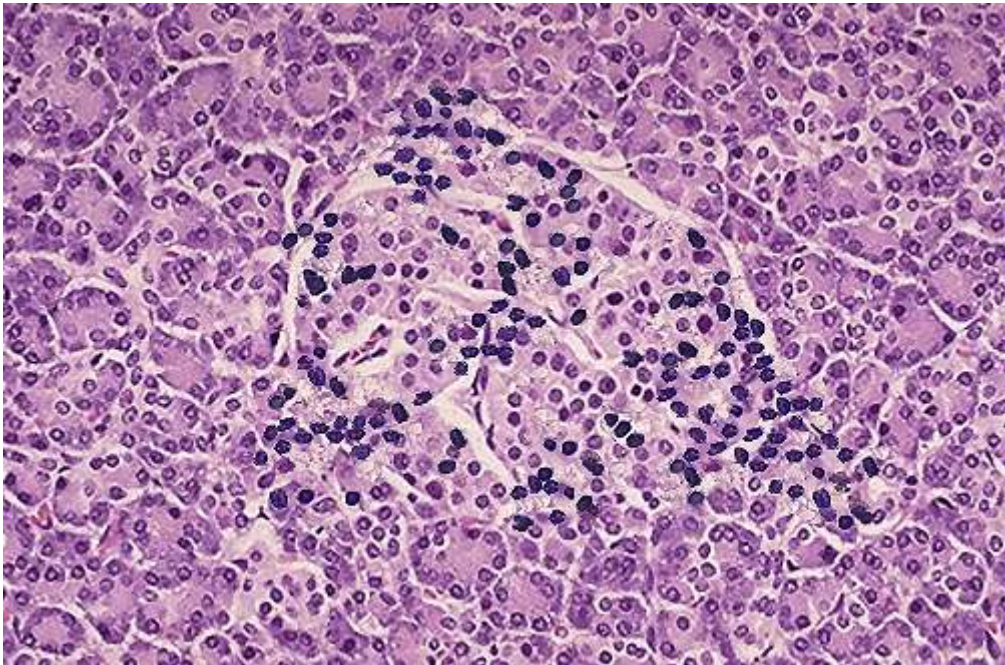
Táplálék allergének

Az elmúlt években felmerült annak a lehetősége, hogy bizonyos táplálékallergének, így elsősorban a tehéntej albumin is kiválthat a Langerhans-szigetek, illetve a béta-sejtek ellen irányuló autoimmun folyamatot. A tehéntej, illetve a tehéntej alapú csecsemőtápszerek jelentik a legáltalánosabb olyan tápanyagforrást, melyek révén a csecsemő elsőként találkozik komplex idegen fehérjékkel. A tehéntej fehérjéi között bizonyítottan jelen van a bovin inzulin, a bovin szérum-albumin (BSA), a kazein és a b-lactalbumin. A tehéntej fehérjéinek többsége az újszülöttek éretlen tápcsatornájának barrierén keresztül a keringésbe kerülve idegen antigénként aktiválja a T- és B-lymphocytákat. Azt, hogy az idegen fehérjekomplexek miként járulnak hozzá a progresszív autoimmun szigetsejt-destrukcióhoz mindezidáig nem sikerült pontosan feltárni az ez irányú vizsgálatok folyamatban vannak¹².

1.5.4 Az autoimmun mechanizmusú diabétesz kialakulásának pathomechanizmusa

A betegség kialakulásának hátterében döntően celluláris immunfolyamatok állnak. Már a prediabeteses stádiumban kimutatható a perifériás vér lymphocytáiban a γ -interferon termelésének – Th1- (T-helper-1) túlsúlyt jelző – dominanciája. A folyamat előrehaladása során a humorális immunválasz beindulása nyomán (valószínűleg

másodlagosan) a pancreas béta-sejtjeinek antigénjei ellen, B-lymphocyták által termelt aktivált autoantitestek jelennek meg a betegek szérumában. A Langerhans-szigetek béta-sejtjeinek közvetlen pusztulását valószínűleg aktivált citotoxikus (CD8+) T-lymphocyták idézik elő. Ez az elmélet állatmodellek alapján született, az emberi T1DM mechanizmusa nagy valószínűséggel hasonló. A sejtpusztulás a Langerhans-sziget többi sejtjét, a glukagont termelő alfa-sejteket, a szomatosztatint szintetizáló delta-sejteket és a pancreaticus polipeptidet képző sejteket nem érinti. Szövettanilag a Langerhans-szigetek lymphocytás infiltrációja mutatható ki (2. ábra). A létrejövő insulitis során a citokin termelés fokozott¹³.



2. ábra A Langerhans szigetek mononuclearis sejtes infiltrációja

<http://library.med.utah.edu>

A kórfolyamatban CD8+ T-sejtes citotoxikus reakció, az apoptózis és a nitrogén metabolitok szerepe egyaránt feltételezhető. Az autoimmun folyamat okozta béta-sejt károsodás nitrogén-monoxid és/vagy reaktív oxigén gyökök képződéséhez, valamint következményes DNS-károsodáshoz vezet. Ez utóbbi a DNS repair enzim aktiválódását váltja ki. Az enzim működése közben nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NAD) használ fel, amely csökkenti az intracelluláris NAD mennyiségét és programozott sejthalálhoz, apoptózishoz vezethet^{13,14}.

A béta-sejtek pusztulásának mechanizmusa

A T1DM patogenezisének egyik ismert modellje szerint az autoimmun folyamat első lépéseként közvetlenül a béta-sejteket éri vírusfertőzés, míg a „molekuláris mimikri modell” szerint a béta-sejt fehérjéihez hasonló aminosavszekvenciával rendelkező vírussal fertőzött sejt (nem a béta-sejt) ellen indul meg a primer immunválasz. A fertőzött sejt felszínén HLA (humán leukocita antigén) I. osztályú molekulával komplexben virális antigének jelennek meg, melyeket a CD8+ T-lymphocyták felismernek. Az elsődlegesen fertőzött vagy vírust fagocitált macrophagok HLA II. osztályú molekuláik révén virális peptideket prezentálnak a CD4+ T-lymphocyták számára. A CD4+ helper T-sejtek egyrészt elősegítik a CD8+ T-lymphocyták citotoxikus effektor sejté válását, másrészt aktiválják a B-sejteket, amelyek autoantitesteket termelnek.

A szigetsejtek pusztulásának két feltételezett mechanizmusa, a *direkt* és az *indirekt* (bystander) killing útvonal.

- A *direkt* béta-sejt pusztulás során az antigén-specifikus CD8+ citotoxikus T-lymphocyták felismerik a béta-sejtek felszínén HLA I. osztályú molekulával komplexben kötött, a virális aminosavszekvenciával rokon autoantigéneket, melynek eredménye bizonyos kostimulátor molekulák (FAS/FASL) felszaporodása. A szignáltranszdukciós kaszkád végén bekövetkezik a béta-sejtek apoptózis általi pusztulása.
- Az *indirekt* útvonal szerint az antigénprezentáló sejtek (macrophagok, dendritikus sejtek) felszínén HLA II. osztályú molekulával komplexben autoantigének prezentálódnak, melyet antigén specifikus CD4+ helper T-lymphocyták ismernek fel. Ennek hatására a kostimulátor molekulák (CD28/CD80) up-regulálódnak, a T-helper és az antigénprezentáló sejtekből pedig különböző citokinek (interferon-gamma, tumornekrózisfaktor- alfa, nitrogén-monoxid) szabadulnak fel, melyek a környező béta-sejtek apoptózis általi pusztulását idézik elő.

A fentiekben említett folyamatokra szövettani bizonyítékot szolgáltat a T1DM kezdeti fázisában észlelt insulitis, melynek során igazolták, hogy a pancreas Langerhans-szigetekben CD8+ citotoxikus, CD4+ helper T-lymphocyták, macrophagok és NK

(natural killer) sejtek halmozódnak fel. A szigetsejtek pusztulását klinikailag az inzulintermelő kapacitás csökkenése, majd megszűnése jelzi.

1.5.5 Az autoimmun diabétesz kialakulásának immunológiai háttere

Az autoimmun mechanizmusú diabétesz kialakulásában a T-sejtes immunitásnak kulcsszerepe van. A CD8⁺ sejtek fontos szerepet játszanak a béta-sejt pusztulás korai és késői szakaszában is¹³⁻¹⁶ azonban a diabetogén folyamatban a CD8⁺ T-sejtek mellett a CD4⁺ lymphocytá szubpopuláció is érintett.

1.5.5.1 A CD3⁺ T-lymphocyták és szerepük az immunfolyamatokban

Az érett T-sejtek felszínén CD3, CD2 és CD7 molekulák expresszálódnak. Mivel a CD2 és CD7 az NK-sejtek többségének felszínén is kimutatható, ezért specifikusan a T-sejt meghatározására a CD3 molekulát használjuk. A CD3⁺ T-sejteken belül két fő csoportot különítünk el: a CD3⁺/CD4⁺ T-helper sejteket, valamint a CD3⁺/CD8⁺ citotoxikus T-sejteket. A CD4⁺ és CD8⁺ sejtek együttes százalékos aránya – néhány százalékos eltéréssel – megadja a CD3⁺ sejtek százalékos arányát, egymáshoz viszonyított arányuk referens egyénekben 2:1.

A CD4⁺ T-lymphocyták szerepe az immunitásban

A CD4⁺ T-helper sejtek a citokin termelésük alapján osztályozhatók Th1 és Th2 csoportokra. A két csoport citokin termelése eltérő. A Th1 sejtekre az IL-12, IFN- γ , IL-2, TNF- α és TNF- β termelés a jellemző, míg a Th2 típusú sejtek többek között IL-4-et, IL-10-et és IL-13-at termelnek. Az eltérő citokin termelésből adódóan a Th1 és Th2 sejtek funkciói is eltérnek egymástól. A Th1 sejtek a celluláris immunválaszt aktiválják, a Th2 sejtek pedig a humorális immunválasz mediálásában játszanak fontos szerepet.

A Th1 sejtek és az általuk termelt citokinek elősegítik a leukociták fokozott megjelenését és aktiválódását a szövetekben valamint aktiválják a makrofágokat. Emellett az IL-2 és IFN- γ aktiválja a citotoxikus T-sejteket, amelyek elpusztítják a megfelelő MHC kapcsolt antigént expresszáló sejteket. Végül aktiválják a természetes ölő sejteket is melyek MHC-től függetlenül pusztítják el a cél sejteket.

A Th sejtek egymás működésére is hatással vannak. A Th1 eredetű IFN- γ gátolja a Th2 eredetű citokinek (IL-4 és IL-10) termelését. A Th2 eredetű IL-10 egyik legfontosabb hatása pedig az, hogy erőteljesen gátolja a Th1 sejtek citokin termelését.

A CD8+ T lymphocyták szerepe az immunitásban

A felszínükön CD8 markert expresszáló lymphocyták egyik csoportja - az úgynevezett killer sejtek - felismerik és elpusztítják elsősorban az intracelluláris kórokozókkal fertőzött sejteket. Másik csoportjának regulátoros vagy szupresszor funkciója van, amelynek során más lymphocytákat akadályoz meg abban, hogy az egészséges szöveteket elpusztítsák. Ezek a T-lymphocyták a regulátoros vagy szuppresszív T-lymphocyták csoportjába tartoznak.

A regulátoros T-sejtek szerepe az autoimmun válasz kialakulásában

Az autoimmun válasz kialakulásában - jelenlegi ismeretek alapján - az úgynevezett regulátoros T-sejtek defektusa fontos szerepet játszik. A regulátoros T-sejtek legelfogadottabb markereinek tekintik a CD25 (cluster of differentiation 25, amely az interleukin-2 receptor egyik alegysége) nagy mennyiségben való megjelenését a sejt felszínen illetve egy transzkripciós szabályozó protein (Foxp3) jelenlétét a sejtben. Ezek a regulátoros sejtek elsősorban a T-sejtek CD4+ T-helper csoportjához tartoznak de CD8+, illetve egyéb T-sejt alcsoportok is betölthetnek regulátoros funkciót. A regulátoros T-sejtek 3 szubpopulációját ismerjük:

- a természetes CD4+ CD25+ regulátor T-sejtek (nTreg),
- az indukált Th1
- és az indukált Th3-sejtek.

Az nTreg-sejtek csökkentik a CD4+ és CD8+ T-sejtek proliferációját és citokin termelését. A regulátoros sejtek képesek lehetnek az immunválaszt sejt (Th1) vagy humorális (Th2) irányba terelni, habár a legtöbb tanulmány elsősorban a sejt immunválaszt gátló hatásukat emeli ki¹⁶⁻²¹.

1.5.5.2 Th1/Th2 egyensúly eltolódás autoimmun diabéteszben

T1DM-ben a Th1/Th2 egyensúly a Th1 irányába fordul. Ezt a teóriát támogatják azok az egyre gyarapodó bizonyítékok, amelyek szerint feltehetően CD8+ citotoxikus T-sejtek és makrofágok vesznek részt a béta-sejtek közvetlen destrukciójában (insulitis). A CD8+ citotoxikus T-sejtek az inzulintermelő sejteket a sejhártyájukon pórusok kialakításával, illetve citokinek segítségével pusztítják el. Humorális immunválasz, illetve funkcionáló B-sejtek nem szükségesek a T1DM kialakulásához, amit alátámaszt az is, hogy agammaglobulinaemiás gyermekben is észleltek már teljesen kifejlődött T1DM-et. A regulátoros T-sejtek illetve a már korábban említett Th2 típusú citokineket termelő CD4+ T-sejtek csökkent működése is elengedhetetlen az autoimmun folyamat beindulásában^{15,16}.

Th1/Th2 egyensúly eltolódás esetén az autoreaktív Th1 T-sejtek aktiválódnak és beindítják a béta-sejt pusztulást. Ezek a Th1 sejtek aktiválják továbbá a B-sejtek IgG2a típusú autoantitest termelését a béta-sejtek autoantigénjei ellen. A béta-sejtekkel szembeni saját tolerancia fenntartásában a CD4+ Th2 típusú sejteknek a szerepe jelentős, mert gátolják az autoreaktív Th1 sejtek aktivációját. A Th2 sejt mediálta immunreguláció elvesztése az autoreaktív folyamatok aktiválódásához vezet és kialakul az T1DM. Az autoimmun diabetesre hajlamos egyedekben tehát sokkal jelentősebb a Th1 típusú celluláris immunválasz, mint a humorális komponens¹⁶⁻¹⁸.

1.5.6 Humorális autoimmun markerek T1DM-ben

Az autoantitest-meghatározás elsősorban a cukorbetegség klasszifikációjában nyújthat segítséget. A prediabétesz stádiumban az immunológiai zavar jeleként a még nem cukorbeteg egyén szérumában specifikus autoantitestek jelennek meg, mások csak később detektálhatóak. Jelenlegi ismereteink szerint a legfontosabb autoantitestek a következők (1. táblázat):

1. Szigetsejt elleni citoplazmatikus antitest (ICA):

A frissen diagnosztizált diabetes eseteinek 80%-ban pozitív. Az izolált ICA-pozitivitás – mely általában alacsony titerű – nem társul fokozott diabetes-hajlammal, és független

a T1DM-re hajlamosító genetikai tényezőktől (HLA, inzulingén). A magas ICA-titert azonban legtöbbször egyéb béta-sejt specifikus autoantitest kíséri, mely a prediabéteszes stádiumot jelzi.

2. *A glutaminsav-dekarboxiláz ellenes antitest (GADA):*

A GAD65, egy 65 kD molekulatömegű glutaminsav-dekarboxiláz ellen képződik. A GAD65 génje a 10-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el (10p11), többek között a hasnyálmirigyben expresszálódik, és a gamma-aminovajsav (GABA) képződését katalizálja. A termelődött GABA gátolja a hasnyálmirigyben az inzulin és a glukagon szekrécióját. A fehérje aminosavszekvenciája hasonlít a Coxsackie B4 vírus fehérjéjére (PEVKEK szekvencia), amely alapul szolgálhat a molekuláris mimikrihez. A GADA az újonnan diagnosztizált T1DM-betegek 60–80%-ában pozitív. Gyakrabban fordul elő HLA DR3-DQ2 hajlamosító genotípusok esetén, valamint férfiaknál. Fiatal felnőttkorban látens módon kezdődő 1-es típusú diabetes (LADA) immunszerológiai markerének tekinthető.

3. *Az inzulinellenes antitest (IAA):*

A frissen felfedezett T1DM esetek 30–50%-ában van jelen; általában ötéves kor előtt alakul ki, az idősebb korban manifesztálódó 1-es típusú diabéteszben ritkább. Autoantigénként az inzulin szerepel. Az autoantitestek közül az inzulin elleni autoantitest jelenik meg a legkorábban, így ez tekinthető az első kimutatható jelnek a szigetsejt elleni autoimmunitás megindulásakor. Az IAA-pozitivitás kialakulásának elősegítésében központi szerepe van a hajlamosító genetikai háttérnek. Az IAA megjelenését az INS (inzulin gén) lókusszal együtt additívan befolyásolják a következő genetikai faktorok: HLA DR4-DQ8 és PTPN22 1858TT genotípus. Az IAA megjelenése azért döntő jelentőségű a béta-sejt elleni autoimmunitás kialakulásában, mert feltételezhetően a nagy affinitású IAA jelenlétéhez köthető a későbbi multiplex autoantitestek megjelenése (IAA, GADA, IA-2A együttes előfordulása), ami igen nagy kockázatot jelent diabétesz felé irányuló progresszióra. Az IAA-affinitás nem az antitesttiterrel, hanem az életkorral mutat összefüggést. Minél fiatalabb életkorban jelenik meg először az IAA, annál nagyobb az affinitás és egyben a multiplex autoantitestek képződésének kockázata. Azon személyeknél, akiknél több autoantitest is

pozitív (ami az autoimmun béta-sejt pusztulás markere), a T1DM diagnózisa utáni első év végén alacsonyabb a C-peptid szintje, magasabb a HbA1c értéke és nagyobb az inzulinigény. Ez egyértelműen rosszabb reziduális béta-sejt működést tükröz.

4. *A tirozin-foszfátáz ellenes antitest (IA-2A):*

Az endokrin szervekben expresszálandó tirozin-foszfátáz (IA-2) ellen képződik. Az újonnan diagnosztizált T1DM-betegek 60–70%-ban pozitív. Megjelenése általában késői prediabetesben következik be. A manifeszt diabetes kialakulására erősen prediktív értékű, különösen akkor, ha az adott személy a HLA DR4-DQ8 genetikai hajlamosító faktort is hordozza. Prospektív tanulmányok megfigyelései szerint a humorális autoimmun válasz egyik epitópról másokra terjedése (vagyis újabb autoantitestek megjelenése) rövid időintervallumon – hónapokon – belül zajlik. A tartósan fennálló egyszeres béta-sejt elleni autoantitest-pozitivitás az ártalmatlan, nem progresszív autoimmunitás jelének tekinthető. A humorális markerek alkalmasak a klinikai betegség felé irányuló progresszió nyomonkövetésére, mivel a magasabb autoantitest titer és a többszörös autoantitest-pozitivitás nagyobb kockázatot jelent az 1-es típusú diabetes kialakulására. Az antitestek típusa és titere alapján prediktív modellek léteznek a diabetes előrejelzésére, melyek a klinikai gyakorlatban is jól hasznosíthatók.

	ICA	GADA	IAA	IA-2A
Antigén	GAD65, GM2-1 és számos ismeretlen fehérje	GAD65= glutaminsav-dekarboxiláz (OMIM*138275)	Inzulin	Tirozin-foszfataz (OMIM*601773)
Vizsgálómódszer	Indirekt immunfluoreszcencia	Immunprecipitáció	RIA	RIA, immunprecipitáció
Szenzitivitás	~ 80%	60-80%	30-50%	60-70%
Specifitás	98%	98%	98%	100%
Összefüggés genetikai faktorokkal	Alacsony titerben: független Magas titerben: HLA DR3/DR4	HLA DR3, DQ2	- INS (-23) HphI AA - HLA DR4, DQ8 - PTPN22 1858TT	- HLA DR4, DQ8 - INS (-23) HphI AT/TT
Jelentősége	Alacsony titerben (<20 JDFU) nem kóros Magas titerben multiplex β -sejt-ellenes autoimmunitással társul, diabetesre prediktív	Tartósan fennmarad, a diagnózist követően évekig perzisztálhat	Legkorábban kimutatható A későbbi multiplex autoantitest-képződés prediktora Az INS-dependens útvonal markere	Késői prediabetesben jelenik meg A diabetes prediktora

1. táblázat

A fontosabb béta-sejt specifikus autoantitestek jellemzőinek összehasonlítása²³.

Ezek az antitestek fontos jelzői a betegekben zajló autoimmun gyulladásnak, de úgy tűnik közvetlenül nem okai a béta-sejtek pusztulásának, mert azt a T-lymphocyták okozzák. A béta-sejtek pusztulása döntően a celluláris, kevésbé a humoralis immunválasz eredményeképpen jön létre.

Az autoantitest negativitás nem zárja ki mindig az autoimmun eredet lehetőségét: a még kisgyermekkorban kezdődő, klinikailag egyértelműen autoimmun mechanizmusú 1-es típusú cukorbetegség esetén is körülbelül 10%-ban nem tudunk autoantitestet kimutatni. Ennek hátterében állhat az, hogy a szervezetben olyan autoantitest van jelen, amelyet még nem ismerünk, illetve, hogy a vizsgált autoantitest titerre olyan kicsi, hogy nem észleljük. Előfordulhat továbbá, hogy mivel az autoantitest megjelenése a kórlefolyás során változik, az adott időszakban még nincs vagy csak alacsony titerben van jelen ezért nem mérhető. Az autoantitestek nem elsődlegesek a folyamatban, inkább kísérik azt. Gyermekkorban 1A típusú diabetes diagnózisakor leginkább IAA majd ICA és/vagy GADA és vagy anti-IA-2A pozitivitást, felnőttkorban kezdődő autoimmun diabetesben inkább az ICA és vagy GADA kimutathatósága jellemző.

Fontos megjegyezni, hogy szigetsejt ellenes antitestek néha más autoimmun endokrin kórképekben (pl. Hashimoto thyreoiditis, vagy az autoimmun Addison-kór, autoimmun polyendokrinopathia) is kimutathatóak²²⁻²⁵.

1.5.7 Az autoimmun mechanizmusú diabétesz és a társbetegségek

Az autoimmun mechanizmusú diabéteszhez gyakran társul egyéb szervspecifikus betegség. Leggyakrabban az autoimmun pajzsmirigy betegségek (Hashimoto-thyreoiditis, Basedow- kór) társulnak T1DM-el, ezért ezen a betegségek irányában gyakorlat a rendszeres szűrés. A coeliakia, az Addison kór is gyakoribb az 1A típusú cukorbetegségben. A polyendocrin autoimmun szindróma (PAS) I-nek ritkábban, a II-es típusú PAS-nak gyakrabban része az autoimmun mechanizmusú diabétesz. Neuroendokrin kórképek gyakoriságát tekintve leginkább a depresszió, a skizofrenia előfordulási gyakorisága nőtt meg T1DM-ben de a legújabb kutatások szerint a T1DM fokozza az Alzheimer-kór kialakulásának valószínűségét is^{1,26}.

1.5.8 A T1DM gyógyszeres kezelése

Az 1-es típusú cukorbetegség alapvető kezelési módja az inzulinsubsztitúció. Az inzulinkezelés az élettani viszonyok lehetőség szerinti megközelítésére törekszik: vagyis a közel normoglycaemiás anyagcsere-vezetésre és ezzel a késői micro- és macroangiopathiás szövödmények megelőzésére. Az 1-es típusú cukorbetegségben ezért az elsőként választandó kezelési forma az intenzív inzulinkezelés valamelyik változata. Az inzulinkezelés, az inzulinhiányt megszünteti azonban a pathológiai folyamatra nincs hatással. A legújabb kutatások az immunterápia segítségével megelőzhető vagy megakadályozható autoimmun folyamatokra irányulnak.

Felmerült, hogy a betegség korai fázisában a lymphocyták felszínén expresszálódó CD3+ antigén elleni monoklonális antitest alkalmazásával megakadályozható a további béta-sejt pusztulás progressziója. A T-sejtek tekinthetőek az anti-CD3-antitest fő célpontjának; a kezelés során a keringő T-lymphocyták felszínéről átmenetileg eltűntek a CD3-komplexek, megfordult a CD4+/CD8+ sejtek

aránya, emelkedett a szérum TNF-alfa-, INF-gamma-, IL-6- és IL-10-tartalma. A vizsgálatok szerint a CD3+ elleni antitesttel kezelt betegeknél szignifikánsan kisebb lett az inzulinigény, ami nagyobb működő béta-sejt állomány fennmaradására utal¹.

1.6 A 2-es típusú diabétesz

A cukorbetegség típusai közül a T2DM a leggyakoribb forma. Kialakulásában a genetikai tényezők mellett a környezeti hatásoknak is szerepe van. A betegek jellegzetesen túlsúlyosak, típusos esetben elhízottak, jellemző a hasra lokalizálódó, abdominális típusú elhízás, a normális testalkat azonban nem zárja ki a T2DM-et.

Kórlefolyása

Progresszív, lassú, gyakran tünetszegény és fokozatos. Perifériás inzulinrezisztencia kialakulásával, a béta-sejt inzulin szekréciójának csökkenésével, a máj fokozott glükóz termelésével jár együtt. A T2DM betegeknél a cukorbetegség felismerésének időpontjában már kimutatható részben az inzulinrezisztencia, részben a béta-sejt funkció romlása. Az inzulinrezisztencia, ha a beteg fizikai állapota nem változik, nagyjából állandó szintű, míg a béta-sejt funkcionál progresszív romlás várható. Erre utal, hogy a betegség előre haladtával a hyperinsulinaemia megszűnik és a szénhidrát anyagcsere fokozatosan romlik.

Klinikai tünetek, szövődmények T2DM-ben

A diabéteszes anyagcserezavar jellegzetességeiből adódóan a klinikai tünetek hyperglycaemia, glucosuria, osmoticus diuresis, bőrtünetek illetve a szív és érrendszeri valamint a metabolikus szindróma egyéb tüneteinek formájában előbb-utóbb megjelennek. A betegség klinikai súlyát többek között a társuló cardiovascularis szövődmények adják. A keringési kockázat akkora, mint infarktuson már átesett

egészséges anyagcseréjű, nem cukorbeteg személyeké. A T2DM kórlefordulása során a macroangopathiás szövődmények már egészen korán, még a csökkent glükóztolerancia stádiumában megjelenhetnek és a microangiopathiás szövődmények is kialakulhatnak. A retinopathia, nephropathia és a neuropathia diabetica megjelenési formái nem különböznek az 1-es típusú diabéteszben észleltektől, csupán az előfordulásban, illetve az egyes kórformák gyakorisága között van különbség a két típus között². A ketoacidosis és a ketoacidotikus kóma önmagában nem jellemző a T2DM-re de társuló kórképek (pl. fertőzés) esetén oly mértékű anyagcsere kisiklás jöhet létre, hogy a betegnél ketoacidosis alakulhat ki. Idősebb korú 2-es típusú cukorbeteg esetében hyperosmolaris, nem ketoacidotikus kóma is kialakulhat¹.

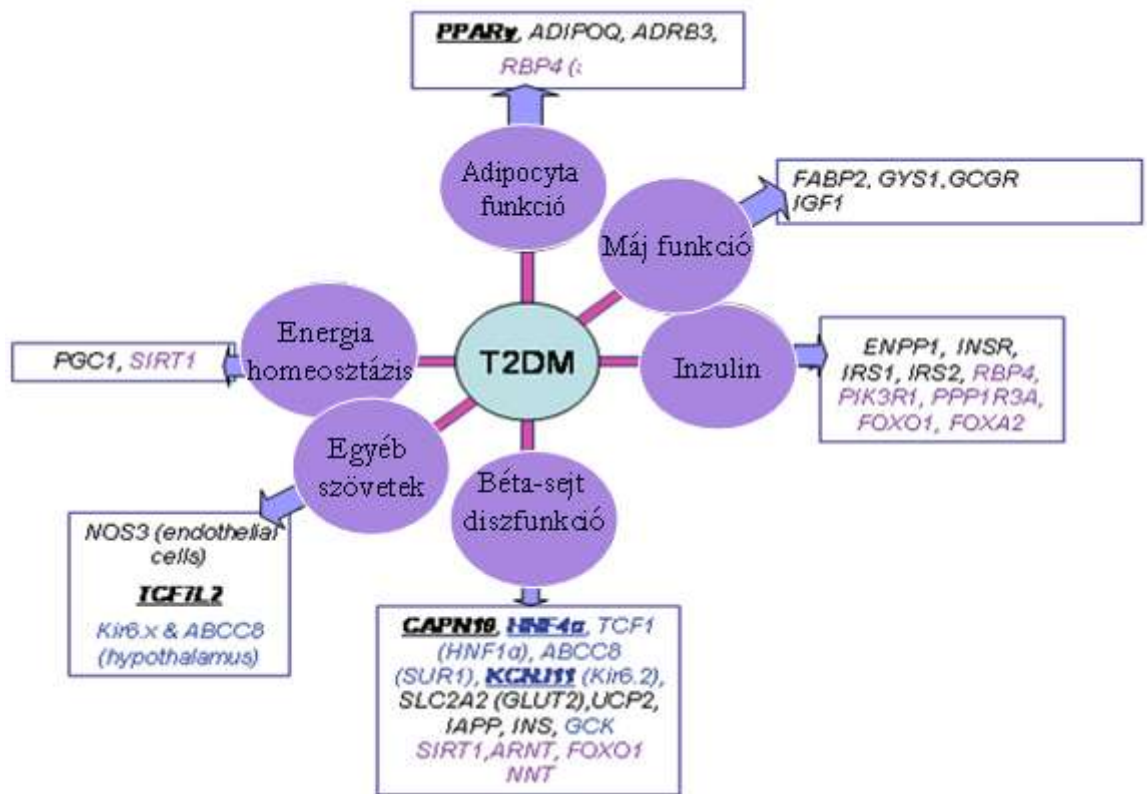
1.6.1 A T2DM epidemiológiája

A 2-es típusú diabéteszben szenvedők száma a teljes cukorbeteg népesség döntő hányadát alkotja. Ez a diabétesz típus az összes ismert eset mintegy 85-90%-át jelenti. A T2DM prevalenciájának adatai népesség - és életkorfüggők. Európa országaiban a gyakoriság 3-5%, Magyarországon 4-5%. Ez a diabétesz típus jellegzetesen felnőtt- vagy időskorban kezdődik, azonban ma már ez a korhatár egyre inkább elmosódik, hiszen egyre gyakrabban jelentkeznek túlsúlyos fiatalok között is.²⁷

1.6.2 A T2DM kialakulásának rizikófaktorai

Genetikai tényezők

A betegségre való hajlam több kandidáns gén mutációjához kötött. A humán genetika vizsgálatok által legjobban alátámasztott, a T2DM kialakulásának nagy rizikóját hordozó kandidáns gének a PPAR-gamma (peroxisome proliferator activated-receptor gamma), KCNJ11 (potassium inwardly-rectifying channel J11), CAPN10 (calcium-activated neutral proteinase 10), HNF4A (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha), TCF7L2 (transcription factor 7-like 2) gének. Egyéb gének, mint az ENPP1, INSR szintén ígéretesnek tűnnek a T2DM genetikai vizsgálatában²⁸ (3. ábra).



3. ábra Számos gént és génpolimorfizmust hoztak már kapcsolatba a 2-es típusú cukorbetegséggel. Az ábrán a kulcs gének illetve a betegség kialakulásában részt vevő lehetséges, kutatás alatt lévő gének és a működésük kapcsán érintett szövetek, szervek, fehérjék vannak feltüntetve²⁸. A jelentősebb gének nevükkel együtt a szövegben is feltüntetésre kerültek a többi gén a rövidítések jegyzékében található meg.

A legújabb kutatások eredményeképpen jelenleg 60-ra tehető a betegséggel kapcsolatba hozható gének száma²⁹.

Környezeti hatások

A három környezeti hajlamosító tényező (fizikai aktivitás hiánya, az étrend mennyiségi és minőségi összetétele, illetve az elhízás) elkülönített vizsgálata meglehetősen nehéz, hiszen az ülő életmódot folytató emberek általában elhízottak és az elhízás gyakran kapcsolódik kalóriadús étkezéshez. A nyugati társadalmakban a diabétesz növekvő prevalenciája mindhárom tényezővel összefügg.

➤ *Fizikai aktivitás:*

A fizikai tevékenység még testsúlycsökkentés nélkül is akár 50%-kal mérsékli a magas inzulinszintet. Preventív szerepe van az izomzatban lezajló aerob, „antidiabeticus” folyamatok-, a csökkent glükóz-tolerancia-, és így a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásában. A fizikai aktivitás hatása független a BMI-től, a diabétesz családi előfordulásától és a nemtől. A rendszeres torna leginkább a hasi zsírszövet redukcióját eredményezi, amely széruminzulin-és lipid szintekre kedvező hatású.

➤ *Az étkezés:*

Eddig még egyetlen táplálékféleségről sem lehetett bebizonyítani, hogy diabetogén hatású lenne. A telített zsírok bőséges fogyasztása kedvezőtlenül befolyásolja a vérlipidek szintjét, inzulinrezisztenciát okoz, és így szerepet játszhat a cukorbetegség kialakulásában. A rostús étrend protektív hatású.

➤ *A nem és az életkor szerepe:*

Az életkor előrehaladtával a cukorbetegség prevalenciája nő. A magasabb életkor inzulin rezisztenciával jár, továbbá valószínű, hogy a korrallal járó csökkent fizikai aktivitás, az étrendi tényezők és az endogén inzulinszekréció csökkenése is hozzájárul idős korban a diabétesz gyakoriságának fokozódásához. Egyes népegekben a nők 2-es típusú cukorbetegsége dominál, másokban a férfiaké¹.

1.6.3 A T2DM kialakulásának patomechanizmusa

A 2-es típusú diabétesz kialakulásában a normál glükózanyagcserétől a csökkent glükóztolerancián át a manifeszt diabétesz kialakulásáig vezető úton végig az inzulinrezisztencia (zsírszövet, máj, izom) dominál, amelyet a béta-sejtek kezdetben fokozott inzulintermeléssel képesek kiegyenlíteni. Kezelés hiányában a béta-sejtek kimerülnek és a beteg inzulinhiányossá válik.

Az inzulinrezisztencia és a következményes hyperglükémiás állapot hátterében részben az elhízás másrészt az adipocyták méretének növekedése állhat. Az inzulin célszervei a zsírszövet, az izomszövet és a máj. Az inzulinrezisztencia ezekben a

szervekben, szövetekben alakul ki. A szövetek érintettsége nem egyidejűleg, hanem bizonyos sorrendben jelenik meg. Primer eltérés a zsírszövet inzulinrezisztenciája, következményes másodlagos jelenség az izomszövet és a máj inzulinrezisztenciája.³⁰⁻³²

1.6.4 A T2DM gyógyszeres kezelése

A betegség kezelésére alkalmazott hagyományos gyógyszer csoportok:

- *Inzulin sensitizer* gyógyszer csoportok: biguanidok, tiazolidindionok. Csökkentik a hepatikus glukoneogenezist és fokozzák a perifériás szövetek inzulinérzékenységét csökkentve így az inzulinrezisztenciát;
- *Inzulinszekréción fokozó szerek* a szulfonilureák, glinidek;
- Szénhidrátok emésztését lassító *alfa-glükozidáz-gátlók*;
- az entero-inzuláris tengelyre ható gyógyszer csoportok:
 1. az inkretinhatás-fokozó *gliptinek*, amelyek a dipeptidyl peptidáz-4 enzim gátlásán alapulnak. A DPP-4 enzimdegradáló hatásának kiiktatásával az étkezés hatására szekretálódó glucagon like peptide-1 (GLP-1) tartós hatása biztosítható. Nagy előnye a korábbi antidiabetikumhoz képest, hogy a testsúlyt nem növelik és nem hypoglikemizálnak^{1,33-35}. Magyarországon jelenleg négy DPP-4 gátló szer (sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, linagliptin) van forgalomban.
 2. Az *inkretin mimmetikumok*, a GLP-1-agonisták, amelyek a postprandialis inzulinszekréción növelésével csökkentik a glukagonelválasztást, lassítják a gyomorürülést és béta-sejt protektív hatással rendelkeznek^{1,36-38}. Magyarországon jelenleg az exenatid és a liraglutid készítmények vannak forgalomban.

1.7 A szénhidrát anyagcsere folyamata, az enteroinzuláris szabályozás

A szénhidrát anyagcsere folyamata

Szénhidrát bevitel hatására a vércukorszint emelkedik, amely fokozza a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben az inzulin elválasztását. Az inzulin közvetlenül a portális vénán keresztül a májba jut, ahol hatására a glikogénbontás csökken, a glikogénszintézis fokozódik így mérsékelve a májbéli glükóz termelést. A perifériás keringésbe kerülve az inzulin fokozza a glükóz felhasználást elsősorban az izomban. A folyamat eredménye során létrejövő csökkenő vércukorszint mérsékli az inzulin termelést és helyreáll az egyensúlyi állapot.

1.7.1 Az enterohormonok és szerepük a szénhidrát anyagcsere folyamatban. Az inkretinek

A vércukorszint megfelelő szabályozásához számbelileg és funkcionálisan is ép hasnyálmirigy béta-sejtekre, jól működő máj- és izomsejtekre van szükség. A vércukorszint regulációjában a béta-sejt glükóz szenzorának (a glukokináz enzimnek), az ezt követő jelátvitelnek, az inzulinmolekulának, a perifériás inzulinhatásnak (inzulin receptor, a jelátviteli kaszkád, a glükóz sejtbe jutását lehetővé tevő transzporterek, a glikogén szintetáz enzim, sőt a lipoprotein lipáz enzim) van alapvető szerepe. Az inzulin korai elválasztásának fokozásáért az inkretinek felelősek.

Az inkretinek

Az inkretin hormonok a normális vércukorszint-szabályozás alapvető tényezői. Többszörös hatásmechanizmussal képesek befolyásolni a glükóz homeosztázist:

- a glükózfüggő inzulinszekréció fokozásával,
- a glukagon-elválasztás posztprandiális gátlásával,
- a gyomorürülés lassításával,
- a táplálékfelvétel csökkentésével.

Fokozzák:

- az inzulin bioszintézist,
- a béta-sejt proliferációt.

Gátolják:

- a béta-sejt apoptózist.

Az inkretinek az elfogyasztott táplálék döntően szénhidrát komponensének hatására szabadulnak fel a vékonybél úgynevezett open-type típusú enterokromaffin sejtjeiből és inzulin szekréciót fokozó hatásuk révén felelősek a korai inzulinelválasztás több mint 2/3-áért. Az inkretin hatásért két hormonszerű peptid: a GLP-1 és a glükózdependens inzulinotrop peptid (GIP) felelősek. Félélettidejük mindössze néhány percre tehető, mert a felszabaduló hormonokat a dipeptidyl peptidáz-4 enzim nagy sebességgel bontja. A GIP koncentrációja étkezés után 5-10-szeresére a GLP-1 koncentrációja mindössze bazális szintjének 2-3-szorosára emelkedik³⁹⁻⁴¹.

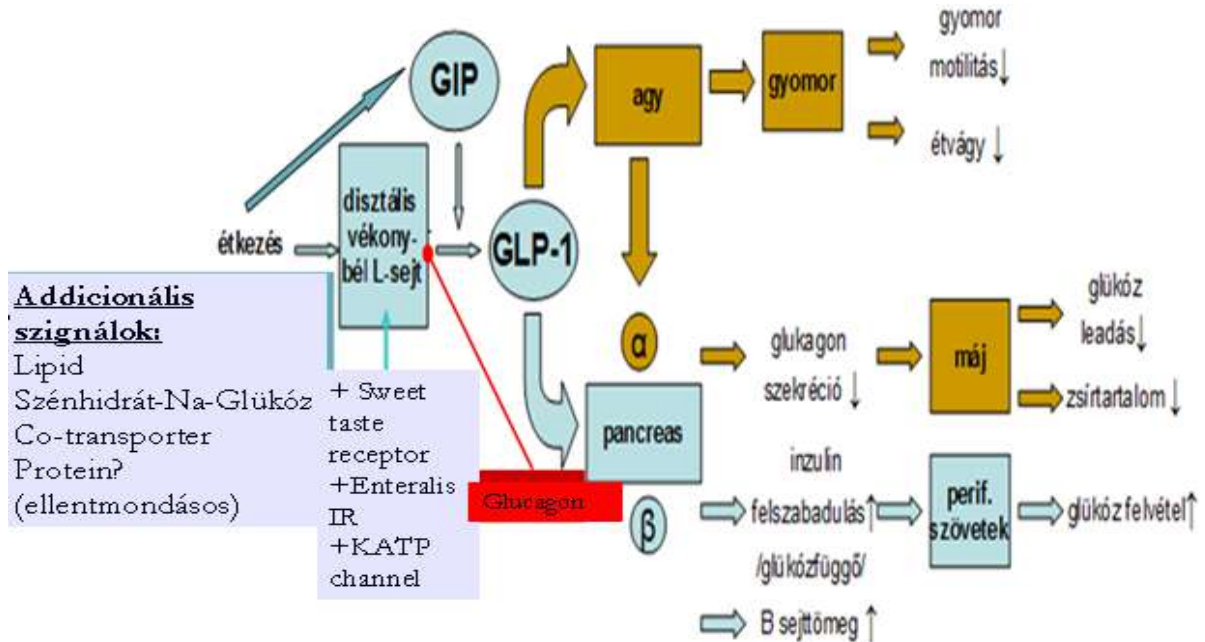
Az inkretin hatás

Az inkretin hatás azon a megfigyelésen alapszik, hogy azonos mennyiségű glükóz per os és intravénás alkalmazása egymástól jelentősen eltérő inzulinszekréciót eredményez. A szájon keresztüli glükóz bevitel után számottevően több inzulin kerül a keringésbe, mint intravénás bevitelt követően. Ez az inkretinek által közvetített hatás felelős a korai inzulin elválasztás 50-70% -ért. A GLP-1 inzulinszekréciót stimuláló hatása markánsabb, mint a GIP hatása. Az inkretin hatás T2DM-ben károsodott, döntően a GLP-1 hatásának csökkenése miatt.^{39,43,44}

1.7.1.1 A GLP-1 hormon élettani szerepe

A GLP-1 hormon a vékonybél disztális (ileum) illetve a vastagbél proximális szakaszán, a bélnyálkahártya specifikus, úgynevezett open-type enteroendokrin L-sejtjeiből, szénhidrát illetve lipidet tartalmazó ételek fogyasztásakor szabadul fel. Féléletideje mindössze 1-2 perc, plazmakoncentrációja 20-30 perccel a táplálék elfogyasztása után megemelkedik. Maximumát étkezést követő 60. percben éri el. A hormon mintegy felét az L-sejtek közvetlen közelében található kapilláris membrán endothel felszínén lévő DPP-4 enzim szinte a szekréció pillanatában parakrin módon bontja. Plazmakoncentrációjának korai emelkedéséért - amikor a táplálék a disztális vékonybélrendszert még nem érte el - a vékonybél proximális részén felszabadított GIP illetve az annak L-sejtekre kifejtett hatása felelős. A véráramba kerülő GLP-1-et a specifikus GLP-1 receptor köti meg, mely megtalálható többek között az alfa- és béta-sejteken, a gyomor-, vékonybél nyálkahártyájának sejtjein, a myocardium izomsejtjein, a hypothalamus neuronjain és az agy számos régiójában^{39,42}.

A GLP-1 a GIP-hez hasonlóan glükóz függő módon fokozza az inzulin bioszintézisét, az inzulinszekréciót, a glükokináz aktivitást és a GLUT2 glükóztranszporter expressziót is a béta-sejtekben (4. ábra).



4. ábra Az inkretinek élettani hatásai.

Az inkretinek a vércukorszint szabályozás alapvető tényetői. A GLP-1 hormon étkezés hatására szabadul fel a disztális vékonybél L-sejtjeiből. Hatására fokozódik az inzulin bioszintézis és szekréció. Ezzel párhuzamosan csökken a glukagon szekréció és hepaticus glükóz kibocsátás melynek következtében megnő a perifériás szövetek glükózfelvétele és csökken a posztprandiális vércukorszint. *Forrás: saját ábra*

1.7.1.2 A GIP hormon élettani szerepe

A GIP a duodenum és a jejunum open-type enteroendokrin K-sejtjeiből szekretálódik. A szekréciót a GLP-1-hez hasonlóan itt is az enterálisan bevitt glükóz és lipidek stimulálják^{53,54}. A GIP-et az endotheliumban megtalálható DPP-4 a 2. és 3. aminosav között hasítja és bontja. Féléletideje fiziológiai körülmények között 5-7 perc. A degradációs termék a GIP₃₋₄₂ inaktív, nem stimulálja az inzulin elválasztást. A GIP összes hatása a GIP receptoron keresztül érvényesül, amely leginkább a pancreas alfa- és béta-sejtjein, a felső gastrointestinalis traktusban, adipocyták felszínén, a mellékvesekéregben, az agy különböző régióiban leginkább a hipofízisben található meg³⁹⁻⁴².

1.7.2 A DPP-4 és szerepe a szénhidrát anyagcsere folyamatban

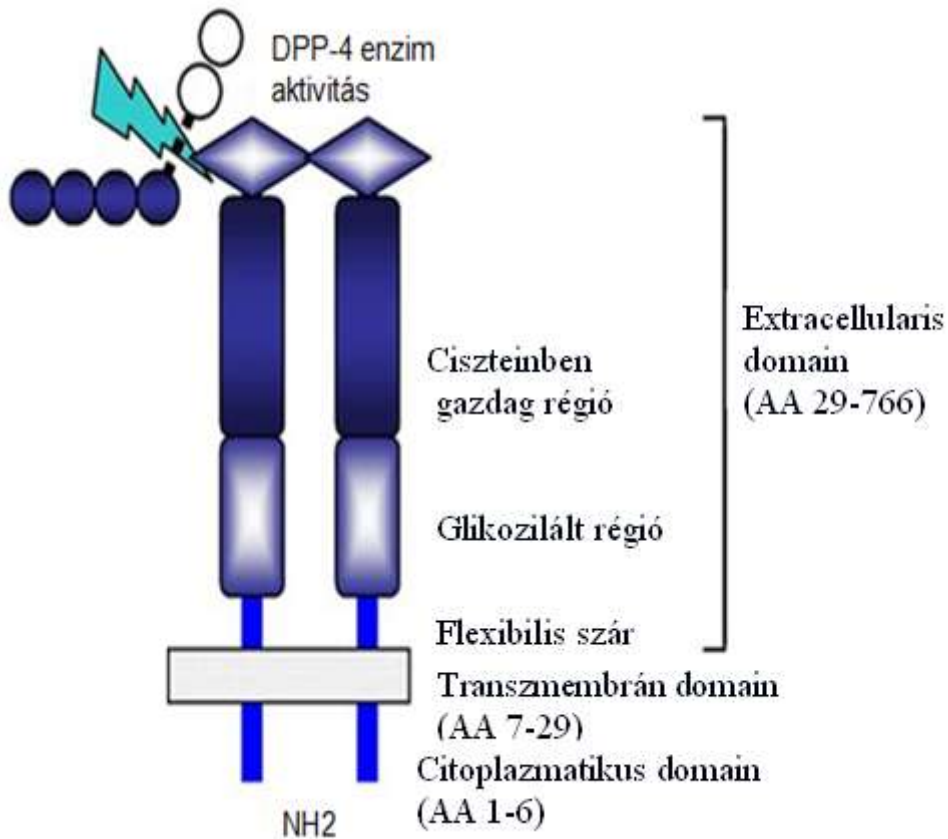
A DPP-4 fehérje

A humán DPP-4 gén által kódolt fehérje a DPP-4 enzim, lymphocyták felszínéhez kötött CD26 (cluster of differentiation 26) molekulaként illetve adenosine-desaminase (ADA) complexingprotein 2 fehérjeként is ismert. Szolubilis és membránhoz kötött formában fordul elő a szervezetben^{45,46,47}.

- Szolubilis formában a vizeletben, nyálban, szérumban található.

A DPP-4 fehérje dimer formában aktív. A DPP-4 monomer formában mintegy 220-240 kDa molekulatömegű, míg egyes esetekben akár 900 kDa molekulatömegű komplex-szé is összekapcsolódhat.

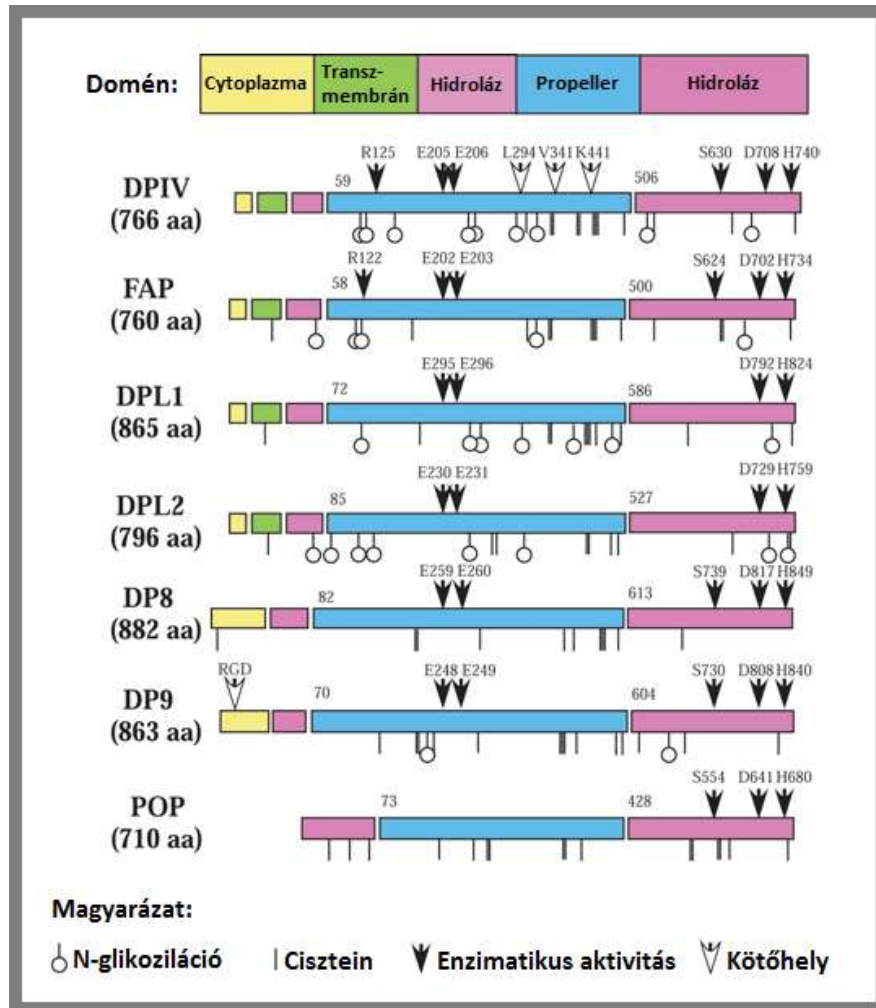
- Membránokhoz kötött formában leginkább az epekanalikulusokban, vékonybélben, vesében, endothelsejtek, cytotrophoblastok, hepatocyták, lymphocyták (CD26) felszínén expresszálódik. A membránhoz kötött DPP-4 molekula a 2-es típusú transzmembrán glikoproteinek családjába tartozó szialoglikoprotein, amely többek között csekély szerin-proteáz aktivitással is rendelkezik. A DPP-4 egy hidrofób hélix láncsal kötődik a membránhoz, melynek rövid N-terminális vége intracitoplazmatikus elhelyezkedésű. Az enzim specificitására jellemző, hogy minél hosszabb a peptidlánc, annál kevésbé prolinespecifikus az enzim, valamint annál gyorsabban hidrolizálja a szubsztrátot^{45,46}(5. ábra).



5. ábra A membránhoz kötött humán CD26 molekula sematikus struktúrája⁴⁸.

1.7.3 A DPP géncsalád

A DPP-4 a POP (prolyl oligopeptidase) család tagja, amely a szerin proteázok egyik alcsaládját képezi. A szerin proteáz géncsaládba tartozik maga a DPP-4, a fibroblast aktivációs protein (FAP), a DPP-8 és a DPP-9, a DPL1 (dipeptidyl peptidase like 1) és DPL2 dipeptidyl peptidase like 2) valamint a POP fehérje. Ezek közül a DPP-4, a FAP a DPP8, DPP9 és a POP különleges szubsztrát-specifitással rendelkező enzimek, amelyek a fehérjék N-terminális végéről képesek a prolint vagy alanint követő kötés hidrolízisével egy dipeptidet lehasítani. A géncsalád további két tagja DPL1 és DPL2 enzimaktivitással nem rendelkező molekulák (6. ábra).



6. ábra Domain homológia a DPP családon belül. A DPP családba tartozó gének és a POP (prolyl oligopeptidase) alcsalád génje⁴⁵.

A DPP-4 géncsaládba tartozó, enzimaktivitással rendelkező fehérjék jellemzőit az alábbi táblázat foglalja össze (**2. táblázat**).

Jellemzők	DPP-4	FAP	DPP-8	DPP-9
H-Gly-Pro kötés hidrolízise	igen	gyenge	igen	igen
H-Gly-Ala kötés hidrolízise	igen	igen	igen	igen
H-Gly-Arg kötés hidrolízise	igen	igen	gyenge	gyenge
Kemokinek hasítása	igen	?	?	?
Gelatináz aktivitás	nem	igen	nem	nem
Dimerizáció	igen	igen	nem	nem
ADA kötése	igen	nem	nem	nem
mRNS expresszió normál felnőtt szövetekben	gyakori	gyakori	gyakori	gyakori
Protein expressziója egészséges felnőttben	gyakori	szérum, pancreas	?	?
Expressziója aktivált fibroblasztokban	igen	igen	?	?
Expressziója hepatikus csillagsejtekben	nem	igen	?	?
Expressziója lymphocytákban	igen	nem	igen	igen

2.táblázat A DPP-4, FAP, DPP-8 és DPP-9 általános jellemzői⁴⁵.

Szubsztrát specificitás

A DPP-4 családba tartozó, enzimaktivitással rendelkező gének típusosan a X-prolin illetve az X-alanin N terminális véggel rendelkező peptideket hasítják ahol az X-szel jelölt aminosav prolin kivételével akármelyik aminosav lehet (2. táblázat).

A szubsztrátok egy része még ismeretlen, ezért még nem tudhatjuk biztosan, hogy a DPP-4 gátlásának hosszú távon nincsenek-e nem kívánatos hatásai, nem halmozódnak-e fel egyéb fehérjék, amelyek a kedvező hatás (pl.: inkretinek) mellett más, kedvezőtlen mellékhatással bírnak. Feltételezések szerint a DPP-4 szubsztrátjait más enzimek is bonthatják. Az enzim gátlása során felhalmozódó szubsztrátokat ezért más proteázok is lebonthatják, így azok nem kumulálnak.

1.7.4 A DPP-4 biológiai szerepe

A DPP-4-nek számos szubsztrátja van, ennek eredményeképpen számos biológiai folyamatban vesz részt. Szerepe van a gyulladáso és immunfolyamatokban, a cardiovascularis és fájdalom szabályozás valamint az inkretinek enzimatis hasításával és inaktiválásával a szénhidrát háztartás hormonális szabályozásában is szerepet játszik (3. táblázat).⁴⁵

Szubsztrátjai:

-Fiziológiai szubsztrátok: szintjük változik DPP-4 gátlás hatására

Inkretinek (GIP, GLP-1)

Substance-P

Stomal Cell-Derived Factor -1 alpha (SDF-1 $\alpha\beta$)

-Farmakológiai szubsztrátok:

Vasoactiv Intestinalis Peptid (VIP)

Szomatosztatin

Neuropeptid Y

B-típusú natriuretikus peptid (BNP)

Biológiai hatások

Béta- és alfa- sejt hatások

Étvágycsökkenés, GI motilitás

Inzulinszenzitivitás

Fájdalom szabályozás

Kardiovaszkuláris hatások

Gyulladásos folyamatokra kifejtett hatások

3. táblázat A DPP-4 enzim szubsztrátjai és hatásuk.

Az enzim aktivitása a különböző megbetegedésekben eltérően változik. Emelkedett szérumszintű DPP-4 aktivitást sclerosis multiplexben, Graves-kórban, Hashimoto-thyreoiditisben, sarcoidosisban, primer biliaris cirrhosisban, krónikus tonsillitisben, HIV fertőzésben, krónikus C hepatitisben, csökkent aktivitást ANCA-asszociált vasculitisben, terápia rezisztens depresszióban, szisztémás lupus erythematosusban, irritábilis bél szindrómában, colitis ulcerosában, Crohn betegségben mértek⁴⁹⁻⁵⁶ (4. táblázat).

Emelkedett szérumszintű DPP-4 aktivitás

Sclerosis multiplex
 Basedow kór
 Hashimoto thyreoiditis
 Sarcoidosis
 Primer biliaris cirrhosis
 Krónikus tonsillitis
 HIV
 Crohn betegség
 Colitis ulcerosa
 Krónikus hepatitis C

Csökkent szérumszintű DPP-4 aktivitás

ANCA asszociált vasculitis
 Terápiarezisztens depresszió
 Szisztémás lupus erythematosus
 Irritábilis bél szindróma

4. táblázat A szérumszintű DPP-4 aktivitás változása különböző megbetegedésekben.

A membránhoz kötött lymphocyta felszíni CD26 expressziót a szolubilis DPP-4 aktivitáshoz hasonlóan számos betegségben (immunbetegségben, malignus tumorokkal kapcsolatban) vizsgálták. A CD26-nak a tumoros folyamatban mind aktivációs mind szupresszor hatást tulajdonítanak, szintje ezért mind a szérumban, mind a membránhoz kötött formában emelkedett vagy csökkent lehet. Membránhoz kötött CD26 expresszió fokozódást észleltek pl.: ovárium carcinomában, csökkent expressziót melanomában, Sézary szindrómában, atopiás dermatitisben, psoriasisban⁵⁷⁻⁶³.

A DPP-4 szerepe a szénhidrát anyagcserében

A DPP-4 az inkretin hormonok bontásával befolyásolja az enteroinzularis-axis működését. Az enzim a GLP-1 molekuláról az első két aminosavat (egy hisztidint és egy alanint) hasítja le, inaktíválva ezáltal a vegyületet. A hasítás eredményeképpen létrejövő metabolit már nem rendelkezik inzulinotróp hatással. Fokozott DPP-4 enzimaktivitás a biológiailag aktív, intakt GLP-1 szint redukciójához vezethet, ezért az inzulin elválasztás fiziológias redukcióját okozza. Az enzim működésének eredményeként az inkretinek hatása csak néhány percig tart, így az inkretinek által okozott inzulin szekréció fokozódás T2DM-ben nem minden esetben elég az emelkedett vércukorszint normál tartományba csökkentéséhez és az inkretinek további béta-sejtekre irányuló jótékony hatásai is kevésbé érvényesülhetnek. Számos vizsgálat felvetette, hogy 2-es típusú diabéteszben károsodott inkretin hatással számolhatunk. 2007-ben Knop és munkatársai a 2-es típusú diabéteszes betegeket vizsgálva csökkent plazma inkretin hatást mértek, melyet nem tartottak a T2DM közvetlen manifesztálódási okának. Mások a károsodott GLP-1 szekréciót a betegség egyik meghatározó, kezdeti elváltozásának tartják^{43,64}.

A DPP-4 és az immunfolyamatok

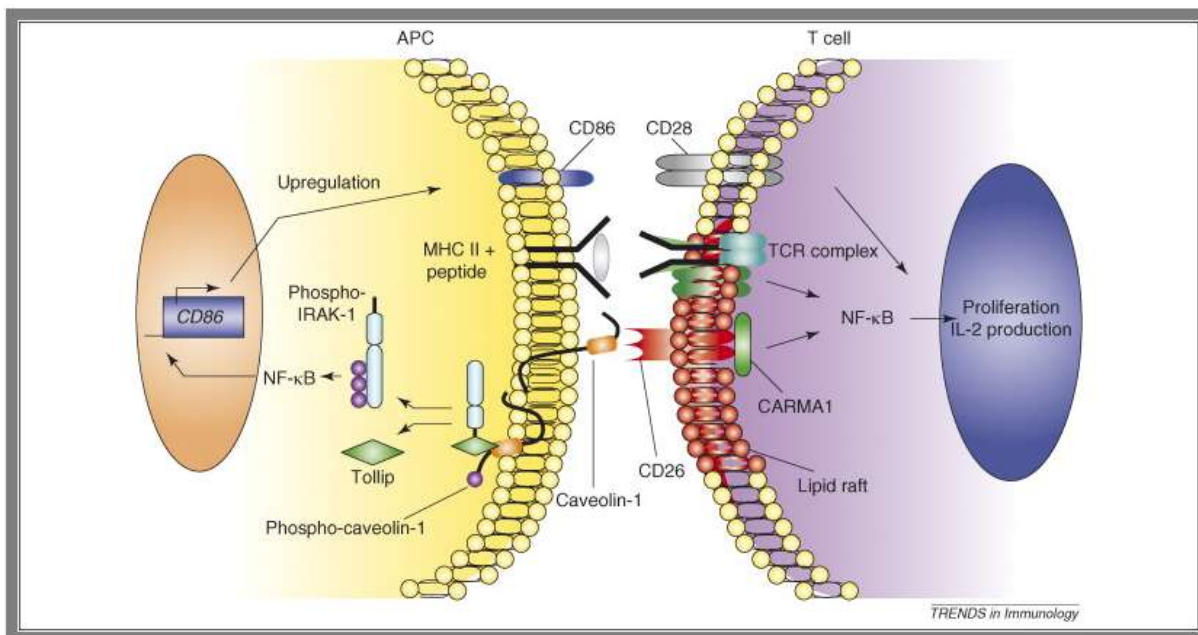
A DPP-4 aktivitás és a membrán felszínhez kötött CD26 expresszió változását számos immunológiai megbetegedésben vizsgálták, autoimmun diabétesszel kapcsolatban azonban még nincs adatunk a fehérje szerepéről.

1.7.4.1 A CD26 szerepe az immunfolyamatokban

Mind a membránhoz kötött mind a szolubilis fehérje forma fokozza a T-sejt proliferációt és a T-sejt aktivációt. Az aktivációs folyamat közvetlen illetve közvetett úton jöhet létre.

Az egyik valószínű mechanizmus szerint ebben a folyamatban a T-sejteken kívül a CD14+ monocyták is részt vesznek. A T-lymphocyta felszínén expresszáldó CD26 képes kötődni a monocyták plazmamembránjában nagy mennyiségben jelen lévő caveolin-1 fehérjéhez. A lymphocyta membránjában található CD26 és a monocyta membránjában elhelyezkedő caveolin-1 találkozás, a caveolin-1 intracelluláris szakaszának foszforilációjához, és a hozzá kötődő jelátvivő molekulák disszociációján keresztül a nuclear factor- κ B (NF- κ B) aktivációjához majd a monocyta plazmamembránjában a CD86 molekulák upregulációjához vezet. A monocyták felszínén nagy számban megjelenő CD86 képes a T-sejteket aktiválni azok felszíni CD28 receptorán keresztül^{48,65-71}.

A folyamattal egy időben a T-sejt autoaktivációját elősegítő folyamatok is lejátszódnak. A T-sejt felszínén expresszáldó CD26 kapcsolódása a monocyta caveolin-1 molekulájához elősegíti a T-lymphocyta cytoplazmájában a CARMA-1 (caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1) kötődését a CD26 intracelluláris domainjéhez. Ez a T-sejten belül a TCR-el (T-cell receptor) együtt (szintén NF- κ B-jelátviteli út által) elősegíti a sejt aktivációját, és IL-2 szekrécióját, amelynek az NK sejtek aktiválásában is szerepe van (7. ábra).



7. ábra Az antigénprezentáló sejt és a T-lymphocyta közötti molekuláris kommunikáció⁴⁸.

Lehetséges, hogy a DPP-4 részt vesz az immunválasz jellegének kiválasztásában is. A T-sejtek felszínén a CD26 expressziója IL-12 hatására is fokozódik, elősegítve a celluláris- Th1 indukálta aktivitás túlsúlyba kerülését.

A vasoactive intestinal peptide (VIP) és a pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) a DPP-4 szubsztrátjai közé tartoznak. Mindkét neuropeptid a humorális immunválasz irányába ható CD4⁺ Th2-helper lymphocyták aktivitását segítik elő, és gátolják a celluláris irányt stimuláló Th1 alcsoport IL2 és IFN- γ termelését⁶⁶⁻⁶⁹.

Ezek a hatások felvetnék a lehetőséget, hogy DPP-4 inhibitorok alkalmazása esetében immunológiai hatásokkal is számolnunk kell, az alkalmazott gyógyszerek azonban szelektív módon hatnak ezért eddigi ismeretek szerint nem teszik elégtelenné az immunválaszt⁷².

2. Célkitűzések

Célkitűzéseink az alábbi hipotéziseink köré rendeződve fogalmazódtak meg:

A DPP-4 enzim vizsgálatával kapcsolatban, autoimmun diabéteszben csak elenyésző, kis esetszámmal végzett vizsgálatok elérhetőek. Korábbi irodalmi adatok ismeretében⁷³ azt feltételeztük, hogy a szénhidrát anyagcsere státusz jellemző, valamint az aktuális hyperglykémia meghatározó lehet egyes típusú diabéteszben mért DPP-4 enzimaktivitás értékekre és az enzimaktivitás változhat a szénhidrát bevitel hatására.

Cukorbetegségben a DPP-4 egyéb lehetséges szerepe - a szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatása mellett - egyelőre nem vizsgált terület, autoimmun patomechanizmusú diabétesz tekintetében azonban további információkat nyújthat a betegség kórfolyamatának pontosabb feltérképezésében. Hipotézisünk az volt, hogy az autoimmun hátterű betegség és a DPP-4 fehérje működése között kapcsolat állhat fenn, melynek igazolása esetén további információk tárhatóak fel a betegség patomechanizmusával kapcsolatban és esetlegesen kibővíthetik az eddigi diagnosztikai és kezelési ismereteket.

Tekintettel a T1DM autoimmun karakterére, a DPP-4/CD26 immunológiai folyamatokban játszott szerepére, valamint arra, hogy a szolubilis DPP-4/sCD26 szerepe és kapcsolata a membránhoz kötött CD26-al még nem tisztázott teljesen, a két, lényegileg azonos paraméter (sDPP-4 és lymphocyta felszínhez kötött CD26) különböző megjelenési formái közötti összefüggést is feltételeztük.

Vizsgálataink során célunk volt:

1. Meghatározni az éhomi és postprandiális szérumban DPP-4 enzimaktivitást 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben valamint egészséges személyekben.
2. Megvizsgálni, hogy a szérumban mérhető szolubilis DPP-4 aktivitás változik-e szénhidrátbevitelre, egészségesekben illetve cukorbetegségben.
3. Van-e összefüggés az éhomi szérumban DPP-4 enzim aktivitás és a szénhidrát háztartással kapcsolatos klinikai laboratóriumi értékek (éhomi plazma glükóz, HbA1C) között T1DM és T2DM betegekben és egészséges személyekben?
4. A vizsgálati eredmények kapcsán a T1DM-ben észlelt emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálata.

Tekintettel a T1DM autoimmun jellegére és a DPP-4/CD26 immunológiai folyamatokban játszott szerepére az éhomi szérumban DPP-4 meghatározás mellett célunk volt az immunfolyamatokban részt vevő T lymphocyták felszínéhez kötött és a T-sejtek aktiválásában és proliferációjában is szerepet játszó CD26 expresszió meghatározása mind a CD3+ lymphocyták -majd ezen belül a CD4+ és CD8+ lymphocyták szubpopulációkon T1DM-ben és egészséges személyekben is.

5. Annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés az éhomi szolubilis szérumban DPP-4 aktivitás és a lymphocyták membránhoz asszociált CD26 expresszió között autoimmun diabéteszes betegekben.
6. A T1DM-ben zajló autoimmun folyamat markereként megjelenő szigetsejt ellenes antitestek közül az ICA és GADA markerek kimutatása. Annak vizsgálata T1DM-ben, hogy van-e összefüggés:

- a mért éhomi szérumban DPP-4 enzim aktivitás értékek és a vizsgált autoimmun markerek között autoimmun diabéteszes betegekben?
 - van-e összefüggés a vizsgált autoimmun markerek illetve a CD4+ illetve a CD8+ T lymphocyták szubpopulációk felszíni CD26 molekula expressziója között, autoimmun diabéteszes betegekben?
7. Az eredmények ismeretében a DPP-4 enzim lehetséges szerepének meghatározása 1-es típusú diabéteszben.

3. Anyag és módszer

Vizsgálati anyag:

Vizsgálati beteganyagunkat 1-es és 2-es típusú cukorbetegség valamint egészséges személyek (CNTRL) alkották.

Beválasztási/kizárási kritériumok:

Vizsgálatainkban az alábbiakban részletezett kritérium rendszert alkalmaztuk:

A vizsgálatban részt vevő személyek kizárási kritériumai:

a) egészséges személyek esetében:

- terhesség
- kóros májfunkciós értékek (a normális kétszeresét meghaladó SGOT és SGPT, háromszorosát meghaladó GGT értékek)
- kóros vesefunkciós értékek (kreatinin $>110\mu\text{m/l}$)
- emelkedett CRP (>5)
- emelkedett fehérvérsejt szám ($>10.000/\text{ml}$)
- bármilyen ismert immunrendszert érintő megbetegedés
- bármilyen gyógyszer szedése

b) cukorbetegség:

- terhesség
- kóros májfunkciós értékek (a normális kétszeresét meghaladó SGOT és SGPT, háromszorosát meghaladó GGT értékek)
- kóros vesefunkciós értékek (kreatinin $>110\mu\text{m/l}$)
- emelkedett CRP (>5)
- emelkedett fehérvérsejt szám ($>10.000/\text{ml}$)
- bármilyen ismert immunrendszert érintő megbetegedés
- gliptin vagy metformin szedése
- 2 évnél rövidebb ideje diagnosztizált vagy egyensúlyban nem lévő autoimmun thyroiditis

Munkacsoportunk egy közelmúltban publikált közleményében⁷⁴ bemutattuk, hogy T2DM-ben a szérumban DPP-4 aktivitás azokban az inzulin rezisztens T2DM betegekben magasabb, akikben egyidejűleg a cukorbetegség mellett zsírmájbetegség is kialakul. Vizsgálatainkból ezért a klinikailag valószínűsíthetően zsírmájban szenvedő betegeket kizártuk.

I. Az éhomi és a postprandialis szérumban DPP-4 enzimaktivitás meghatározására irányuló vizsgálatunkban T1DM-, T2DM- és egészséges személyek- összesen 153 személy vett részt:

	T2DM	T1DM	egészséges személy
betegek száma	87 nő/ffi=47/40	41 nő/ffi=17/24	25 nő/ffi=15/10
kor (év)	62,96±11,10	36,39±12,03	35,48±13,99
éhomi plazma glukóz mmol/L	9,20±3,92	8,14±3,04	4,88±0,49
HbA1C %	7,80 ±1,57	7,47 ±1,57	5,58±0,76
BMI kg/m ²	29,49±5,20	25,25±4,33	23,24±3,89

II. Az emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás hátterének vizsgálatára irányuló vizsgálatban a továbbiakban T1DM betegeket és egészséges személyeket vizsgáltunk. A vizsgálatban így összesen 98 személy vett részt:

	T1DM	egészséges személy
betegek száma	48 nő/ffi 20/28	50 nő/ffi=39/11
kor (év)	34,4 95%:CI 20-60	32,4 95% CI:22-56
éhomi plazma glukóz mmol/L	8,9 95% CI:2,3-19,7	4,4 95% CI:3,3-5,3
HbA1C %	7,6 95% CI: 5,2-11	5,5 95% CI:4,9-5,9
BMI kg/m ²	24,3 95% CI:19,9-32	22 95% CI 18,3-26

A diabétesz diagnózisának felállításától eltelt idő átlagosan: 13.4±9.76 év.

A vizsgálatban részt vevő személyek a vizsgálatot megelőzően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A megfelelő etikai fórumok a vizsgálatot engedélyezték. A vizsgálatok a Semmelweis Egyetem Regionális és Kutatásetikai Bizottság engedélyével történtek. Engedélyszám: 258/2009 ETT

Vizsgálati módszer

A kezdeti, az éhomi és a postprandiális szérumból DPP-4 meghatározásra irányuló vizsgálat során mind a 153 személy esetében -T1DM, T2DM és egészséges személyek- éhomi szérumból DPP-4 enzimaktivitás valamint klinikai laboratóriumi értékek (éhomi plazma glükóz, HbA1C, GOT, GPT, GGT, ALP, Kreatinin, teljes vércső, CRP) meghatározása történt. Az éhomi DPP-4 enzim meghatározás mellett 50 egyén esetében tesztétkezést követően 60 és 120 percnél is történt a szérumból DPP-4 enzimaktivitás mérés.

Az emelkedett szérumból DPP-4 aktivitás háttérének vizsgálata során a T1DM betegekben és egészséges személyekben is minden esetben klinikai laboratóriumi értékek (éhomi plazma glükóz, HbA1C, GOT, GPT, GGT, ALP, Kreatinin, CRP és C-peptid valamint teljes vércső meghatározás) mellett szolubilis szérumból DPP-4 aktivitás, valamint membránhoz asszociált CD26 expresszió meghatározás is történt a CD3+ T lymphocytakon, mind a CD4+ mind a CD8+ T lymphocytá szubpopulációkban. A T1DM-ben zajló autoimmun folyamat markereként megjelenő szigetsejt ellenes antitestek közül az ICA és a GADA markerek jelenlétét is meghatároztuk a T1DM csoportban.

3.1 A szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása

A szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása mikroplate alapú kinetikus módszerrel történt (Multiscan EX Labsystems) 405 nm-en, 25 °C-on 30 perc alatt duplikátumokból. A mérés során 15 µl szérumot, 185 µl puffer (10mM Tris-HCL, pH 7,6) oldatot benne szubsztrátként 4 mmol/L-es Gly-Pro-paranitroanilide tosylate-ot (Gly-Pro-PNA Bachem, Bubendorf, Switzerland) használtunk well-enként. A DPP-4 specifikusan hasítja a prolin (és az alanin) utáni peptid kötéseket a peptidek N-terminális végétől két aminosav távolságra. Ennek köszönhetően az alkalmazott Gly-Pro-paranitroanilin vegyületről egy paranitroanilin molekulát hasít le, amely 405 nm-en detektálható, és mennyisége fotometriásan meghatározható. Az enzimaktivitást 0. és 30. perc között mért abszorbancia értékekből határoztuk meg 25°C hőmérsékleten. Az enzimaktivitást nmol/ml/min-ben (U/L) határoztuk meg^{51,75}.

3.2 A szérum ICA és GAD antitestek meghatározása ELISA kit-tel

Az ICA és a GAD antitestek meghatározása Medizym ICA és anti GAD ELISA kit (Medipan GmbH) segítségével történt.

Az ICA meghatározás során az előkészített szérum mintákból 50 µl-t pipettáztunk az IC-autoantigénnel kezelt microtiter plate-re, minden vérmintából duplikátumot készítettünk. Az antigén kikötéséhez 25 µl érzékenyítő anyagot adtunk, majd 16 órán át állni hagytuk. Az állást követően a mintákhoz többszöri átmosások és min. 400rpm-es rázásokat követően 100 µl IC-autoantigen-Biotint, 100 µl streptavidin-peroxidázt, 100 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint, és 100 µl 0,25M-es kénsavat adtunk. Az így előkészített mintákat spektrofotometriás módszerrel 450nm-en detektáltuk Multiscan EX ELISA readerrel.

Kiértékeléskor a mintapárok átlagát osztottuk a kit-hez kapott cut-off kontroll mintával, melyek hányadosa megadja a kötési indexet (BI). Pozitívnak tekintettük azt a mintát, melynek kötési indexe 1 fölötti, negatívnak tekintettük a 0,7 alatti BI értékeket.

A 0,7 és 1 közötti BI értékek kétesek ezért az ebben a tartományban lévő értékekhez kerülő minták ismételt mérésre kerültek.

A GADA értékek meghatározásához a Medipan GmbH Medizym anti-GAD ELISA kit-et használtuk. Az előkészített plazma mintákból 50 µl-t pipettáztunk a humán rekombináns GAD₆₅-tel kezelt microtiter plate-re. Minden vérmintából duplikátumot készítettünk. Az így előkészített mintákhoz többszöri átmosások és min. 500rpm-es rázásokat követően 100 µl GAD₆₅-Biotint, 100 µl streptavidin-peroxidázt, 100 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint és 100 µl 0,25M-es kénsavat adtunk. Az így előkészített mintákat spektrofotometriás módszerrel 450nm-en detektáltuk Multiscan EX ELISA readerrel.

A kiértékelést Ascent szoftverrel végeztük. Az eredmények meghatározásához a kit-ben lévő kalibrátor mintákból kapott standard görbét használtuk. Az ehhez igazított értékekből az 5 IU/ml-nél magasabb koncentrációjú mintákat pozitívnak, míg az 5 IU/ml-nél alacsonyabb értékeket negatívnak tekintettük.

3.3 A CD26 expresszió meghatározása

A CD3⁺ és CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyták felszínéhez kötött CD26 expressziójának meghatározása FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) módszerrel történt. Mintaként teljes EDTA-s csőbe vett alvadásgátolt teljes vért használtunk. A sejtfelszíni markereket immunfestéssel jelöltük meg.

A vérmintákból duplikátumokat készítettünk. Az egyik mintánál 50 µl teljes vérhez 13 µl CD26-PE (CD26-Phycoerythrin, BD Biosciences), CD8-APC (CD8-Allophycocyanin , BD Biosciences), CD4 PE-Cy5 (DAKO, Glostrup, Denmark) és CD3 FITC (CD3 Fluorescein isothiocyanate, BD Biosciences) antitest keverékeket, a második mintánál az 50 µl teljes vérhez az antitesteknek megfelelő izotípus kontollt adtunk. A mintákat vortexelést követően 15 percig 4°C-on tartottunk. Ezt követően 1ml 1x-es lizáló folyadékot (Becton-Dickinson FACS Lysing/BD Biosciences/) adtunk a mintához. Tíz perces szobahőmérsékleten történő inkubálást követően 5 percig

centrifugáltuk 1400rpm-en, majd a felülúszó eltávolítását követően 1ml PBS (Phosphate Buffered Saline) folyadék hozzáadása után ismét 5 percig centrifugáltuk. Végül a felülúszó leöntése után 200 µl PBS-ben FACSCalibur flow cytometer készülékkel (BD Biosciences) detektáltuk a fluoreszcens elnyelést, amely megegyezik a megfestett sejtek számával. Minden mintából 20.000 esemény került detektálásra. A minták kiértékelése a flow citométerhez csatlakoztatott Cell Quest Pro szoftver segítségével történt. A CD26 pozitivitást MFI-ben (mean fluorescence intensity) határoztuk meg.

3.4 A klinikai laboratóriumi paraméterek meghatározása

A laboratóriumi paraméterek meghatározása a levett vérmintából a standard laboratóriumi meghatározásoknak megfelelően történt 37 °C-on.

3.5 Statisztikai módszerek

Statisztikai analízis

A kapott vizsgálati eredmények statisztikai eloszlásának meghatározása Jarque-Bera teszt elvégzésével történt. Tekintettel arra, hogy az eredmények normál eloszlást mutattak, a korrelációk vizsgálatára és az átlagértékek összehasonlítására kétmintás T-tesztet és Pearson korrelációt valamint ANOVA illetve MANOVA tesztet használtunk. A 0,05 alatti P értéket szignifikánsnak tekintettük ($p < 0,05$).

A DPP-4 enzimaktivitás diagnosztikai Cutoff point meghatározására statisztikai vizsgálatként ROC (Receiver Operating Characteristic) görbe analízist használtunk.

3.6 Vizsgálatok

A szérum DPP-4 aktivitás és a T lymphocytá felszíni CD26 expresszió irányában elvégzett vizsgálataink alapvetően két egymást követő, egymáson alapuló vizsgálati részben történtek.

3.6.1 Szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása cukorbetegekben éhomi és postprandialis állapotokban.

Egyes típusú cukorbetegek szérum DPP-4 aktivitását vizsgáltuk éhomi és postprandialis állapotokban. Kontroll csoportként egészséges egyéneket valamint hyperglykémiás kontroll csoportként 2-es típusú cukorbetegeket választottunk. Éhomi majd tesztétkezést követően postprandialis szérum DPP enzimaktívás-változást határoztuk a vizsgált személyekben. A vizsgálatban a postprandialis szérum DPP-4 aktivitás vizsgálata során különböző időpontokban 50 egyén esetében (17 T2DM, 15 T1DM és 18 egészséges) a tesztétkezést követően (50g szénhidrát+24g fehérje+12g zsír = 410 kcal) 60 és 120 percnél is történt a szérumból DPP-4 enzimaktivitás meghatározás.

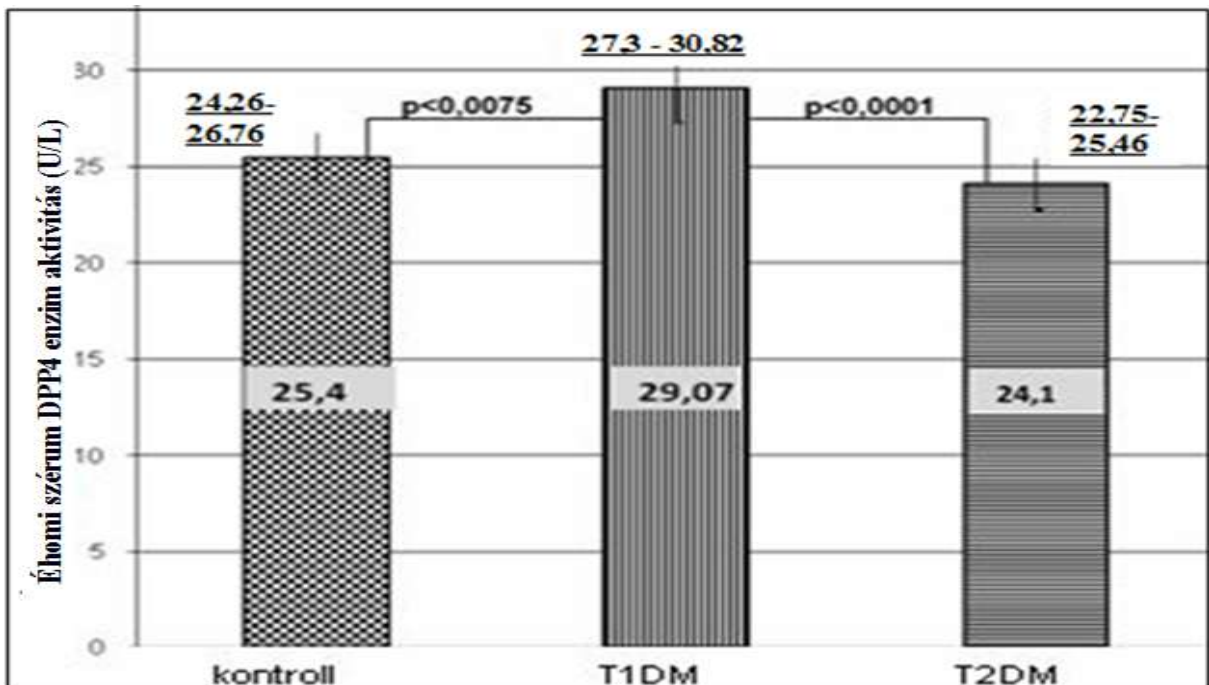
3.6.2 Szérum DPP-4 aktivitás és lymphocita felszíni CD26 expresszió vizsgálata T1DM-ben és kontroll személyekben

Az előző vizsgálatban tapasztalt eredmények - a T1DM csoportban észlelt magasabb szérum DPP-4 aktivitás - kapcsán további vizsgálatokat végeztünk, amelyek az eredmény háttérének feltárására irányultak. Egészséges és T1DM betegekben vizsgáltuk a CD3+ T lymphocytát, majd a CD3+/CD4+ valamint a CD3+/CD8+ T lymphocyták szubpopulációkban a membránhoz asszociált DPP-4, vagyis a lymphocyták felszíni CD26 expressziót. Vizsgáltuk továbbá az autoimmun ICA és GADA markerek jelenlétét T1DM-ben.

4. Eredmények

4.1 Szérum DPP-4 enzimaktivitás cukorbetegben éhomi és postprandiális állapotokban.

- Szignifikánsan magasabb éhomi szérum DPP-4 enzimaktivitást mértünk T1DM-ben [29.065 U/L (95%CI:27.30-30.826)] úgy az egészséges személyekhez [25.45 U/L (95%CI:24.16-26.76)] mint a T2DM betegcsoporthoz viszonyítva [24.10 U/L (95%CI:22.75-25.46)] (T1DM vs. CNTRL $p < 0.0075$; T1DM vs. T2DM $p < 0.0001$) (8. ábra).



8. ábra

Éhomi szérum DPP-4 enzim aktivitás T1DM (n=41) és 2-es típusú cukorbetegben (n=87) valamint egészséges személyekben (n=25). Szignifikánsan magasabb szérum DPP-4 enzim aktivitást találtunk T1DM-ben nem csak a kontrol csoporttal ($p < 0.0075$) de a T2DM csoporttal ($p < 0.0001$) szemben is. Az ábrán az átlagértékeket (U/L) és a 95%-os fiducia intervallum értékeket tüntettük fel.

Nem találtunk szignifikáns változást a szérumban DPP-4 enzimaktivitásban - az éhomi értékek kivételével - tesztétkezést követően egyik csoporton (T1DM, T2DM, CNTRL) belül sem (5. táblázat). A hyperglycaemia mértéke nem különbözött a két cukorbeteg csoportban. Nem volt különbség sem az éhomi plazma glükóz (T1DM: 8,1mmol/L 95%CI: 7,50-8,77; T2DM: 9,2mmol/L 95%CI 7,95-10,45), sem a HbA1c (T1DM 7,47% 95%CI:7,13-7,8; T2DM 7,80% 96%CI 7,29-8,31) átlagértékek között (5. táblázat).

	CNTRL	T2DM **	T1DM
Esetszám (Nő/Ffi)	25 (Nő/Ffi=15/10)	87 (Nő/Ffi =47/40)	41 (Nő/Ffi =17/24)
Életkor (év)	35.48 95% CI:29.3-41.6	62.9 95%CI:60.6-65.2	36.4 95% CI:32.5-40.01
HbA1C (%)	5.58 95%CI:5.28-5.93	7.80 95%CI:7.29-8.31	7.47 95% CI:7.13-7.8
Éhomi plazma glükóz (mmol/L)	4.91 95%CI:4.71-5.11	9.2 95%CI:7.95-10.45	8.1 95%CI:7.50-8.77
sDPP-4 enzim aktivitás 0' (U/L)	25.45 95%CI:24.16-26.76	24.10 95%CI:22.75-25.46	29.07 95%CI:27.30-30.82
sDPP-4 enzim aktivitás 60' (U/L) *	24.42 95%CI:24.34-27.43 n=18	27.84 95%CI:24.6-30.9 n=17	31.33 95%CI:25.83-36.82 n=15
sDPP-4 enzim aktivitás 180'(U/L) *	25.86 95%CI:24.66-29.41 n=18	27.05 95%CI:22.82-31.27 n=17	30.08 95%CI:25.57-34.50 n=15

5. táblázat

Éhomi plazma glükóz, életkor, HbA1C és éhomi valamint postprandiális szérumban (s) DPP-4 enzim aktivitás átlagértékek (U/L) és a 95%-os fiducia intervallum értékek T1DM, T2DM és kontroll (CNTRL) csoportokban.

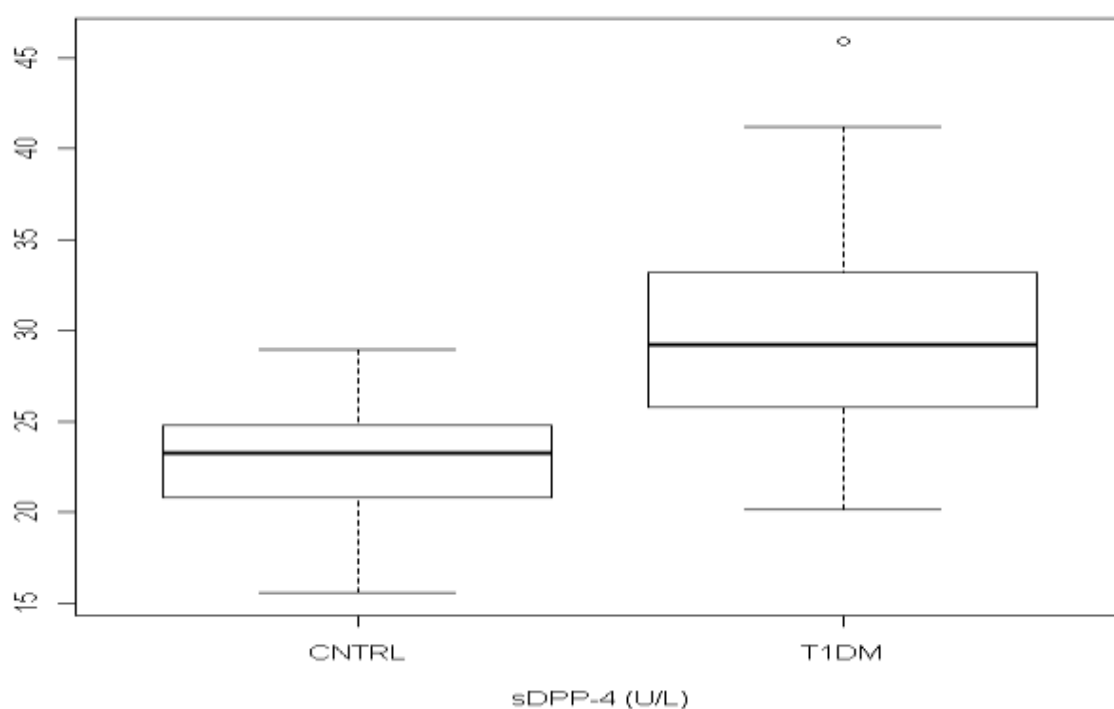
*Az első 50 betegnél észlelt prandialis DPP-4 aktivitás változás hiánya miatt a vizsgálatot a továbbiakban csak az éhomi szérumban DPP-4 enzim aktivitás meghatározására korlátoztuk ezért a vizsgálat ezen részében csak 50 személy vett részt.

** Klinikailag bizonyított NAFLD kizárva.

- Egyik csoporton belül sem találtunk szignifikáns korrelációt az éhomi plazma glükóz vagy HbA_{1C} és az éhomi DPP-4 enzimaktivitás értékek között.

4.2 Az emelkedett szérums DPP-4 aktivitás háttérének vizsgálatára irányuló, szérums DPP-4 aktivitás és lymphocyta membránhoz kötött CD26 expresszió T1DM-ben

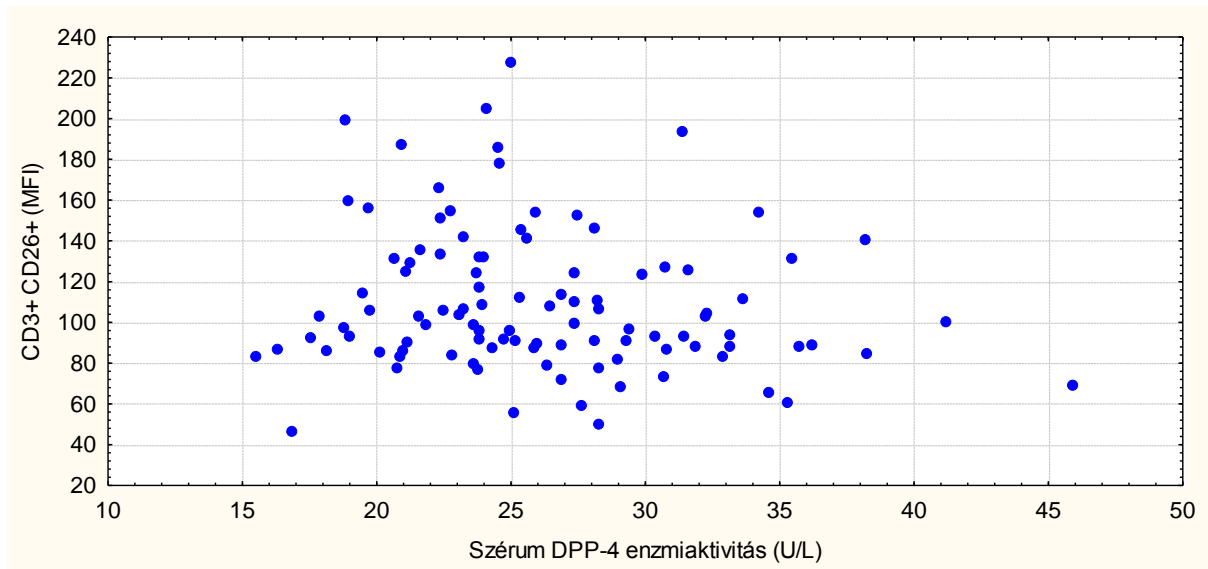
- Szignifikánsan magasabb éhomi szérums DPP-4 aktivitást észleltünk a T1DM csoportban az egészséges csoporthoz képest.



9. ábra

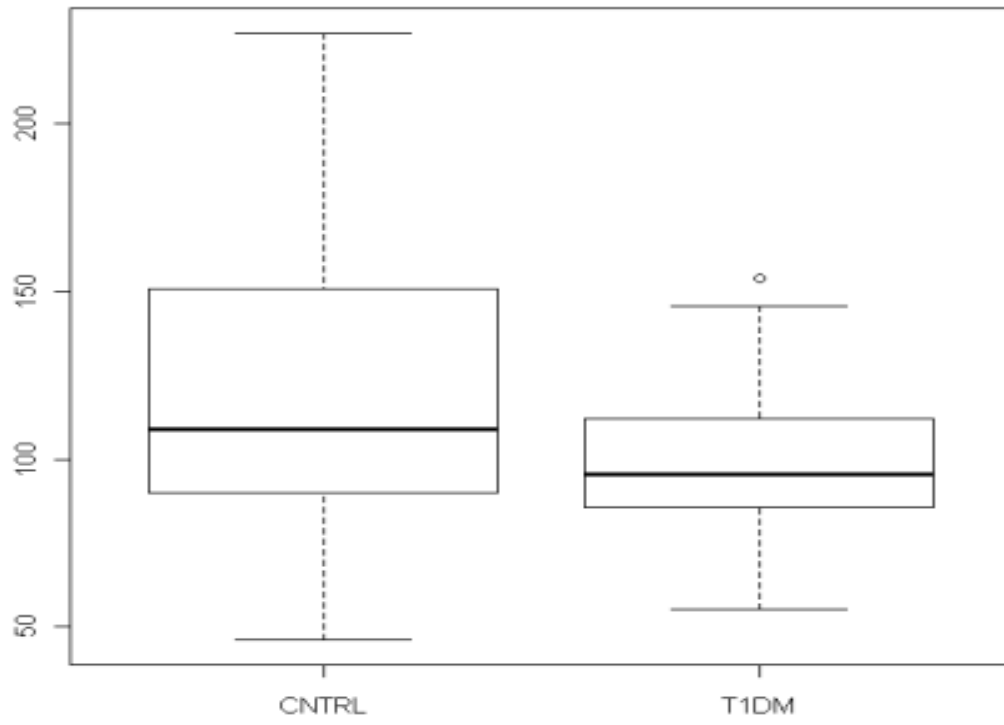
Boxplot elemzés. Szérums DPP-4 enzim aktivitás T1DM betegekben és egészséges (CNTRL) személyekben. A szérums DPP-4 aktivitás szignifikánsan (ANOVA $p=8.75e-12$, $p<0.01$) emelkedett a T1DM csoportban (30,06 95%CI:21,85-45,94U/L) a CNTRL csoporthoz (22,62 95%CI: 16.32-28,28U/L) képest. Az eredmények medián értékek, az értékeket U/L-ben fejeztük ki.

- A membránhoz kötött CD26 expresszió tekintetében a T1DM csoportban, az összes vizsgált lymphocyta populációban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk az egészséges csoporthoz képest (10. és 11. A-C ábra).

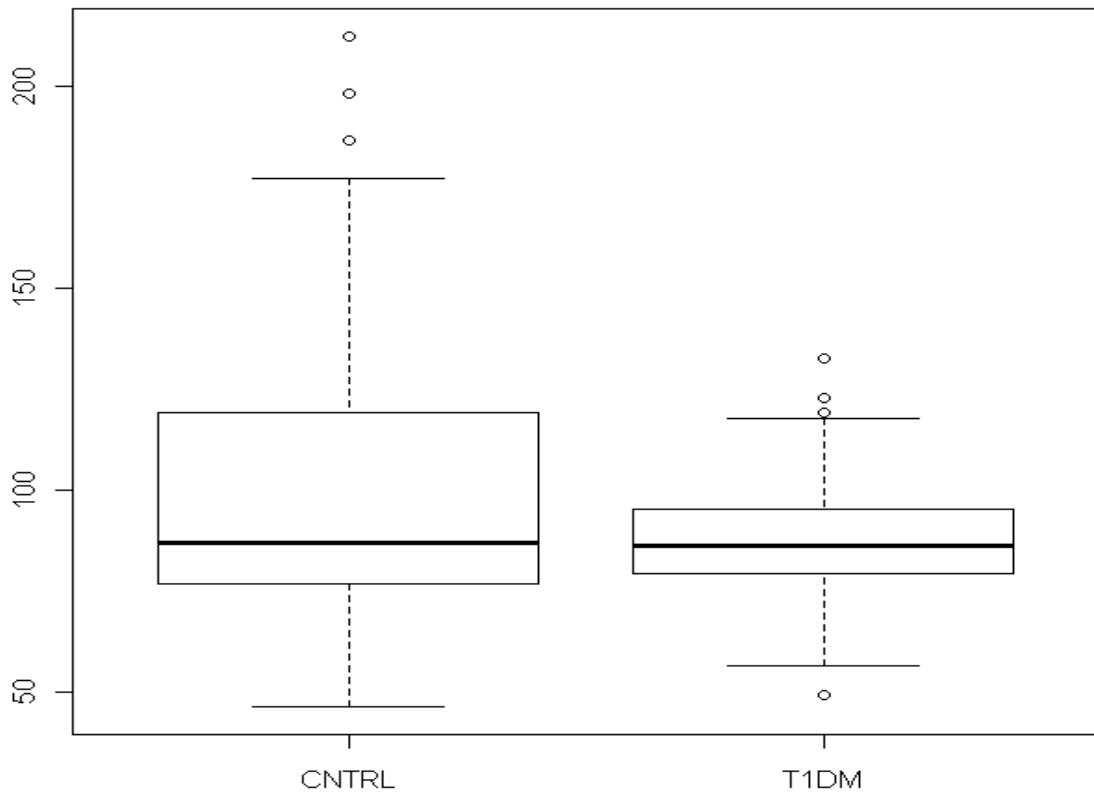


10. ábra

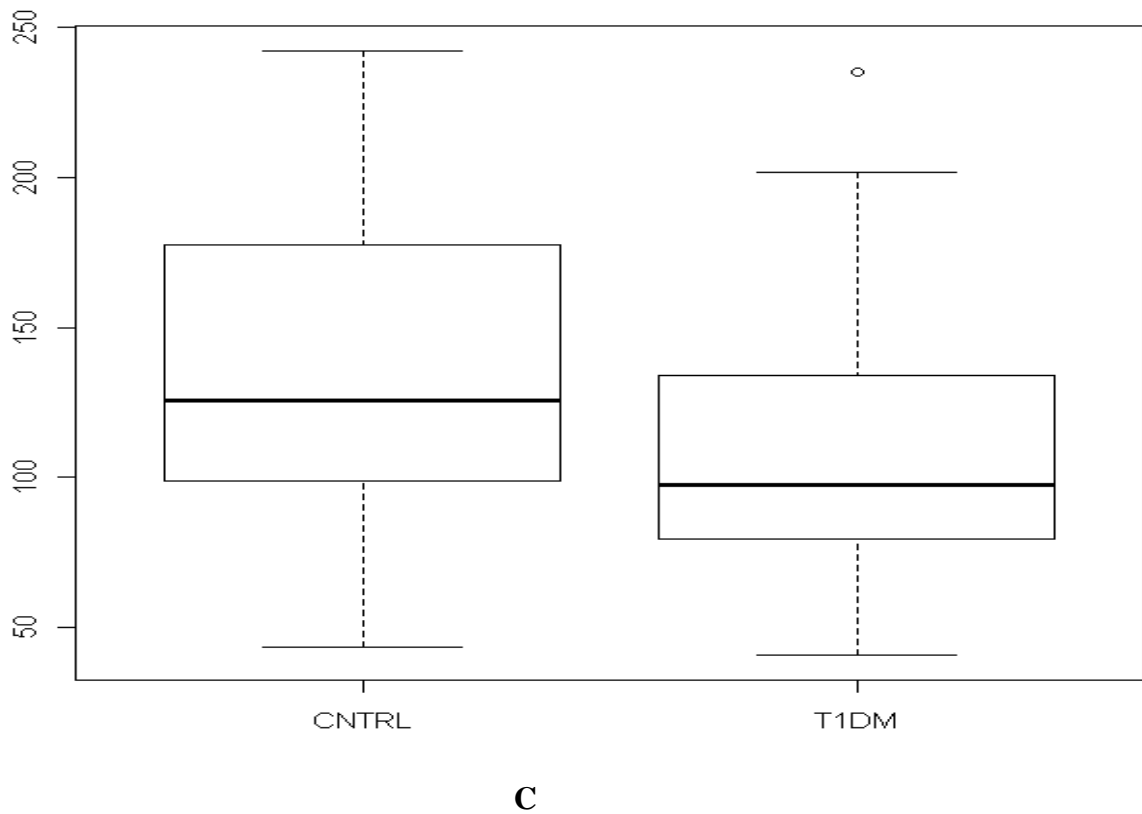
A szérumban DPP-4 aktivitás és a CD3+ lymphocyta populáció felszíni CD26 expresszió ábrázolása scatterplot-tal a T1DM csoporton belül. Összefüggés nem igazolódott a szérumban DPP-4 aktivitás és a CD3+ lymphocyta populáció CD26 expressziója között. A többi lymphocyta szubpopulációban hasonlóan nem találtunk összefüggést a két paraméter között.



A



B



11. ábra: Boxplot analízisek.

CD26 expresszió vizsgálata a CD3+, CD4+, CD8+ T lymphocyták felszínén T1DM-ben és egészséges (CNTRL) személyekben. Az ábrán a medián értékeket tüntettük fel, az értékeket MFI-ben (mean fluorescent intensity) fejeztük ki.

11.A. ábra: Csökkent CD26 expresszió a CD3+ lymphocytákon.

T1DM: 100.32MFI 95%CI: 92.91-107.72; CNTRL: 119.82MFI 95%CI 107.81-131.84
(ANOVA $p=0.001154$)

11.B. ábra: Csökkent CD26 expresszió a CD4+ lymphocytákon.

T1DM: 89.29MFI 95%CI: 83.45-95.13; CNTRL: 106.48MFI 95%CI 94.97-117.99
(ANOVA $p=0.03294$)

11.C. ábra: Csökkent CD26 expresszió a CD8+ lymphocytákon.

T1DM: 110.75MFI 95%CI 98.42-123.08; CNTRL: 136.45MFI 95%CI 121.22-151.68
(ANOVA $p=0.00478$)

- Nem találtunk összefüggést a szérumban DPP-4 aktivitás és a lymphocyták felszínén mért membránhoz kötött CD26 expresszió között egyik vizsgált lymphocytá alpopulációban sem a T1DM illetve az egészséges csoporton belül.

T1DM csoport:

CD3+ CD26: DPP-4, $p=0.1052$ (12. ábra)

CD4+ CD26: DPP-4, $p=0.3526$

CD8+ CD26: DPP-4, $p=0.9891$

4.3 Autoimmun ICA és GADA aktivitás vizsgálata a szolubilis szérum DPP-4 valamint a lymphocyta felszínhez kötött CD26-al való összefüggésében T1DM betegekben.

- A T1DM csoporton belül a 48 betegből 14 betegnél igazolódott izoláltan csak ICA pozitivitás, 2 esetben csak GADA pozitivitás, 27 esetben pedig mindkét autoimmun markerre pozitívak, 5 esetben mindkét markerre negatívak voltak a betegek.
- A szérum DPP-4 aktivitás és az autoimmun markerek jelenléte között nem találtunk összefüggést egyik mért autoimmun marker esetében sem. Nem találtunk összefüggést az enzimaktivitás és az autoimmun markerek között azokban a betegekben sem, amelyek mindkét autoimmun markerre negatívnak bizonyultak. A szérum DPP-4 aktivitás azonban függetlenül az autoantitest meglététől vagy hiányától emelkedett volt (6. táblázat):

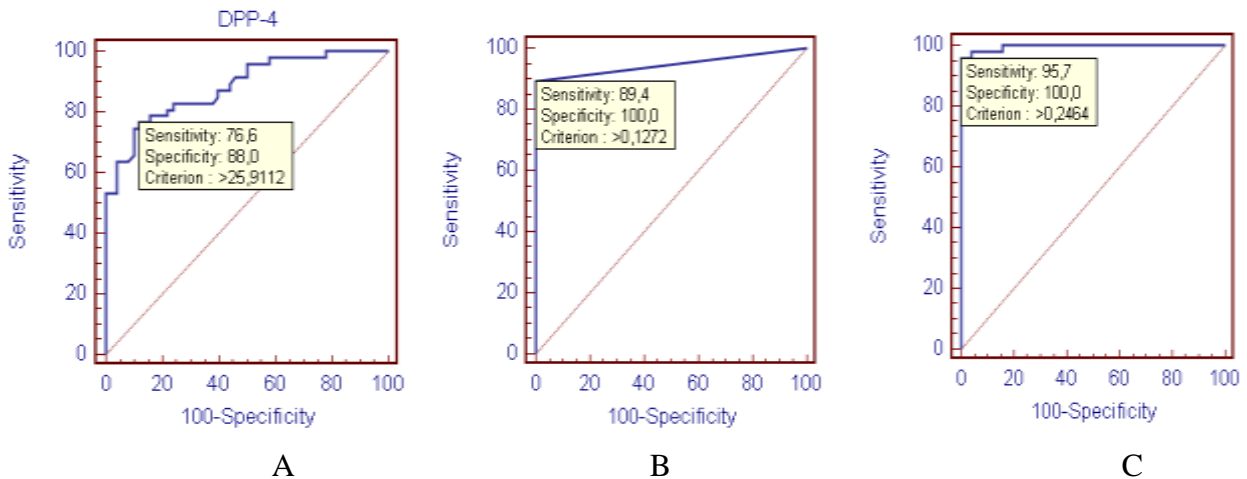
	ICA	GADA
Pozitív	29.2U/L 95%CI:27.59-30.81U/L n=41	28.66 U/L 95%CI: 26.91-30.41 U/L n=29
Negatív	29.9U/L 95%CI: 23.31-36.50 U/L n=7	29.44 U/L 95%CI: 26.59-32.28U/L n=19
mindkettőre negatív	31.14 U/L 95%CI: 22.67-39.61 U/L n=5	

6. táblázat A szérum DPP-4 aktivitás alakulása a T1DM csoportban a vizsgált autoimmun markerek (ICA és GADA) függvényében.

- Nem találtunk összefüggést az autoimmun markerek jelenléte és a lymphocyta felszíni CD26 expressziók között egyik lymphocyta szubpopuláción belül sem.

- Tekintettel arra, hogy számottevő eltérést találtunk a T1DM betegek és a kontroll csoportok éhomi DPP-4 aktivitása között, annak vizsgálatára, hogy a fokozott DPP-4 aktivitás markere lehet-e az 1-es típusú diabétesznek, a DPP-4 aktivitás diagnosztikai hatékonyságának vizsgálatára ROC analízist végeztünk (12. ábra).

Nem találtunk összefüggést semmilyen egyéb vizsgált, klinikailag releváns paraméterrel: életkor, a betegség fennállásának ideje, HbA1C, maradék béta-sejt funkció (C-peptid), célszerv-károsodás.



	A	B	C
Area under the ROC curve (AUC)	0,884	0,947	0,996
Standard Error	0,0355	0,0241	0,00680
95% Confidence Interval	0,803 to 0,940	0,882 to 0,982	0,954 to 1,000
z statistic	10,809	18,522	72,907
Significance level P (Area=0.5)	0,001	0,001	0,001

12. ábra ROC görbe analízis T1DM betegekben. A ROC görbe analízissel meghatározott cutoff érték a DPP-4 aktivitás tekintetében: 25.91 U/L. Ezt a cutoff értéket felhasználva az enzimaktivitás diagnosztikai hatékonyságának szenzitivitását 76.6%, specificitását 88.0%-ban határoztuk meg.

A) Szérum DPP-4 aktivitás, mint önálló diagnosztikai teszt az 1-es típusú diabétesz diagnózisában:

A DPP-4 aktivitás tekintetében a ROC analízissel meghatározott cutoff érték, mint önálló diagnosztikai teszt: 25.91 U/L. Ezt a cutoff értéket felhasználva a DPP-4 aktivitás önálló tesztként való szenzitivitása 76.6%, specificitása 88%-os (13.4 ± 9.76 évvel a T1DM diagnózisának felállítását követően).

B) ICA és GAD autoantitestek, mint kombinált diagnosztikai teszt T1DM-ben.

C) ICA, GADA és szérum DPP aktivitás, mint kombinált diagnosztikus teszt T1DM-ben.

5. Megbeszélés

Az orális antidiabetikumok legújabb csoportjaként megjelent DPP-4 gátlók klinikai alkalmazási területe jelenleg a 2-es típusú cukorbetegre korlátozódik. Magyarországon jelenleg négy DPP-4 gátló (sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, linagliptin) van forgalomban. Anyagcserére gyakorolt hatásuk eddigi ismereteink alapján a DPP-4 enzim gátlásán keresztül elsősorban az enteroinzularis tengely működésének befolyásolásával érvényesülnek.

Az enteroinsularis rendszer szabályozómechanizmusai egyértelműen érintettek T1DM-ben, ennek patofiziológiai alapjai ugyanakkor még sok ponton feltáratlanok. Fontos szerepet kaphat ezért a betegség jellegének alakulásában az enteroinzularis tengely működésében is részt vevő, multifunkcionális, többek között immunológiai folyamatokban is szerepet játszó DPP-4 enzim. A DPP-4 fehérje aktivitásának, T-lymphocyták felszínén való expressziójának vizsgálata egyes típusú cukorbetegségben olyan, eddig nem vizsgált kérdésekre adhat választ, amely lehetővé teszi az egyes anyagcserebetegség patomechanizmusának további feltérképezését valamint alapul szolgál a T1DM kezelésének DPP-4 gátláson alapuló kibővítéséhez. Mindezirányú messzemenő következtetés azonban nem vonható le, hiszen az inkretin hormonok bontásának közel 85%-a már közvetlenül a felszabadulást követően megtörténik a vékonybél kapillárisának endothel felszínéhez asszociált DPP-4 enzim által, így a szérumban lévő enzim aktivitás legfeljebb az inkretin degradáció 15%-ért lehet felelős.

Vizsgálataink alapján az valószínűsíthető, hogy a DPP-4 immunfolyamatokban játszott szerepe az autoimmun T1DM patomechanizmusában is meghatározó lehet. Eredményeink alapján a következő megállapításokra jutottunk:

5.1 Szérum DPP-4 enzimaktivitás meghatározása cukorbetegekben éhomi és postprandiális állapotokban.

Ebben a vizsgálatban igazoltuk, hogy T1DM-ben minden esetben emelkedett a szérum DPP-4 enzimaktivitás függetlenül a szénhidrát beviteltől vagy a szénhidrát

anyagcsere státusztól. Ez arra utal, hogy az emelkedett szérumban DPP-4 enzimaktivitás nem az anyagcsere státusz függvényében változik.

Vizsgálatainkban, kezdetben a szérumban lévő DPP-4 enzim aktivitást és annak étkezéstől függő változását mértük cukorbetegekben, annak vizsgálatára, hogy a különböző patomechanizmuson alapuló, eltérő etiológiájú de hasonlóan hyperglycaemias cukorbeteg csoportok között találunk-e különbséget a szérumban DPP-4 aktivitásában.

Meglepetésszerűen emelkedett éhomi szérumban DPP-4 enzimaktivitást találtunk T1DM-ben, mind a hyperglycaemias kontroll csoport (T2DM), mind az egészséges személyekhez képest⁷⁷. A DPP-4 aktivitás független volt a tesztétkezéstől, (50g szénhidrát+24g fehérje+12g zsír = 410 kcal) a postprandiális DPP-4 aktivitás étkezés hatására nem változott, nem tért el az éhomi szérumban DPP-4 aktivitás értékektől egyik vizsgált csoporton belül sem. A mért postprandiális szérumban DPP-4 enzimaktivitás azonban minden vizsgálati időpontban szignifikánsan magasabb volt a T1DM csoportban az egészséges vagy a T2DM csoporthoz képest. Miután nem találtunk összefüggést sem az aktuális vércukor szint, sem az átlagos szénhidrát anyagcsere állapotot jelző HbA_{1c} érték között, ezért eredményeink alapján olyan irányú megállapítást tettünk, amely szerint a szérumban DPP-4 enzimaktivitás mértéke nem az aktuális vércukorszint vagy az általános szénhidrát anyagcsere állapot jelzője, hanem inkább a diabétesz típusának a markere lehet. Vizsgálataink nagyobb betegszámon nem igazolták, hogy T1DM és T2DM betegekben a szérumban DPP-4 enzimaktivitás és az éhomi szérumban glükóz valamint a HbA_{1c} értékek között összefüggés van. A vizsgálat során a T2DM betegek csoportjából a klinikailag nem alkoholos zsírmájbetegségben szenvedőket kizártuk.

5.2 Az emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás háttérének vizsgálata a szérumban DPP-4 aktivitás és a lymphocyták membránhoz kötött CD26 expresszió függvényében T1DM-ben.

Tekintettel a DPP-4/CD26 T-sejt aktivációs szerepére feltételeztük, hogy a szolubilis DPP-4 fehérje a cukorbetegséggel kapcsolatban a szénhidrát anyagcsere szabályozásán túl egyéb jelentős, a betegség patomechanizmusában fontos szereppel

bíró folyamatokban is részt vehet, és hogy az emelkedett enzimaktivitás háttérében az autoimmun folyamat meghatározó lehet. Egyre több adat szól a regulátoros T-sejtek (Treg) kiemelt jelentősége mellett T1DM-ben is. A Treg-sejtek mind a CD4⁺-, mind a CD8⁺-szubpopuláción belül megtalálhatóak, a perifériás CD4⁺-szubpopulációnak körülbelül 5–10%-át teszik ki. Jellemző rájuk a TGFβ- és IL-10-elválasztás, egyaránt képesek a humorális és a celluláris immunválaszok gátlására.

A DPP-4 mind solubilis, mind a lymphocita membránhoz kötött formában közvetlenül is meghatározó a T-sejt aktivációban, regulációban. A T-sejt felszíni CD26 és APC felszíni caveolin-1 interakció T-sejt kostimulációhoz és aktivációhoz vezet korábban már ismertetett lépéseken keresztül⁶⁸. Vizsgálatainkban ezért meghatároztuk 1-es típusú cukorbetegségben a DPP-4 szérum aktivitás szintjével egyidejűleg, membránhoz kötött formájának (CD26) expresszióját is az immunfolyamatokban szerepet játszó CD3⁺ T-lymphocyták és azon belül a CD4⁺, CD8⁺ szubpopulációk felszínén. Megvizsgáltuk ezen paraméterek összefüggését a betegség autoimmun karakterére jellemző markerek (ICA, GADA) jelenlétével.

Eredményeink azt mutatták, hogy a T1DM csoportban mindhárom lymphocita populációban csökkent a CD26 expresszió az egészségesekhez képest. A szérum DPP-4 aktivitás az előző vizsgálattal megegyezően -és azt ismételtlen igazolva- itt is szignifikánsan emelkedettebb volt a kontroll csoporthoz képest⁷⁸. Ezek a megfigyelések azt látszanak alátámasztani, hogy az enteroinzularis axis funkciója változik T1DM-ben. Ezt a megfigyelést érdemes az irodalmi adatok tükrében elhelyezni. A téma aktualitását és a kutatás kompetitív jellegét jelzi, hogy 2012-ben egy dán munkacsoport /Kaas és munkatársai/ is vizsgálni kezdték az enteroinzularis tengely változásait – GLP-1, proinzulin és glukagon tekintetében- T1DM-ben újonnan diagnosztizált gyermekekben és serdülőkben⁷⁹. Vizsgálataik alapján az enteroinzularis tengely változásaival kapcsolatosan négy fontosabb megállapítást tettek a 90 percnél posztprandiálisan mért GLP-1 szintekre vonatkozólag:

1. A GLP-1 szint szignifikánsan különbözött a diagnózis felállítását követően 6 illetve 12 hónapnál remisszióba kerülő betegek esetében /alacsonyabb GLP-1 szintet mértek/ a remisszióba nem kerülő betegektől.
2. A GLP-1 szint pozitívan korrelált a posztprandiális glükóz szinttel
3. A GLP-1 szint pozitívan korrelált a proinzulin szinttel 1 hónapnál, ez az összefüggés azonban 6 és 12 hónapnál megfordult.
4. Egy hónapnál a 90 percnél mérhető posztprandiális GLP-1 értéke előre jelzi, a 6 hónap múlva bekövetkező remissziót – magasabb GLP-1 szintekhez alacsonyabb remissziós ráta társul.

A vizsgálatban megállapították, hogy a GLP-1 inkretin hormon fontos szereplő lehet a remissziós fázisban lévő egyes típusú cukorbetegekben azonban ebben a vizsgálatban sem történt szérumban DPP-4 enzim aktivitás meghatározás, amely a mi munkánk alapját képezte. Mindezen eredmények megerősítik azt a tényt, hogy az enteroinzuláris rendszer működése T1DM-ben is megváltozik, ezért ennek további vizsgálata mind elméleti mind gyakorlati terápiás szempontból érdemes.

Tekintettel arra, hogy a DPP-4 fehérje membránhoz kötött és szolubilis formája között a kapcsolat még nem feltárt, vagyis nem világos, hogyan kerül a szolubilis forma a szérumba, felmerült annak a lehetősége, hogy a T1DM csoporton belül az emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás mellett észlelt csökkent T-lymphocyták felszíni CD26 expresszió utalhat a két forma közötti kapcsolatra. A továbbiakban ezért megvizsgáltuk van-e összefüggés a T-lymphocyták felszínéhez kötött CD26 expresszió és a szolubilis DPP-4 aktivitás között. Nem találtunk összefüggést a szérumban DPP-4 aktivitás és a lymphocyták membrán felszínéhez kötött CD26 expresszió között sem az egészséges sem a T1DM csoporton belül. Feltételezhetően -bár egyéb molekuláris laboratóriumi vizsgálatra nem volt módunk- a membránhoz kötött forma expressziójának regulációjában szerepe lehet a szolubilis DPP-4 formának is.

5.3 Autoimmun ICA és GADA aktivitás vizsgálata a szolubilis szérumban DPP-4 valamint a lymphocyták felszínéhez kötött CD26-al való összefüggésében T1DM betegekben.

Az alapbetegség autoimmun karakterének megfelelően ezt követően vizsgáltuk az esetleges összefüggések lehetőségét a mért autoimmunmarker (ICA, GADA) pozitivitás valamint a szérumban DPP-4 aktivitás és CD26 expresszió között.

Eredményeink azt igazolták, hogy az éhomi szérumban DPP-4 aktivitás és a CD26 expresszió független a T1DM betegek ICA és GADA státuszától. A szérumban DPP-4 aktivitás azoknál a betegekben is emelkedett volt, akik mindkét autoantitestre negatívak voltak több mint 13 évvel a diabétesz diagnózisának fellállítását követően. Ez felveti annak lehetőségét, hogy az emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás az autoimmun folyamat aktivitásától, az autoantitest kimutathatóságtól függetlenül segíthet kiegészíteni vagy megerősíteni az eddig elfogadott diagnosztikus ICA és GAD autoantitest meghatározás szenzitivitását.

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a szérumban DPP-4 aktivitás mérése az ICA+GAD autoimmun markerek mérése mellett az autoimmun teszt 89,4%-os szenzitivitását 95,7%-ra növelte 1-es típusú diabéteszben 13,4 évvel a diagnózis felállítása után, amikor az autoimmun folyamat rendszerint már nem aktív. A kombinált ICA+GADA tesztek kevesebb, mint 90%-os szenzitivitását a diagnózis felállításától eltelt hosszabb idő magyarázhatja. (13. ábra). Ugyanakkor ez a szenzitivitás érték változás a mindennapi klinikai gyakorlatban vélhetően eltérhet, hiszen nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a szérumban DPP-4 aktivitás változását számos más betegségben is leírták, így egy esetlegesen jelenlévő társbetegség (pajzsmirigybetegség, krónikus hepatitisz C fertőzés) az aktivitás értékeket jelentősen módosíthatja (4.táblázat).

Nem korrelált továbbá sem a szérumban DPP-4 aktivitás sem a membránhoz kötött CD26 expressziója a vizsgálatban mért egyéb paraméterekkel (HbA_{1C}, éhomi plazma glükóz, kor, BMI, diabétesz fennállásának az ideje).

Mivel nem találtunk összefüggést a vizsgált szénhidrát anyagcsere paraméterek és a szérumban lévő DPP-4 aktivitás vagy a membránhoz kötött CD26 expresszió között, ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a vizsgált fehérje aktivitásának és expressziójának változása T1DM-ben nem közvetlenül a szénhidrát háztartás változásának függvénye, hanem a betegség kórfolyamatának jellemző paramétere lehet.

6. Következtetések

Munkacsoportunk elsőként írta le, hogy az enterohormonális tengelyhez tartozó szérumban DPP-4 aktivitása változik T1DM-ben. A szénhidrát anyagcsere és egyéb fontos klinikai paraméterek valamint a vizsgált DPP-4 szérumban enzimaktivitása, illetve T-lymphocyták sejtfelszíni expressziója között egyik vizsgált csoportban sem találtunk közvetlen összefüggést, ezért valószínűnek tűnik, hogy a tapasztalt eltérések nem a szénhidrát anyagcsere változásának függvényében változnak. A magasabb szérumban enzimaktivitás részleges alapjául szolgálhat esetleges későbbi klinikai vizsgálatoknak amelyekben DPP-4 gátlókat alkalmaznának ebben a betegcsoportban is.

Eredményeink klinikai jelentőségét jelzi és a téma újszerűségére utal, hogy a DPP-4 gátló szitagliptin hatásának vizsgálatáról T1DM-ben mindezidáig mindössze egyetlen közelmúltban publikált vizsgálat számol be. Ellis és munkacsoportja 20 beteg bevonásával 8 hetes, kettős vak, véletlen besorolású, crossover vizsgálat során a betegeket két csoportra osztva 100mg szitagliptin illetve placebo adását követően szérumban glükóz, HbA1c valamint a szükséges inzulin dózisának változását vizsgálta T1DM betegekben⁸⁰. A különböző kezelést a „két karon” lévő betegeken 4 hét múlva megcserélték. A vizsgálat megállapította, hogy a 100mg szitagliptin kezelés szignifikánsan javította a HbA1c szintet és csökkentette az inzulinigényt. A DPP-4 gátlók alkalmazásának T1DM betegekre való kiterjesztésére irányuló felvetéseink tehát helyállónak bizonyulnak a napjainkban elvégzett klinikai vizsgálatok alapján.

Tekintettel arra, hogy a DPP-4 gátlók nemcsak – de számottevően - az inkretin tengelyen keresztül hatnak, érdemes megemlíteni, hogy már vannak publikált adatok GLP-1 mimetikum Liraglutide alkalmazásával kapcsolatban is T1DM-ben. Kielgast és munkatársai 2010-ben publikált eredményei szerint egy 4 hetes 29 T1DM beteg bevonásával készült tanulmányban a kezelés Liraglutiddal történő kiegészítése az inzulin dózis csökkenését eredményezte mind a C-peptid pozitív (10 beteg) mind a C-peptid negatív (19 beteg) kezelésében az anyagcsere paraméterek romlása nélkül. A Liraglutid kezelés mellett folyamatos glükóz monitorozás során azt találták, hogy

szignifikánsan csökkent azon időtartam a C-peptid pozitív betegekben - de a C-peptid negatívokban is trendszerű csökkenés volt megfigyelhető - amelyet a páciens 3,9 mmol/L vércukorszinten tölt^{81.82}. Klinikai gyakorlati jelentősége ennek a megfigyelésnek hosszútávon különösen fontos lehet, hiszen a legodaadóbb kezelés mellett is mindennapi problémát jelent a hypoglycaemias állapotok fellépése a T1DM betegekben.

Részben saját vizsgálati eredményekből, részben az előbbieken ismertetett „pilot” vizsgálatok eredményei alapján összegzésként az enteroinzularis tengelyen ható gyógyszerek T1DM-ben történő alkalmazásával kapcsolatban a következő szempontokat emelhetnénk ki:

1. A magasabb szérumszintű DPP-4 aktivitás csökkenthető DPP-4 gátlókkal.
2. A DPP-4 gátlás következtében a GLP-1 hatás az immunregulációt is befolyásolhatja⁸³.
3. Inkretinek által közvetített béta-sejt protektív hatás. A GLP-1 védő hatása bizonyított a proinflammatorikus citokinek béta-sejteken történő antiproliferatív hatásával szemben⁸⁴.
4. Mind a DPP-4 inhibitor, mind a Liraglutidot alkalmazó vizsgálatokban csökkent a T1DM betegek inzulinigénye - a GLP-1 analógot alkalmazó pilot vizsgálatban két beteg esetében az inzulin teljesen elhagyható volt. Igaz ugyan, hogy ez a vizsgálat az úgynevezett „honeymoon” periódusban zajlott.
5. Valódi klinikai argumentumként értékelhető, hogy a GLP-1 receptorokon ható gyógyszerekkel kezelt T1DM betegcsoportban folyamatos glükózmonitorozással bizonyítva kimutatható volt, hogy a betegek kevesebb időt töltenek alacsonyabb (3,9mmol/L) vércukorszint tartományban.

6. Egyes típusú diabéteszben a hypoglycaemiara bekövetkező glucagon emelkedés mértéke kóros, mert szigeten belüli /intra islet/ inzulinhatás hiány áll fell az alfa-sejteken. Ugyanakkor az enteroinzularis tengelyen ható gyógyszerek ezen tekintetben javíthatják az alfa sejt diszregulációját. Kilenc T1DM betegen négy hét liraglutid kezelést követően a postprandialis glucagon szekréció csökkenését is ki lehetett mutatni⁸⁴.
7. Kettős diabéteszben, inzulin rezisztens és autoimmun diabéteszben is további előnyökkel járhat az enteroinzularis tengely gyógyszeres befolyásolása. A jövő lehetőségeiről gondolkodva nemzetközi összehasonlításban már olyan vizsgálat is folyamatban van, amelyben az enteroinzularis tengelyen ható két gyógyszeres kezelési lehetőség: DPP-4 gátlók és GLP-1 analóg terápia közvetlen összehasonlítása történik /azonosító: NCT01235819/. Az eredmények egyelőre nem hozzáférhetőek.

Vizsgálataink alapján azt a következtetést is levontuk, hogy mind a szolubilis DPP-4, mind a T- lymphocytá felszínhez kötött CD26 expresszió változása jellemző T1DM-ben, a két marker pedig szerepet játszhat az autoimmun T1DM immunregulációs folyamatainak szabályozásában, melyek megértése további vizsgálatokat sürget.

Vizsgáltuk a szérumban DPP-4 aktivitás kombinált diagnosztikai tesztként való lehetséges alkalmazását is. Kombináltan használva a fokozza ugyan a vizsgált autoimmun markerek érzékenységét T1DM-ben, önállóan alkalmazva azonban alacsony specificitása miatt nem alkalmas a T1DM diagnosztikájára.

A vizsgálatainkban T1DM-ben észlelt, membránhoz kötött, csökkent T-lymphocytá CD26 expresszió tekintetében arra a következtetésre jutottunk, hogy az elváltozás összefüggésben állhat az alapfolyamat autoimmun természetével. Tekintettel a T1DM-ben emelkedett a szérumban DPP-4 enzimaktivitásra, valamint a T-lymphocyták felszínén a csökkent CD26 expresszióra, a betegség autoimmun jellegére és a fehérje immunfolyamatokban játszott szerepére az emelkedett enzimaktivitás háttérben valószínűsíthetően állhat:

1. Maga az autoimmun folyamat, amelyet a T-lymphocyták felszínén tapasztalt csökkent CD26 expresszió is megerősíthet. A csökkent expresszió a T-lymphocyták felszínén a CD26 kostimulációs szignál miatt elvben diszfunkció jele is lehet. A folyamat részét képezheti a T1DM-ben még nem teljességében feltárt regulátoros T-sejt funkciózavarnak.
2. Hormonális feedback mechanizmus, amelyben a csökkent béta-sejt tömeg és inzulintermelés megtartására illetve megvédésére irányuló fokozott inkretin (GLP-1, GIP) hormon elválasztást követheti következményesen a fokozott DPP-4 aktivitás. Az inkretinek mérésére ebben a vizsgálatban nem volt módunk.
3. Esetleges célszervkárosodás. (A vizsgálatban részt vevő betegekben nem találtunk összefüggést sem a diabéteszes retinopathia fennállása sem a microalbuminuria jelenléte sem a neuropathia kialakulása és a szolubilis illetve a membránhoz kötött DPP-4 expresszió változása között.)
4. Elméletileg szóba jövő magyarázatként felmerülhet autoimmun társbetegség (RA, Basedow- Graves, SLE) jelenléte is. Mindazonáltal jelen beválasztott vizsgált populációban ezt a feltételezést megerősíteni nem tudtuk.
5. Megelőző vírusinfekció (EBV) ill. krónikus vírusfertőzés pl: C-vírus hepatitis⁵¹ szintén magasabb a szérumban DPP-4 enzimaktivitást eredményez. Egyes típusú diabetes kialakulásával kapcsolatban számos átvészelt vírusfertőzést (CMV, coxsackie, parvo, rota, rubeola) hoztak összefüggésbe^{9,10,11}.

7. Összefoglalás

A Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4/CD26) enzim napjainkban elsősorban a szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatása miatt került a figyelem középpontjába. Bár a fehérjét már számos egyéb betegségben vizsgálták, elenyésző adatunk van autoimmun diabéteszben betöltött szerepéről. A molekula jelentősége az immunregulációs folyamatokon alapuló betegségek esetében számos esetben nyert már bizonyítást, a működés pontos mechanizmusa teljes részleteiben még nem ismert.

Az eddigi kutatások nem fordítottak jelentős figyelmet az enzimaktivitás vizsgálatára 1-es típusú cukorbetegségben annak ellenére, hogy ebben a szénhidrát anyagcserezavarral járó autoimmun megbetegedésben, az immunrendszer aktivitásában is szerepet játszó molekulák pontosabb, részletesebb vizsgálata a betegség patomechanizmusának, szűrésének vagy esetleges prevenciójának szempontjából is különösen fontos.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a DPP-4 molekula, sokoldalú funkciója eredményeképpen autoimmun T1DM-ben nem csak az enteroinzuláris rendszer, de az immunfolyamatok szabályozásában is meghatározó lehet. Eredményeink rávilágítanak arra is, hogy a DPP-4 aktivitás mérése a jelenleg használt autoimmun markerek és standard laborparaméterek meghatározása mellett hozzájárulhat a cukorbetegség pontosabb klasszifikációjához.

A vizsgálatainkban észlelt emelkedett DPP-4 enzim aktivitás és az ezzel feltételezhetően kapcsolatban álló autoimmun dysregulációs folyamatok tekintetében elsőként vetettük fel a lehetőségét a DPP-4 gátlók klinikai alkalmazásának kibővítésére T1DM-ben. Hasonló irodalmi eredmények, hipotézisek ebben a témában csak korlátozott számban voltak hozzáférhetőek, jelenlegi ismereteink szerint ez az egyetlen vizsgálat ebben a témában.

Bár jelen vizsgálatunkban, sem az inkretin szintek mérésére sem a DPP-4 működésének vizsgálatára nem volt módunk, a vizsgálatban mégis eddig még nem

közölt, a betegség patomechanizmusa, diagnózisa esetleg kezelése tekintetében is fontos eredményeket közlünk, melyek alapjául szolgálhatnak további eredményes kutatásoknak. Jelenlegi ismereteink szerint azonban indultak már olyan összehasonlító vizsgálatok, ahol a DPP-4 gátlók hatékonyságát hasonlítják össze GLP-1 mimmetikumok hatékonyságával T1DM-ben. Ezek közül egy, Indiában végzett egy éves lezárult vizsgálat a GLP-1 analóg és DPP-4 gátlók hatását hasonlította össze T1DM-ben, amely hasznos eredményekkel szolgálhat majd a klinikum szempontjából. Ezen vizsgálatok eredményei azonban egyelőre sajnos nem hozzáférhetőek.

Vizsgálatunkig mindezidáig autoimmun diabétessel kapcsolatban publikált CD26 expresszió vagy szérum DPP-4 meghatározás sem történt. Eredményink ezért ezen a téren is úttörő jelentőséggel bírhatnak és alapját képezhetik további ilyen irányú vizsgálatoknak.

Munkacsoportunk által elvégzett viszonylag nagy beteganyagon végzett vizsgálataink jelentőségét a közelmúltban és napjainkban megjelent publikációk igazolják. Remélhetőleg munkánk hasznos alapját képezi majd további kutatásoknak és segítheti a betegség pathomechanizmusának pontosabb megismerését, az autoimmun diabétesz eddig ismert kezelési lehetőségeinek kiterjesztését is.

8. Summary

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4, CD26) has been in the focus of attention mainly because of its impact on the carbohydrate metabolism these days. Although the protein has been studied in several autoimmune and other diseases, little data is available on the role of DPP-4 in autoimmune type 1 diabetes mellitus. The significance of DPP-4 on diseases based on immunoregulatory processes, have already been demonstrated in several cases but the exact mechanism has not been known yet.

Past research has not devoted significant attention to the DPP-4 enzyme activity in type 1 diabetes, despite the fact that detailed, accurate investigation of involved molecules in the autoimmune process could be essential in the pathogenesis or possible prevention of the disease.

In our study we found that the DPP-4 molecule may play a significant role not only in the regulation of the enteroinsular system but also in the regulation of immune processes. Our results highlight that in addition to the currently used autoimmune markers and standard laboratory parameters, the measurement of DPP-4 activity may contribute to more exact, better classification of diabetes.

Beta-cell protective effect of gliptins in relation to the incretins is well-known therefore DPP-4 inhibitors currently used in the field of type 2 diabetes. Elevated levels of DPP-4 enzyme activity and the presumably associated autoimmune, dysregulated processes that were observed in our study may draw attention to the extension of the field of application of DPP-4 inhibitors. A recent study in which the administration of sitagliptin reduced significantly the total insulin dose, HbA1c and blood glucose levels in T1DM, may demonstrate the clinical relevance of our results.

Although in the present study we had no opportunity to investigate neither the serum incretin levels nor the function of the DPP-4 molecule, we still feel that our result might provide some basis for the clinical implication of DPP-4 inhibition in

patients with T1DM and some basis for further clinical investigation in the evaluation of the pathomechanism and diagnosis of this autoimmune disease.

9. Irodalomjegyzék

1. Tulassay Zs. Diabetes mellitus. In: Jermendy Gy, Hosszúfalusi N (2011) A belgyógyászat alapjai II., Medicina, Budapest, 1577-1634.
2. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, Silink M (2004) Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care*. 27:1798-1811.
3. Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 15:539-553.
4. Jermendy G, Nádas J, Szigethy E, Széles G, Nagy A, Hídvégi T, Paragh G, Adány R. (2010) Prevalence rate of diabetes mellitus and impaired fasting glycemia in Hungary: cross-sectional study on nationally representative sample of people aged 20-69 years. *Croat Med J*. 51:151-156.
5. Atkinson MA, Maclaren NK. (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 331: 1428-1436.
6. Gerő L. (2010) Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy. *Orv Hetil*. 151:533-539.
7. Kis J, Engelmann P, Heyam J, Orbán T. (2006) Az immunológiai prevenció lehetősége 1-es típusú diabetes mellitusban. *LAM*, 16: 771-773.
8. Polychronakos C, Li Q. (2011) Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet*. 12:781-792.

9. Diaz-Horta O, Baj A, Maccari G, Salvatoni A, Toniolo A. (2012) Enteroviruses and causality of type 1 diabetes: how close are we? *Pediatr. Diabetes*. 13:92-99
10. Tauriainen S, Oikarinen S, Oikarinen M, Hyöty H. (2011) Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Semin. Immunopathol*. 33:45-55.
11. Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Fuchtenbusch M, Ziegler AG, Kondrashova A, Romanov A, Kaplan B, Laron Z, Koskela P, Vesikari T, Huhtala H, Knip M, Hyöty H. (2005) Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation. *Diabetologia*, 48:1280-1287.
12. Goldfarb MF. (2008) Relation of time of introduction of cow milk protein to an infant and risk of type-1 diabetes mellitus. *J Proteome Res*. 7:2165-2167.
13. Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO. (2005) Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 18425-1830.
14. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. (1998) Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet β -Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Biochemical Pharmacology*, 55: 1139-1149.
15. Ejrnaes M, Videbaek N, Christen U, Cooke A, Michelsen BK, von Herrath M. (2005) Different diabetogenic potential of autoaggressive CD8+ clones associated with IFN-gamma-inducible protein 10 (CXC chemokine ligand 10) production but not cytokine expression, cytolytic activity, or homing characteristics. *J Immunol*, 174: 2746-2755.

16. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793.
17. Karlsson MG, Lawesson SS, Ludvigsson J. (2000) Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetologia*, 43: 742-749.
18. Rachmiel M, Bloch O, Bistrizter T, Weintrob N, Ofan R, Koren-Morag N, Rapoport MJ. (2006) Th1/Th2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma. *Cytokine* 34: 170-176.
19. Katz JD, Benoist C, Mathis D. (1995) T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science*, 268: 1185–1188.
20. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. (2002) Origin of reg T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*, 3: 756-763.
21. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001) Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev*, 182: 58-67.
22. Juedes AE, von Herrath MG. (2004) Regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 20: 446-451.
23. Hosszúfalusi N, Pánczél P. (2005) Az autoantitest-meghatározás jelentősége diabetes mellitusban *LAM* 15:135-137
24. Lukács K, Hermann R (2007) Az 1-es típusú diabetes mellitus genetikai háttere, patogenezise és a legújabb prevenciók kutatások helyzete. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle* 12 :51-62.
25. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS. (1998) Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody,

- GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes*, 47: 1857–1866
26. Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL. (1999) Autoantigens IA-2 and GAD in type 1 (insulin- dependent) diabetes. *Diabetologia*, 42: 3–14.
 27. Barker JM. (2006) Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(4):1210-1217.
 28. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. (2011) The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* Nov 8. doi: 10.1038/nrendo.2011.183.
 29. Freeman H, Cox R. D. (2006), Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Human Molecular Genetics*, 15:202–209.
 30. Ntzani EE, Kavvoura FK. (2012) Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes: Insights from the Emerging Genomic Evidence. *Curr Vasc Pharmacol.* 10:147-155.
 31. O'Doherty R., Stein D.,Foley J. (1997) Insulin resistance. *Diabetologia* 40:B10-B15
 32. Boden G, Shulman GI. (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes defining their role in the development of insulin resistance and betacell dysfunction. *Eur J Clin Invest*; 32 :14-23.
 33. Arner P. (2001) Free fatty acids – do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab.* 3:S11-19.

34. Jermendy G. (2011) Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors (gliptins): a new class of oral antidiabetic drugs. *Orv Hetil.* 152:1471-1476.
35. Scheen AJ. (2012) DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes: A critical review of head-to-head trials. *Diabetes Metab.*38:89-101
36. McFarland MS, Brock M, Ryals C. (2011) Place in therapy for liraglutide and saxagliptin for type 2 diabetes. *South Med J.* 104:426-439.
37. Cernea S. (2011) The role of incretin therapy at different stages of diabetes. *Rev. Diabet. Stud.* Fall. 8:323-338.
38. Kvapil M. (2011) Incretins have changed and continue to change treatment strategy for type 2 diabetes. *Vnitr Lek.* 57:916-918.
39. Klonoff DC. (2010) Incretin therapy for type 2 diabetes mellitus *Adv. Ther.* 27:881-894.
40. Winkler G. (2011) The physiology of incretins. *Orv. Hetil.* 152(48):1922-1930.
41. Baggio LL, Drucker DJ. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132:2131-2157
42. Deacon CF, Ahrén B. (2011) Physiology of incretins in health and disease. *Rev. Diabet. Stud.* 8:293-306.
43. Drucker DJ. (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3:153-165.
44. Kazafeos K. (2011) Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Prac.* 93 Suppl 1: S32-36.

45. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schäfer T, Wank U, Arnold R, Göke B. (1996) Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *The Journal of clinical investigation*. 97:92-103.
46. Gorell MD. (2005) Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clinical Science*. 108:277-292.
47. Gorrell, M. D., Gysbers, V., McCaughan, G. W. (2001) CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol*. 54: 249–264.
48. Lee HJ, Chen YS, Chou CY, Chien CH, Lin CH, Chang GG, Chen X. (2006) Investigation of the Dimer Interface and Substrate Specificity of Prolyl Dipeptidase DPP8. *J Biol Chem*. 281:38653-38662.
49. Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. (2008) Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Frontiers in Bioscience* 13:2299-2310.
50. Vlahović P., Avramović V., Stanković M., Savić S., and Todorović M.(2007) Elevated serum dipeptidyl peptidase IV activity in patients with chronic tonsillitis. *Ann Clin Biochem*; 44:70-74.
51. Keane N. M., Price P., Lee S., Stone S. F & French M. A. (2001) An evaluation of serum soluble CD30 levels and serum CD26 (DPPIV) enzyme activity as markers of type 2 and type 1 cytokines in HIV patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 126:111-116
52. Firneisz G.; Lakatos P. L.; Szalay F. (2001) Serum Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV, CD26) Activity in Chronic Hepatitis C. *Scand J Gastroenterol*. 8:877 – 880.

53. Varljen J., Mijandru B., Bati L., Varljen N., Detel D., Leki A. (2005) Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with crohn's disease and ulcerative colitis. *Croatia Chem. Acta* 78:427-432.
54. Stancikova M, Lojda Z, Lukac J, Ruzickova M (1992) Dipeptidyl peptidase IV in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 10:381–385.
55. Schonermarck U, Csernok E, Trabandt A, Hansen H, Gross WL (2000) Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol* 18:457–463.
56. Kobayashi H, Hosono U, Mimori T, Kawasaki H, Hoang Dang N, Tanaka H, Morimoto C (2000) Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 29:1858–1866.
57. Cordero OJ, Salgado FJ, Meravarela A, Nogueira M (2001) Serum interleukin-12, interleukin- 15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 21:69–74.
58. Kelemen K, Guitart J, Kuzel TM, Goolsby CL, Peterson LC. (2008) The usefulness of CD26 in flow cytometric analysis of peripheral blood in Sézary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 129:146-156.
59. Bock O, Kreiselmeier I, Mrowietz U. (2001) Expression of dipeptidyl-peptidase IV (CD26) on CD8+ T cells is significantly decreased in patients with psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 10:414-419.

60. Van den Oord JJ. (1998) Expression of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in benign and malignant pigment-cell lesions of the skin. *Br J Dermatol.* 138:615-621.
61. Kajiyama H, Kikkawa F, Maeda O, Suzuki T, Ino K, Mizutani S. (2002) Increased expression of dipeptidyl peptidase IV in human mesothelial cells by malignant ascites from ovarian carcinoma patients. *Oncology.* 63:158-165.
62. Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. (2008) The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 13:1634-45
63. Zhang MZ, Qiao YH, Suo ZH. (2008) Correlation of DPPIV expression with clinicopathological features and prognosis in epithelial ovarian carcinoma. *Chinese Journal of Oncology.* 30:848-52
64. Stremenová J, Mares V, Lisá V, Hilser M, Krepela E, Vanicková Z, Syrucek M, Soula O, Sedo A. (2010) Expression of dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs in human meningiomas. *Int J Oncol.* 36:351-358
65. Knop, FK., Vilsboll, T., Hojberg, PV. (2007) Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 56:1951–1959.
66. Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Steinbrecher A, Brocke S, Kähne T, Wrenger S, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S. (2000) Dipeptidyl peptidase IV (CD26): role in T cell activation and autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol.* 477:155-160.
67. Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, Nishibashi K, Iwata S, Morimoto C (2005) CD26 mediates dissociation of Tollip and IRAK-1 from caveolin-1

and induces upregulation of CD86 on antigen-presenting cells. *Mol Cell Biol* 25:7743–7757.

68. Ohnuma K, Inoue H, Uchiyama M, Yamochi T, Hosono OD, Nam H, Morimoto C (2006) T-cell activation via CD26 and caveolin-1 in rheumatoid synovium. *Mod Rheumatol* 16:3–13.
69. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C (2008) Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol* 29 :295–301.
70. Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. (2011) Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. *Adv Clin Chem.*53:51-84.
71. Morimoto C, Schlossman SF. (1998) The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev.* 161:55-70.
72. Ikushima, H., Munakata, Y., Iwata, S. (2002) Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cell. Immunol.*,215: 106–110.
73. Drucker DJ, Nauck MA. (2006) The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonist and dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 268: 1696-705.
74. Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, Cremasco F, Ognibene A, Rotella CM. (2005).Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 48:1168-1172.
75. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Fehér J, Ghyczy D, Wichmann B, Selmei L, Tulassay Z, Rácz K, Somogyi A. (2010) Serum dipeptidyl peptidase-4

activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One*.18;5:e12226. doi: 10.1371/journal.pone.0012226. 5: e12226.

76. Selmeçi L, Szokodi I, Horvat-Karajz K. (1996) A sensitive microplate-based continuous monitoring (kinetic) assay for serum neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) activity. *Clin Chim Acta* 244:111–116.
77. Ryskjaer J, Deacon CF, Carr RD, Krarup T, Madsbad S, Holst J, Vilsboll T. (2006) Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake. *Eur J Endocrinol*. 155:485-493.
78. Varga T, Firneisz G, Somogyi A. (2008) Higher serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes mellitus than in type 2: a direct comparison. *Diabetologia* 51: S239, A589
79. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Racz K, Selmeçi L, Firneisz G. (2011) Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res*.17:925-930
80. Kaas A, Andersen ML, Fredheim S, Hougaard P, Buschard K, Petersen JS, de Beaufort C, Robertson KJ, Hansen L, Mortensen HB, Nielsen LB. (2012) Proinsulin, GLP-1, and glucagon are associated with partial remission in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 13:51-58.
81. Ellis SL, Moser EG, Snell-Bergeon JK, Gutin RS, Rodionova AS, Garg SK (2011) Effect of sitagliptin on glucose control in patients with type 1 diabetes- a pilot study. *Diabet Med*. 28:1176-1181.

82. Kielgast U, Holst J, Madsbad S. (2010) Treatment of type 1 diabetic patients with residual beta cell function with the once-daily glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide. *Diabetologia* 53: S340, A 853
83. Kielgast U, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S. (2011) Four weeks of treatment with liraglutide reduces insulin dose without loss of glycemic control in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes Care*. 34:1463-1468
84. Hadjyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. (2010) Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. *Diabetologia*. 53:730-740.
85. Consoli A, Di Biagio R. (2011) Protective effects of glucagone-like peptide-1 on beta-cells: preclinial and clinical data. *G. Ital Cardiol*. 12::5-9.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Az értekezés témájában megjelent teljes terjedelmű közlemények

1. **Varga T**, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Racz K, Selmei L, Firneisz G. (2011) Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res.*17:925-930.
2. **Varga T**, Firneisz G, Nagy G, Somogyi A. (2010) Elevated serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes mellitus: a direct comparison. *Orv Hetil.* 151:899-902.
3. Firneisz G, **Varga T**, Lengyel G, Fehér J, Ghyczy D, Wichmann B, Selmei L, Tulassay Z, Rác K, Somogyi A. (2010) Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One* 5: e12226.

10.2 Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

4. Vastagh I, Horváth T, Nagy G, **Varga T**, Juhász E, Juhász V, Kollai M, Bereczki D, Somogyi A. (2010) Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 26:646-655
5. Nagy G, Ronai Z, Somogyi A, Sasvari-Szekely M, Rahman OA, Mate A, **Varga T**, Nemoda Z. (2008) ZP2RX7 Gln460Arg polymorphism is associated with depression among diabetic patients *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:1884-1888.
6. **Varga T**, Somogyi A, Csíky G, Révész M, Firneisz G. (2008) A 2-es típusú cukorbetegség kezelésének új lehetőségei: a dipeptidil-peptidáz-IV-gátlók, GLP-1-agonisták. *Magyar Belorvosi Archivum* 61:89-92.

7. Somogyi A, Ruzicska E, **Varga T**, Rácz K, Nagy G. (2007) Tünetmentes gyomorcarcinoid kialakulása 1-es típusú diabéteszben és primer hypothereosisban szenvedő betegben. Orv Hetil. 148:1667-1671.

8. Somfai G; Ferencz M; Fiedler O; **Varga T**; Somogyi A; Németh J.(2007) Diabeteses retinopathia a XXI. század elején : prevenció, diagnosztika és terápia Magyar Belorvosi Archivum. 60:123-127.

11. Köszönetnyilvánítás

Megkülönböztetett köszönet illeti témavezetőmet Professor Somogyi Anikót, aki végtelen türelmével, töretlen biztatásával és magas színvonalú szakmai támogatásával segítette doktori munkámat, és akitől a munkám során felmerülő problémákra mindig önzetlen segítséget kaptam.

Köszönöm Firneisz Gábor társ-témavezetőmnek, hogy elkötelezett és szigorú jellemével, kitartásával hozzájárult dolgozatom teljessé tételéhez és javaslataival, tanácsaival időt nem sajnálva építette munkám színvonalát, a közlemények megírásával kapcsolatos hasznos tanácsaival segítette azoknak teljesebbé tételét.

Köszönöm Rácz Károly Professor Úrnak hogy kutatásaimat az II.sz Belgyógyászati Klinika beteganyagából az Anyagcsere labor keretein belül végezhettem és hogy hasznos észrevételeivel segítette munkámat.

Köszönöm Zóka Andrásnak és Révész Mónikának, akik hallgatóként szorgalmasan tevékenykedtek a betegek vizsgálata körüli feladatokban és szabadidejükben rengeteget segítettek az adminisztratív munkák elvégzésében.

Szeretném megköszönni Wichmann Barnának a dolgozat statisztikai részében nyújtott segítőkész, kiváló munkájáért, türelméért.

Köszönöm Matolesy András Professor Úrnak, hogy az I.sz Pathológiai Intézet Flow Citometria laborjában a kutatáshoz szükséges vizsgálatokat elvégezhettem.

Köszönettel tartozom Barna Gábornak és Szabó Orsolyának, akik rengeteg türelemmel és segítőkészséggel felfegyverkezve álltak mellettem a flow citometriás vizsgálatok kivitelezésénél és az eredmények kiértékelésénél.

Köszönöm Herold Magdolnának és Herold Zoltánnak, aki az anyagcsere laborban történő vizsgálatok lebonyolításában és értékes tapasztalatok megosztásával sokoldalúan segítették munkámat és rengeteg segítséget nyújtottak a vizsgálatok kivitelezése során is.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II.sz Belgyógyászati Klinika valamennyi munkatársának a baráti, inspiráló atmoszférát.

Végezetül, de nem utolsó sorban külön köszönet illeti szüleimet, barátomat és barátaimat, akik türelmükkel és állandó támogatásukkal végigkísértek ezen az úton.