

A hyperglycaemia neonatális és gyermekkori vonatkozásai

A hyperglycaemia jelentősége a neonatológiában

Foetális lymphocyták 1-es típusú diabetes mellitusban gyermekkorban

egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Gyarmati Judit

Doktori Iskola Vezetője:

Prof. Dr. Bódis József egyetemi tanár, a MTA Doktora, dékán

Témavezető:

Prof. Dr. Ertl Tibor egyetemi tanár, a MTA Doktora

Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar,

Egészségtudományi Doktori Iskola

2009

I. Bevezetés

A magas vércukorszint jelentősége napjaink orvostudományában növekszik, mely egyrészt az előfordulási gyakoriság emelkedésével, másrészt a kórképpel összefüggő rövid és hosszútávú komplikációk kialakulásával függ össze. A belgyógyász, geriátriai szakember mellett ma a gyermekgyógyász és a neonatológus is egyre gyakrabban találkozik a cukorháztartás átmeneti vagy tartós működési zavarával.

A gyermekkorban előforduló hyperglycaemiáról többségében a cukorháztartás tartós zavarával járó autoimmun betegség, az 1-es típusú diabetes mellitus (T1DM) kapcsán beszélünk. A T1DM krónikus szerv-specifikus autoimmun kórkép, melynek kezdeti tünetmentes szakaszában zajló inflammatorikus folyamatok a pancreas B-sejtek maradandó károsodását idézik elő. Számos információval rendelkezünk a kórkép hátterében álló genetikai és környezeti tényezőkről, és a T lymphocyták meghatározó szerepéről a patogenezisben. Ismereteink jelentős része az immunválasz antigén-specifikus elemeivel függ össze, ugyanakkor kevés ismerettel rendelkezünk a veleszületett és szerzett immunitás közt mintegy hidat képező nem konvencionális lymphocyták $\gamma\delta$ T, CD5+ B és NK T lymphocyták- szerepéről a diabetes kialakulásában. Mind a $\gamma\delta$ T, mind a CD5+ B lymphocytá alcsoportok szerepet játszanak az immunválasz szabályozásában és a saját struktúrákkal szembeni immuntolerancia fenntartásában. Jelenlegi tudásunk alapján a T1DM kialakulása az immunszabályozás összetett zavarával áll összefüggésben, mely felveti az említett sejtek szerepét a diabetesessel kapcsolatos immunregulációs zavarban.

A cukorháztartás újszülött és gyermekkorban észlelt átmeneti zavarai a diabetes mellitusnál kevesebb figyelmet kapnak, annak ellenére, hogy újszülött és gyermek intenzív osztályokon ápolat kritikus állapotú betegekben gyakori komplikáció a hyperglycaemia. Előfordulása szoros összefüggést mutat a magasabb halálozási rátával, továbbá a hosszabb ápolási időtartammal. Felnőtt intenzív osztályon ápolat betegek adatai alapján euglycaemia fenntartása kedvezően befolyásolja a betegség-specifikus kimenetelt, mely a glucose-háztartás szoros kontrolljának szükségességére hívja fel a figyelmet. Az elmúlt évtizedekben a koraszülöttek túlélési esélyének javulásával és az életképesség alsó határának alacsonyabb gesztációs kor fele tolódásával az újszülött intenzív osztályok beteganyagában jelentősen emelkedett az igen alacsony születési súlyú koraszülöttek száma, mely új problémák megjelenését eredményezte. A 70-es évekig megjelent neonatológiai kézikönyvek az újszülöttkori hyperglycaemiát jobbra egy ritka kórkép -a tranziens neonatális diabetes- kapcsán érintették. *Dweck és mtsai* 1974-ben megjelent tanulmánya óta több közlemény támasztja alá, hogy a perinatális időszakban az éretlen újszülöttek jelentős hányadában fordul elő vércukorszint emelkedés.

Ugyanakkor az egyes tanulmányok igen eltérő előfordulási gyakoriságokról számolnak be, mely részben a kórkép mindmáig nem egységes definíciójával, illetve az eltérő kezelési és monitorizálási elvekkel függ össze. Emellett jelenleg kevés információval rendelkezünk az igen alacsony gesztációs korú koraszülöttek glucose-háztartásának jellegzetességeiről, továbbá a hyperglycaemia rövid és hosszútávú következményeiről. Az igen éretlen koraszülöttekben a magas vércukorszint előfordulása jelentős hatással van a koraszülöttséggel kapcsolatos komplikációk kialakulására és az életkilátásokra. Ugyanakkor e kritikus időszakban a hyperglycaemia jelenléte, esetleges insulin-kezelés alapvetően befolyásolhatja azon endokrin és immunológiai folyamatokat, melyek hatással lehetnek felnőtt korban a cukorháztartás működésére és a testösszetétel alakulására. Mindezek által a neonatális hyperglycaemia kérdésköre jóval túlmutathat a neonatológia határain.

II. Célkitűzések

II/1. A cukorháztartás perinatális vonatkozásai és a koraszülöttekben előforduló hyperglycaemia vizsgálata

II/1.1 Jelenleg kevés vizsgálat foglalkozik a koraszülöttek hyperglycaemiájával, hazai eredmények pedig egyáltalán nem állnak rendelkezésre. Célkitűzésünk között szerepelt, hogy

- saját koraszülött beteganyagunkban vizsgáljuk a hyperglycaemia előfordulási gyakoriságát a koraszülöttek egyes alcsoportjaiban,
- feltárjuk a magas vércukorszint kialakulása háttérében álló kóroki tényezőket,
- elemezzük a hyperglycaemiával kapcsolatos komplikációk előfordulását.

II/1.2. *Garg és mtsai* 2003-ban megjelent közleményükben a hyperglycaemia és a súlyos koraszülött retinopathia (ROP) előfordulása közti összefüggésről számoltak be ELBW (extremely low birth weight; születési súly < 1000 gramm) koraszülöttekben. Fenti megfigyelés megerősítése és a hyperglycaemia esetleges kóroki szerepének bizonyítása új lehetőséget kínálhat a prevencióban, tekintettel arra, hogy a ROP incidenciájának emelkedése ellenére az oxigén szerepének feltárása óta nem történt jelentős előrelépés a ROP megelőzése irányában.

Célul tűztük ki, hogy

- tanulmányozzuk, van-e összefüggés a ROP bármilyen stádiumának kialakulása és a hyperglycaemia előfordulása között 1500 gramm alatti súllyal született (very low birth weight; VLBW) koraszülöttekben,
- elemezzük a retinopathia kialakulásának további rizikótényezőit,
- vizsgáljuk, hogy a születési súlykategóriák szerint észlelhető-e eltérés e rizikófaktorok tekintetében.

II/1.3. A szénhidrát-anyagcsere diabetes mellitussal kapcsolatos zavarának ellenőrzése során használt glycaemiás markerek újszülöttekben, koraszülöttekben történő vizsgálatával

kapcsolatosan kevés adat áll rendelkezésre. A szérumban fructosamine pozitív összefüggést mutat a mintavételt megelőző ~3 hetes időintervallum vércukorértékeivel.

- Tanulmányunkban vizsgáljuk, hogy a szérumban fructosamine szintek perinatális időszakban történő meghatározása szolgál-e új információval a koraszülöttek és újszülöttek, illetve a magzat cukorháztartásával kapcsolatban.
- Elemezzük, hogy a hyperglycaemiás koraszülöttekben észlelhető-e eltérés a fructosamine szintekben normoglycaemiás koraszülöttekkel összehasonlítva.
- Keressük a választ azon kérdésre, hogy a marker alkalmazható-e a neonatális hyperglycaemiával kapcsolatos utóképek prognosztizálására.

II./1.4. A leptin fontos szerepet játszik a zsírszövet mennyiségének és a testösszetételnek alakításában felnőtt korban. Szintje alacsonyabb koraszülöttekben, mint érett újszülöttekben, és születést követően emelkedést mutat. Felmerül a kérdés, hogy a vércukorszinteknek, illetve a hyperglycaemiának milyen hatása van a leptin-szintek alakulására, továbbá hogy a leptin játszik-e szerepet koraszülöttek későbbi életkorban kialakuló obezitásában és 2-es típusú diabetesben. Saját vizsgálataink az első kérdés megválaszolására tesznek kísérletet experimentális szinten.

Célkitűzéseink között szerepelt, hogy

- tanulmányozzuk, hogy patkány zsírszövetekben a glucosénak, illetve a glucose koncentráció változásának van-e hatása a leptin-eltávolításra,
- vizsgáljuk, hogy glucose mellett más energiaszolgáltató szubsztrátok hogyan befolyásolják a leptin-eltávolítást *in vitro*,
- meghatározzuk, hogy az insulinnak van-e járulékos hatása a leptin-eltávolításra *in vitro*,
- izolált zsírszövetekben vizsgáljuk a sejtszintű összekapcsoló mechanizmust a glucose+insulin stimulus és a kísérő leptin-szekréció között, és megválaszoljuk, hogy az intracelluláris kalcium-koncentráció változás játszik-e szerepet a folyamatban.

II./2. Keringő $\gamma\delta$ T és CD5+ B lymphocyták vizsgálata gyermekkori T1DM-ban

II/2.1., II/2.2. Jelenleg kevés információval rendelkezünk arról, hogy a normál immuntolerancia fenntartásában is szerepet játszó úgynevezett „foetális lymphocyták”-nak (CD5+B lymphocyták és $\gamma\delta$ T lymphocyták) milyen szerepük van a T1DM patogenezisében.

Célkitűzésünk között szerepelt, hogy

- vizsgáljuk, észlelhető-e eltérés a perifériás CD5+ B lymphocyták és a $\gamma\delta$ T lymphocyták arányában 1-es típusú diabetes mellitusos gyermekeknél, illetve azok magas Islet Cell Antibody (ICA) titerrel bíró, egészséges („prediabeteses”) elsőfokú rokonainál kontroll személyekkel összehasonlítva,

- kutatjuk, hogy van-e kvantitatív eltérés a keringő $\gamma\delta$ lymphocyták TCR lánchasználat és citokin-termelés alapján meghatározott egyes alcsoportjainak arányában újonnan diagnosztizált T1DM gyermekekben,
- tanulmányozzuk, hogy a $\gamma\delta$ T lymphocyták egyes alcsoportjainak megoszlása mutat-e összefüggést a betegek klinikai paramétereivel.

III. Beteganyag és vizsgálati módszerek

Ad II/1.1.) Retrospektív tanulmányban elemeztük a hyperglycaemia előfordulását a 2000. január 1. és 2001. december 31. közti időszakban klinikánkon született és ápolt 99 ELBW koraszülöttben, valamint 115 1000-1500 g közti születési súlyú koraszülöttben (gesztációs kor: $26,6\pm 2,3$ vs. $29,8\pm 2,0$ hét; születési súly: 803 ± 158 vs. 1260 ± 171 gramm [átlag \pm SD]). Rögzítettük a CRIB (Clinical Risk Factor for Babies) score-t, a komplikációk -IVH (intraventriculáris vérzés), szepszis- jelenlétét, parenterális glucose-bevitel ütemét, steroid, illetve xantin-készítmények alkalmazását. Vizsgáltuk az insulin kezelés szükségességét és a kezelés kapcsán jelentkező komplikációk előfordulását. A hyperglycaemia határának az ismételten 8,5 mmol/l feletti vércukorértéket tekintettük az „ágy melletti”, teljes vérből történő és/vagy laboratóriumi, szérumból történő glucose meghatározás során. Az ezen időszakban általános alkalmazott kezelési elvek alapján, az első élethéten, illetve ezt követően parenterális bevitel, vagy glucose háztartást befolyásoló terápia alkalmazása esetén legalább napi 2-3 vércukor-meghatározás történt, ha a beteg állapota, vagy a mért érték mást nem tett szükségessé. A teljes enterális táplálás felépítését követően stabil állapotú gyermeknél heti 1-2 alkalommal történt vércukor-meghatározás. A parenterális aminosav-készítmények adását a 2-3. naptól, az enterális táplálást a 2-4. életnapon indítottuk el. Insulin-kezelést ismételten 10 mmol/l feletti értéknél alkalmaztunk (0,01-0,1E/tskg/dózis sc. vagy iv. vagy 0,01-0,1E/tskg/óra). A statisztikai analízis során kétmintás t-próbát, χ^2 próbát és korreláció-analízist alkalmaztunk.

A fenti időszak mellett egy prospektív tanulmány során a 2006. január 1. és 2006. december 31. közti periódusban született 89 VLBW koraszülött (58 praematurus és 22 immaturus koraszülött) adatait elemezve ismételten meghatároztuk a hyperglycaemia gyakoriságát. Az első vizsgálati idősakkal összehasonlítva a hyperglycaemia definíciójában nem történt érdemi változás, a monitorizálási és kezelési elvekben azonban kisebb átalakulás volt észlelhető a 2006-os vizsgálati periódusra (lásd ad III/1.3. fejezet).

Ad II/1.2. A PTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán 2000. január 1. és 2002. december 31. között született, 1500 gramm alatti születési súlyú, perinatális időszakot túlélő

201 koraszülöttben (gesztációs kor: $29,1 \pm 2,6$ hét, születési súly: 1143 ± 241 gramm [átlag \pm SD]) retrospektív úton elemeztük a koraszülött retinopathia bármely stádiumának előfordulását, annak összefüggését a hyperglycaemiával, gesztációs korrall, születési súllyal, 1 és 5 perces Apgar-pontszámokkal, illetve az állapot súlyosságát jellemző CRIB pontszámokkal. Az első szemészeti vizsgálat 3-4 hetes korban történt indirekt binokuláris oftalmoszkópiával, melyet hetente ismételtünk. A ROP klasszifikációja és szükség esetén a lézeres szemészeti műtét a nemzetközi standardoknak megfelelően zajlott. χ^2 próbával és többszörös logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk a ROP összefüggését a hyperglycaemia előfordulásával, illetve a gesztációs korrall, a születési súllyal, az Apgar pontszámokkal és a CRIB pontszámmal. A VLBW koraszülöttek csoportján belül külön-külön is analizáltuk az 1000 gramm alatti születési súlyú és az 1000-1500 gramm születési súlyú alcsoportokat.

Ad II/1.3.) Prospektív tanulmány során a PTE ÁOK Szülészeti Klinika Újszülött Intenzív Osztályán 2006. január 1. és 2006. december 31. között ápolt, besorolási kritériumoknak (születési súly <1500 g, terhességi kor ≤ 32 hét) megfelelő 60 koraszülöttől (gesztációs kor: $28,4 \pm 2,3$ hét; [átlag \pm SD]) terhességi kor szerinti megosztásban, és 26 érett (gesztációs kor: $39,1 \pm 1,3$ hét), egészséges újszülöttől szülői felvilágosítást és hozzájárulást követően 1-1 ml vérminta vétele történt a 3.(± 3) életnapon (1. heti minta), majd ezt követően 3 hetes intervallumok szerint a 24.(± 3), illetve 45.(± 3) napokon (4. illetve 7. heti minták). Meghatároztuk a szérum protein- és albumin szinteket, illetve kolorimetriás módszerrel a fructosamine-szinteket. A demográfiai mutatók mellett a koraszülötteknél rögzítettük a hyper- illetve hypoglycaemiás epizódokkal terhelt napok számát, a CRIB score-t, az IVH, illetve ROP előfordulását, súlyosságát, a gépi lélegeztetés és az oxigén-kezelés, illetve a kórházi ápolás időtartamát. A hyperglycaemia kritériumának a $8,3$ mmol/l vércukorértéket, a hypoglycaemia határának a $2,6$ mmol/l értéket tekintettük. Az első élethéten, illetve ezt követően parenterális bevitel, vagy glucose háztartást befolyásoló terápia alkalmazása esetén legalább napi 3 vércukor-meghatározás történt. A teljes enterális táplálás felépítését követően stabil állapotú gyermeknél heti 1-2 alkalommal történt vércukor-meghatározás. A parenterális aminosav készítményeket az 1-2. nap vezettük be az enterális táplálást az 1-5. napon indítottuk el. A statisztikai analízisből kizártuk a két egy héten belül exitált ELBW koraszülött adatait. Végül huszonkettő immaturus, illetve 36 praematurus (gesztációs kor: $25,9 \pm 1,0$ vs. $29,9 \pm 1,3$ hét; [átlag \pm SD]) adatait elemeztük. Összehasonlítottuk az egyes csoportok születést követő a szérum albumin, protein és fructosamine szintjeit. Koraszülöttekben vizsgáltuk a fructosamine szintek posztnatális alakulását, továbbá a fructosamine szintek összefüggését a

hyperglycaemiával és a kapcsolatos komplikációkkal. A statisztikai analízis során Student t- illetve Wilcoxon exact-tesztet, χ^2 -próbát, lineáris korrelációt és logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél állapítottuk meg. Vizsgálataink a MTA Tudományos Kutatásetikai Bizottságának és a PTE ÁOK Regionális Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történtek.

Ad II/1.4.) Metofannal végzett anaesthesiaiát és dekapitációt követően patkány mellékhere bázis területéről zsírsejteket izoláltunk. A kísérlet során hasonló tömegű állatokat használtunk, tekintettel arra, hogy a zsírszövet nagysága egyenes összefüggést mutat a zsírsejtek méretével. Az adipocytákat ($3-5 \cdot 10^6$ sejt/ml) glucose, pyruvat és glutamin-mentes médiumban (alap-DMEM; Sigma) inkubáltuk, melyhez különböző koncentrációban glucoset (5, 15, 25 mmol/l) adtunk insulin adása mellett (100 ng/ml) vagy a nélkül. Emellett hasonló módon előkészített sejteket különböző energiaszolgáltató szubsztrátokkal (25 mmol/L D-glucose, galactose, fructose, alanin, pyruvat), vagy 2-deoxy-glucose (2-DG)-al (energia-neutralizáló anyag) inkubáltunk insulin jelenlétében, vagy a nélkül. Négy órás inkubációt követően RIA módszerrel (Patkány Leptin RIA, Linco) határoztuk meg a felülűszók leptin koncentrációját. Tanulmányoztuk, hogy a glucose+insulin indukálta leptin-elvásztás kalcium-függő folyamat-e. Izolált zsírsejteket egy órán keresztül 1 mmol/l pyruvat tartalmú, kalcium-mentes MEM médiumban inkubáltunk, majd 25 mmol/l glucose, 100 ng/ml insulin vagy/és 1 mmol/l kalcium sejtkultúrához adása után vizsgáltuk a leptin-szekréció változását az alapközegben tartott zsírsejtekhez viszonyítva. Az intracelluláris kalcium leptin-elvásztásra gyakorolt hatásának tanulmányozására az izolált zsírsejteket előbb intracelluláris kelátképzővel (BAPTA) kezeltünk, majd 25 mmol/l glucose és 100 mg/ml insulin médiumhoz adása után a leptin-elvásztás változását vizsgáltuk BAPTA-val nem előkezelt zsírsejtek leptin-termeléséhez viszonyítva. A kalcium-, illetve ATP függő kálium csatornák szerepének tanulmányozása során a glucose+insulin (25 mmol/l glucose, 100 mg/ml insulin) tartalmú médiumban inkubált zsírsejtek leptin-elvásztásához viszonyítva vizsgáltuk a zsírsejtek leptin-szekréciójának változását kalcium-, illetve kálium csatornák működését gátló anyagok (nimodipine, verapamil, kadmium (CdCl_2), nikkel (NiCl_2), illetve diazoxid) különböző koncentrációinak médiumhoz adása mellett. Az eredmények értékelése során a mért leptin-szintek abszolút értékeit, vagy az egyes tenyészetekben mért leptin-szinteknek a kontroll sejtenyészet leptin szintjéhez viszonyított arányszámát hasonlítottuk össze egy- és kétmintás t-próbákkal. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

Ad II/2.1.) Huszonkettő újonnan diagnosztizált, a PTE ÁOK Gyermekklinikán gondozásba kerülő T1DM gyermeknél (életkor: $12,8 \pm 0,9$ év [átlag \pm SD]) az insulin terápia megkezdése

előtt, továbbá 1-es típusú diabeteses betegek 13 magas ICA titerrel (Islet Cell Antibody titer >20 JDF U) bíró elsőfokú rokonánál ($16,6 \pm 2,24$ év) és 43 egészséges, diabeteses betegekhez korban és nemben illesztett kontroll személynél ($12,9 \pm 1,2$ év) előzetes felvilágosítást és hozzájárulást követően 7-8 ml heparinizált vér mintavétel történt. Grádiens centrifugálással perifériás mononukleáris sejteket izoláltunk. A CD5+ B és a $\gamma\delta$ T lymphocyták jelölésére ezüst intenzifikálással kiegészített kettős, illetve egyes indirekt immunperoxidase festést alkalmaztunk anti-CD22, anti-CD5 és anti-pan-TCR $\gamma\delta$ monoklonális ellenanyagok felhasználásával. Meghatároztuk a keringő CD5+ B, és $\gamma\delta$ T lymphocyták arányát a perifériás lymphocytákon belül. Az egyes betegcsoportok összehasonlítása kovariancia analízissel történt a vizsgált lymphocytá csoportok életkorral való összefüggésének figyelembe vételével. Vizsgálataink a PTE ÁOK Regionális Kutatásaitikai Bizottságának jóváhagyásával történtek.

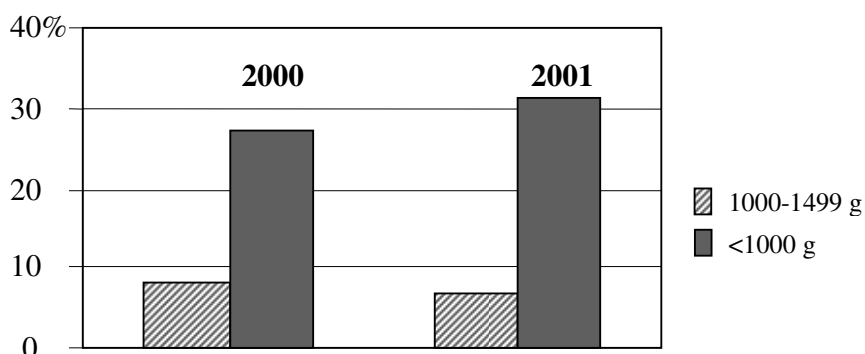
Ad II/2.2.) Előzetes szülői beleegyezést követően, a diagnózist követő $12,6 \pm 10,6$ héttel 22 T1DM gyermektől (életkor: $11,9 \pm 3$ év, [átlag \pm SD]), továbbá 24 korban és nemben illesztett kontroll személytől ($12,21 \pm 3,3$ év) 8 ml heparinizált vérminta került levételre. Rögzítettük a diabeteses gyerekeknél a vérvételkor a diabetes fennállásának tartamát, a HbA1c szinteket és a napi insulin-igényt. Frissen izolált perifériás mononukleáris sejteken direkt felszíni immunfluorescens jelölés történt monoklonális ellenanyagok felhasználásával (anti-TCR-V γ 9 (PE), anti-TCR-V δ 2 (FITC), anti-TCR-V δ 1 (FITC), anti-CD3 (PE). Az egyes lymphocytá alcsoportok citokin termelésének vizsgálatára stimulációt követően intracelluláris jelölés történt anti-IFN γ (APC) és anti-IL10 (APC) monoclonális antitestek alkalmazásával, melyet felszíni jelölés követett fenti ellenanyagokkal. A sejtek fenotípus szerinti elemzése Becton–Dickinson flow-cytometerrel történt, az adatok elemzését a Becton–Dickinson CellQuest software csomagjával végeztük. Meghatároztuk TCR-V γ 9+, TCR-V δ 2+, TCR-V δ 1+, TCR-V γ 9+/V δ 2+ és a CD3+ sejtek arányát, továbbá az IFN γ + és IFN γ - és IL10+ és IL10- sejtek arányát a teljes T lymphocytá populáción, illetve az egyes $\gamma\delta$ alcsoportokon belül. Az adatok elemzése SPSS 7.5 software csomag használatával történt. A statisztikai analízis során Mann-Whitney U tesztet, kétmintás t-próbát és Sperman féle non-parametrikus korrelációt alkalmaztunk. A statisztikai szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél állapítottuk meg. Vizsgálataink a PTE ÁOK Regionális Kutatásaitikai Bizottságának jóváhagyásával történtek.

IV. Vizsgálati eredmények

Ad II/1.1.) Az 1998. január 1. és 2001. december 31. közti 4 éves időszakban a hyperglycaemia előfordulási gyakoriságában több mint háromszoros emelkedést észleltünk az osztályunkon ápolt 1000 gramm születési súly alatti koraszülöttek körében. Fenti periódusban

az ELBW koraszülöttek aránya növekedett, ugyanakkor a túlélési esélyek javultak, mely a hyperglycaemia gyakoriságában is növekedést eredményezett

A 2000. január 1. és 2001. december 31. között az 1000 gramm alatti születési súlyú koraszülöttek 29,3%-ban észleltünk átmenetileg magas vércukorszintet. 1500 gramm születési súly alatt az incidencia 17,5% volt. A hyperglycaemia 4,1-szer gyakrabban fordult elő ELBW koraszülöttekben, mint az 1000-1499 gramm közti születési súlykategóriában (*1. ábra*).



1. ábra. Hyperglycaemia előfordulási gyakorisága súlykategóriánként (2000- 2001)

A 2006. január 1. és december 31. közti időszakban prospektív tanulmány keretében vizsgált 89 VLBW koraszülött 50%-ban detektáltunk hyperglycaemiát, mely a korábbi periódusban észlelnél magasabb érték. A gyakoriságban észlelt eltérés hátterét vizsgálva két különbséget észleltünk a vizsgálati periódusok között. Az első vizsgálati periódushoz hasonlítva a későbbi időszakban ápolat koraszülöttek némileg magasabb parenterális folyadék és glucose-bevitelben részesültek az első héten ($6,6 \pm 1,3$ mg/kg/ min (maximum $8,6 \pm 1,6$ mg/kg/min vs. $7,0 \pm 1,2$ mg/kg/ min (maximum $9,1 \pm 1,5$ mg/kg/min) [átlag \pm SD]), azonban az eltérés nem volt szignifikáns. Emellett a 2006-os, második vizsgálati periódus során a napi vércukor-meghatározások száma magasabb volt, mint az első tanulmány idején - ELBW koraszülöttekben az első héten 5 (3-9) vs. 2 (1-4)-, mely a vércukor-monitorizálás rendjének változásával volt összefüggésbe hozható. 2003-tól a véréz-analízisek révén egyidejűleg a vércukorszintek is meghatározásra kerültek.

ELBW koraszülöttjeinkben a hyperglycaemia főleg az első 2 élethétben alakult ki, majd gyakorisága jelentősen csökkent, azonban a hyperglycaemiás ELBW koraszülöttek harmadában 4 hetes kort követően is észlelhető volt átmenetileg vércukorszint emelkedés.

2000. január 1. és 2001. december 31. között született ELBW betegeinkben vizsgáltuk a hyperglycaemia potenciális kóroki tényezőit. Az első két hét során jelentkező hyperglycaemiás esetek nagyrészt parenterális glucose-bevitel mellett alakultak ki. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns eltérést a hyperglycaemiás és normoglycaemiás ELBW koraszülöttek között a glucose-bevitel ütemében az első élethétben (*1. táblázat*).

1. táblázat. A napi parenterális glucose-bevitel alakulása az első élethéten hyperglycaemiás és normoglycaemiás ELBW koraszülöttekben (mg/kg/min; átlag±SD)

	Hyperglycaemiás	normoglycaemiás	p
1. nap	5,9±1,0	5,4±0,8	ns
4. nap	8,5±1,1	8,0±0,7	ns
7. nap	10,4±1,2	10,3±1,4	ns

A két hetes kort követően jelentkező hyperglycaemiás esetek harmada nem állt kapcsolatban glucose infúzió adásával. A 2-4. élethét között a hyperglycaemiás betegek közel 60%-a, 4 hetes kor után 72%-a szteroid kezelésben részesült bronchopulmonális dysplasia (BPD) miatt. A szteroid kezelés szignifikáns összefüggést mutatott a hyperglycaemia kialakulásával ELBW koraszülöttekben (OR: 2,6, 95%-os CI: 1,05-8,1, p <0,05). Nem találtunk kapcsolatot a xantin-készítmények alkalmazása és hyperglycaemia jelenléte között (OR: 1,2; 95%-os CI: 0,48-9,71; ns).

A hyperglycaemiás betegek 92%-a legalább egy alkalommal insulin adását igényelte. Amíg az első és második héten hyperglycaemiát mutató betegek 91%, illetve 83%-a igényelte legalább egy alkalommal insulin adását, addig az ezt követő időszakban hyperglycaemiával észlelt koraszülöttek felénél a magas vércukor-értékek insulin adása nélkül is rendeződtek. Az insulin alkalmazása mellett nem alakult ki súlyos hypoglycaemia, azonban az insulinnal kezelt hyperglycaemiás koraszülöttek harmadában az insulin ismételt adása mellett hypokalaemia jelentkezett.

A hyperglycaemiás és normoglycaemiás ELBW betegcsoport között nem észleltünk szignifikáns eltérést az állapot súlyosságát jellemző CRIB pontszámában (7,0±2,9 vs. 5,9±2,1, ns; átlag±SD), emellett a születési súly visszanyeréséhez szükséges időtartam (17,6±5,8 vs. 16,1±4,0 nap; ns), és a maximális százalékos súlyvesztés sem különbözött (14,4±2,3 vs. 14,9±1,9 %; ns). A hyperglycaemiás ELBW koraszülöttekben gyakrabban fordult elő bakteriális szepszis (OR: 6,18; 95%-os CI: 1,2-34,6, p <0,01), továbbá, III-IV. stádiumú intraventrális vérzés (OR: 11,4; 95%-os CI: 2,8-52,4; p <0,01) a normoglycaemiás csoporttal összehasonlítva. Nem találtunk összefüggést a hyperglycaemia előfordulása és a perinatális mortalitás között (OR: 1,4; 95%-os CI: 0,54-3,66, ns).

Ad III/1.2.) A PTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán 2000. január 1. és 2002. december 31. közti időszakban született, perinatális időszakot túlélő, 201 VLBW koraszülött 35,3%-ban alakult ki koraszülött retinopathia valamely stádiuma. A hyperglycaemia

gyakorisága 19,4% volt. A retinopathia és a hyperglycaemia összefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy a ROP-os csoportban a hyperglycaemia gyakorisága magasabb volt a retinopathia-mentes koraszülöttekhez viszonyítva. Emellett a retinopathiás koraszülöttekben az általános állapot súlyosságát jellemző CRIB pontszám magasabb, a gesztációs kor, a születési súly, az 1 és 5 perces Apgar pontszámok szignifikánsan alacsonyabbak voltak (**2. táblázat**).

Többváltozós analízissel vizsgálva fenti tényezők független hatását, a vizsgált változók közül a terhességi kor és a hyperglycaemia mutattak más tényezőktől függetlenül összefüggést a ROP bármely stádiumának kifejlődésével a VLBW betegeinkben (**3. táblázat**).

2. táblázat Retinopathiás és ROP- mentes VLBW koraszülöttek klinikai adatai

(A gesztációs kor, születési súly és CRIB score esetében az átlag (SD), az Apgar pontszámok esetében a medián (min–max) értékeket tüntettük fel.

*OR: 9,84 (95% CI: 4,05-24,51))

Jellemzők	ROP	ROP-mentes	p érték
Esetszám	71	130	
Gesztációs kor (hét)	27,0 (1,9)	30,1 (2,2)	<0,001
Születési súly(g)	971 (227)	1237 (192)	<0,001
Apgar score 1 perc	7 (1-9)	8 (3-9)	<0,01
Apgar score 5 perc	9 (6-10)	9 (4-10)	<0,01
CRIB score	6,6 (3,9)	3,4 (2,1)	<0,001
Hyperglycaemia n (%)	30 (42,3%)	9 (6,9%)	<0,001*

3. táblázat Klinikai változók összefüggése a ROP bármely stádiumával VLBW koraszülöttekben (többszörös logisztikus regresszió)

Jellemzők	OR	95% CI	p érték
Gesztációs kor (hét)	0,59	0,46-0,76	<0,001
Születési súly (g)	1,00	0,99-1,01	NS
Apgar score 1 perc	1,10	0,7-1,75	NS
Apgar score 5 perc	0,97	0,51-1,84	NS
CRIB score	1,17	0,99-1,37	NS
Hyperglycaemia n (%)	3,15	1,12-8,84	<0,05

A VLBW koraszülöttek csoportján belül külön is elemeztük az 1000 gramm alatti, illetve az 1000-1500 gramm születési súlyú koraszülöttek adatait. A ROP-os koraszülötteknél mindkét súlykategóriában szignifikánsan alacsonyabb volt a gesztációs kor és a születési súly,

magasabb a CRIB pontszám és a hyperglycaemia gyakorisága a retinopathia-mentes betegekkel összehasonlítva (4. táblázat).

4. táblázat Retinopathiás és ROP-mentes VLBW koraszülöttek klinikai adatai súlykategóriánként (A gesztációs kor, születési súly és CRIB score esetében az átlag (SD), az Apgar pontszámoknál a medián (min-max) értékeket tüntettük fel; *OR: 3,45 (95% CI:1,44-8,74, **OR: 8,83 (95% CI: 1,99-43,95))

	<1000 g			1000 - 1500 g		
	ROP	ROP-mentes	p érték	ROP	ROP-mentes	p érték
Esetszám	43	20		28	110	
Gesztációs kor (hét)	25,9 (1,2)	28,2 (2,4)	<0,001	28,8 (1,5)	30,5 (2,4)	<0,001
Születési súly (g)	820 (124)	897 (88)	<0,05	1204 (130)	1299 (131)	<0,001
Apgar score 1 perc	7 (4-9)	8 (3-9)	<0,05	8 (1-9)	8 (4-9)	NS
Apgar score 5 perc	9 (6-10)	9 (4-10)	NS	9 (6-10)	9 (6-10)	NS
CRIB score	8,0 (4,0)	4,5 (1,9)	<0,001	4,5 (2,5)	3,2 (2,1)	<0,001
Hyperglycaemia n (%)	23 (53,5)	5 (25)	<0,05 *	7 (25)	4 (3,6)	<0,01**

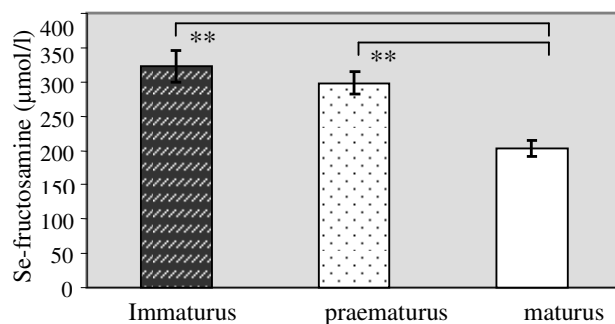
5. táblázat Klinikai változók összefüggése a ROP bármely stádiumával ELBW és 1000-1500 gramm születési súlyú koraszülöttekben (többszörös logisztikus regresszió)

	<1000 g			1000 - 1500 g		
	OR	95% CI	p érték	OR	95% CI	p érték
Gesztációs kor (hét)	0,38	0,20-0,72	<0,01	0,70	0,52-0,95	<0,05
Születési súly (g)	1,01	0,99-1,02	NS	1,00	0,99-1,00	NS
Apgar score 1 perc	1,11	0,40-3,09	NS	1,24	0,71-2,17	NS
Apgar score 5 perc	0,81	0,40-3,27	NS	0,83	0,33-2,07	NS
CRIB score	1,58	1,02-2,45	<0,05	1,01	0,88-1,38	NS
Hyperglycaemia	2,95	0,53-16,43	NS	4,48	1,04-19,43	<0,05

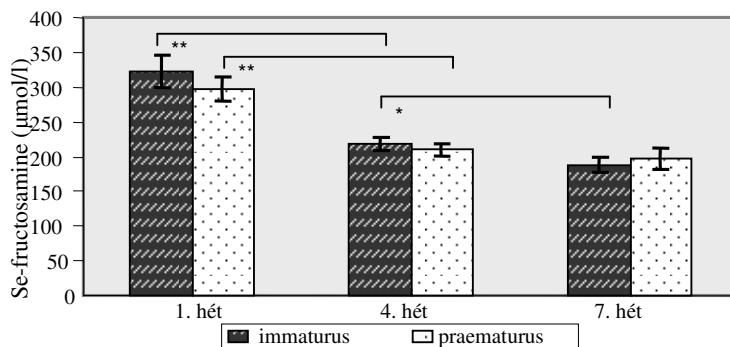
A hyperglycaemiás és a normoglycaemiás retinopathiás koraszülöttek CRIB pontszáma nem mutatott szignifikáns eltérést egyik súlykategóriában sem. Többváltozós analízissel az 1000 gramm alatti koraszülöttekben a gesztációs kor és a CRIB score, míg az 1000-1500 gramm

születési súlyú csoportban a gesztációs kor és a hyperglycaemia bizonyultak a retinopathia független rizikótényezőinek (5. táblázat).

Ad II/1.3. A 2006. január 1. és december 31. között prospektív tanulmány keretében vizsgáltuk 22 immaturus és 36 praematurus koraszülött, továbbá 26 érett újszülött (gestációs kor: $25,9 \pm 1,0$ vs. $29,9 \pm 1,3$ vs. $39,1 \pm 1,3$ hét, születési súly: 893 ± 157 vs. 1339 ± 313 vs. 3380 ± 392 g; $\text{átlag} \pm \text{SD}$) szérumszintjeit. Tekintettel arra, hogy a születést követően mért szérumszintek immaturus koraszülöttekben szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a praematurus és az érett csoportban (albumin: $25,9 \pm 1,3$ vs. $29,6 \pm 1,3$ és $32,5 \pm 1,3$ g/l; $p < 0,05$, $p < 0,001$; protein: $41,3 \pm 1,7$ vs. $50,5 \pm 2,3$ és $54,9 \pm 3,2$ g/l; $p < 0,05$, $p < 0,001$; $\text{átlag} \pm \text{SE}$) tanulmányunkban minden mért fructosamine értékeket a javasolt formula szerint korrigáltunk. Születést követően mind az immaturus, mind a praematurus koraszülöttek fructosamine szintje magasabb volt, mint az érett újszülöttekben. Ugyanakkor nem volt jelentős különbség a glycaemiás marker tekintetében a koraszülöttek két csoportja között (2. ábra). Négy hetes életkorra mindkét koraszülött csoportban jelentős posztnatális esés mutatkozott a fructosamine szintekben, emellett az immaturus koraszülöttekben további csökkenése is megfigyelhető volt a 7. hét végére (3. ábra).



2. ábra Serum-fructosamine szintek immaturus és praematurus koraszülöttekben, illetve érett újszülöttekben a 3.(±3) életnapon (átlag±SE); **: $p < 0,001$

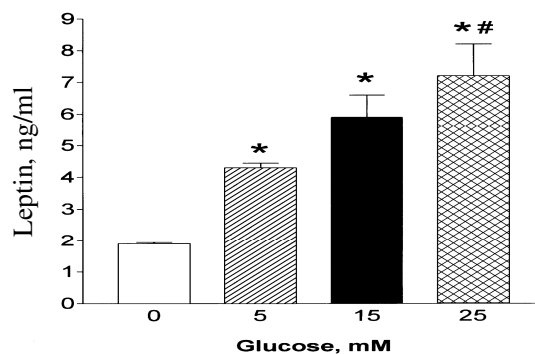


3. ábra A szérumszint fructosamine szintek posztnatális változása koraszülöttekben (átlag±SE); *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$

A 4. héten mért fructosamine szintek tekintetében nem mutatkozott eltérés azon koraszülöttek között, akiknél a megelőző 3 hét során hyperglycaemiás epizódot észleltünk, illetve akik ezen időszak alatt normoglycaemiásak voltak ($217,0 \pm 9,8$ vs. $209,4 \pm 8,4$ μM ; NS, átlag \pm SE). Hasonlóan a 7. heti fructosamine szint nem különbözött a megelőző 3 hét során hyperglycaemiás és normoglycaemiás koraszülöttekben ($188,4 \pm 10,6$ vs. $198,1 \pm 10,7$ μM ; NS, átlag \pm SE). A koraszülöttek 1. heti fructosamine szintje a következő 3 hét hypoglycaemiával terhelt napjainak számával ($r: 0,498$, $p < 0,02$), míg a 4. heti érték az ápolási napok számával ($r: 0,285$, $p < 0,05$) mutatott összefüggést. Sem a 4. sem a 7. heti szint nem mutatott összefüggést a megelőző 3 hetes periódusok hyperglycaemiás epizódjainak számával, CRIB score-al, ROP, illetve IVH előfordulásával, a gépi lélegeztetés és az oxygen-szupplementáció időtartamával

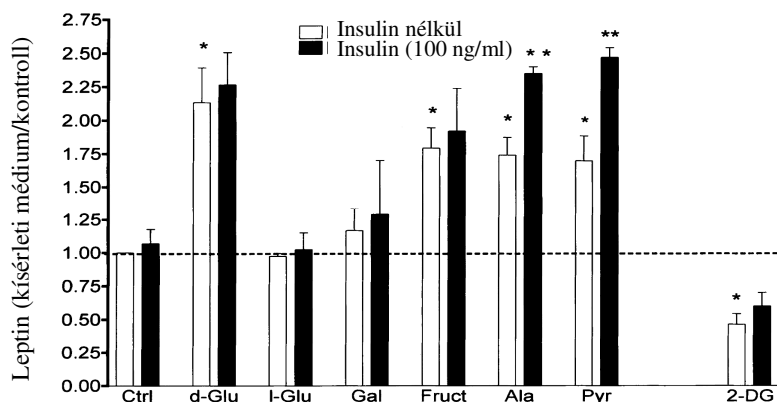
A hyperglycaemia előfordulási gyakorisága a 2. mintavétel (24 ± 3 nap) előtt 77% volt az immaturus, 33% a praematurus koraszülöttekben. A hyperglycaemiás napok száma a 2,3 (1-9) illetve 0,5 (1-4) nap volt ezen időszakig. A posztnatális kor előhaladtával a kórkép előfordulása csökkent; a 4. és 7. heti mintavétel közti időszakban 32% illetve 8,3 % volt a gyakoriság. Összefüggést észleltünk a hyperglycaemia előfordulása és a ROP valamely, vagy súlyos stádiumainak (\geq III.) kialakulása ($\chi^2 = 4,41$, d.f.=1, $p < 0,05$; $\chi^2 = 8,03$, d.f.=1, $p < 0,01$), továbbá az IVH jelenléte ($\chi^2 = 4,46$, d.f.=1, $p < 0,05$) között. A hyperglycaemiás epizóddal terhelt napok száma a CRIB score-al, a gépi lélegeztetés, az oxygen-supplementatio és a kórházi ápolás időtartamával egyenes, a gesztációs korrall és a születési súllyal fordított összefüggést mutatott, azonban többváltozós analízissel csak a gesztációs korrall való összefüggés maradt szignifikáns ($r = -0,495$; $p < 0,01$).

Ad II/1.4. Izolált patkány zsírsejteket glucose-mentes, illetve növekvő glucose koncentrációjú médiumban inkubáltuk. A glucose dózis-függő módon szignifikánsan emelte a felülúszó leptin koncentrációját (**4 ábra**). A 25 mmol/l glucose koncentráció ~3,5-szeres emelkedést eredményezett a leptin-elválasztásban.



4. ábra Izolált patkány zsírsejtek leptin-szekrécija glucose-mentes és növekvő glucose-koncentrációjú médiumban (átlag \pm SE; *: $p < 0,01$: glucose-mentes médiumban inkubált sejtek leptin-elválasztásához hasonlítva; #: $p < 0,05$: 5 mmol/l glucose tartalmú médiumban inkubált sejtek leptin-elválasztásához hasonlítva)

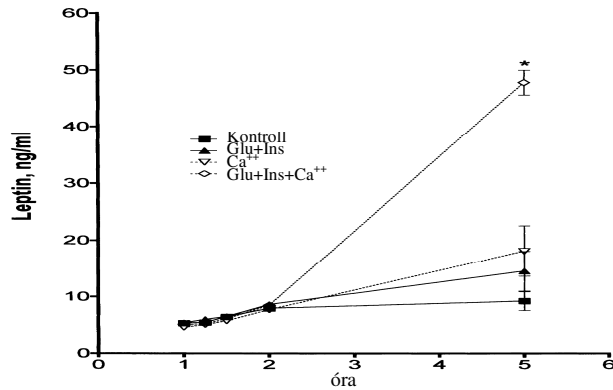
Más szubsztrátok hatását vizsgálva azt észleltük, hogy a sejt kultúrákhoz adott fructose, alanin és pyruvat szintén jelentősen emelték a zsírsejtek leptin- elválasztását a glucose-mentes közegben tartott sejtekkel összehasonlítva ($1,80 \pm 0,15$; $p < 0,05$, $1,74 \pm 0,13$; $p < 0,05$ és $1,70 \pm 0,18$; $p < 0,05$). A nem metabolizálódó szubsztrátok (L-glucose, galactose) nem eredményeztek változást a leptin koncentrációkban. Az intracelluláris energia depléciót okozó 2-DG alkalmazása esetén a zsírsejtek leptin-szekréciónja szignifikánsan csökkent (**5. ábra**).



5. ábra Alap-médiumhoz adott különböző szubsztrátok hatása izolált zsírsejtek leptin-szekréciónja (átlag \pm SE; * $p < 0,05$: L-glucose tartalmú médiumban inkubált sejtek leptin- elválasztásához viszonyítva; ** $p < 0,05$; insulin-mentes médiumban inkubált zsírsejtek leptin- elválasztásához viszonyítva az egyes szubsztrátok jelenlétében)

Az egyes sejt kultúrákhoz adott insulin (100 ng/ml) csak az alanin és a pyruvat tartalmú médiumok esetében eredményezett járulékos emelkedést a zsírsejtek leptin- elválasztásában (**5. ábra**). Bár e kísérlet során a D-glucose tartalmú médiumban insulin alkalmazása mellett nem észleltünk jelentős plussz növekedést a sejtek leptin-szekréciónjában, több kísérletünk eredményének együttes elemzése alapján glucoset (25 mmol/l) tartalmazó médiumban insulin alkalmazása (100 ng/ml) további szignifikáns ($1,26 \pm 0,08$ -szoros; ($p < 0,01$) emelkedést okoz a leptin-szekréciónban.

Vizsgáltuk a kalcium szerepét a glucose+insulin indukálta leptin- elválasztásban. Extracelluláris kalcium hiányában a glucose (25 mmol/l) + insulin (100 ng/ml) lassú, ~75%-os emelkedést okoz a leptin- elválasztásban kontroll (1 mmol/l pyruvat tartalmú, kalcium-mentes) médiumban tartott zsírsejtekhez viszonyítva. Kalcium (1 mmol/l) és glucose+insulin együttes alkalmazása közel ötszörösére emelte a zsírsejtek leptin- elválasztását. A kalcium önmagában (glucose- és insulin-mentes médiumban) kétszeres emelkedést eredményezett (**6. ábra**).



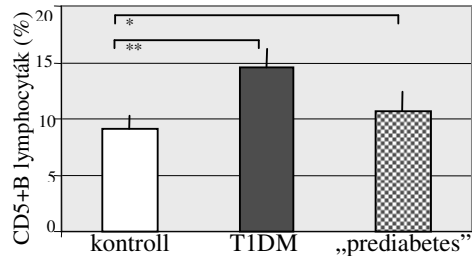
6 ábra. Izolált zsírsejtek leptin-szekrúciójának alakulása glucose+insulin tartalmú, továbbá glucose-mentes médiumban extracelluláris kalcium hiányában vagy jelenlétében (átlag±SE; * $p < 0,001$ kontroll médium leptin-koncentrációjához viszonyítva)

Intracelluláris kelátképzővel (BAPTA) történt előkezelés után glucose (25 mmol/l) + insulin (100 ng/ml) alkalmazása ~50%-os csökkenést okozott a leptin-elválasztásban a nem előkezelt sejtek leptin-szekrúciójához képest ($p < 0,001$). A BAPTA-val történt előkezelés nem volt hatással a glucose+insulin alkalmazásától független leptin-elválasztásra.

A kalciumcsatornák működését nem specifikusan gátló kadmium ($CdCl_2$) és nikkell ($NiCl_2$) szignifikánsan csökkentette a zsírsejtek glucose+insulin adással kapcsolatos leptin-szekrúcióját; 1 mmol/l kadmium, illetve 10 mmol/l nikkell alkalmazása mellett a leptin-szekrúcióban 50%-os csökkenés következett be. Specifikus kalcium-csatornablokkolók – nimodipine, verapamil- nem eredményeztek változást a leptin-elválasztásban. Ugyanakkor az ATP-függő kálium-csatornákat stimuláló diazoxid 1 mM koncentrációban szignifikáns, 23%-os csökkenést okozott a glucose+insulin stimulációval összefüggő leptin-szekrúcióban.

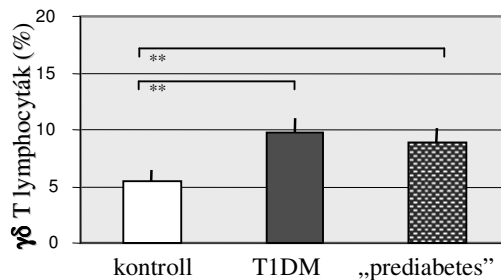
Ad II/2.1.) A CD5+ B lymphocyták aránya negatív korrelációt mutatott az életkorral mind az újonnan diagnosztizált T1DM gyermekeknél az insulin-kezelés megkezdése előtt és a T1DM betegek magas ICA titerű első fokú rokonainál („prediabetes” egyének) ($r: -0,30$; $p < 0,01$), mind pedig kontroll személyekben ($r: -0,65$; $p < 0,001$). A keringő $\gamma\delta$ T lymphocyták aránya hasonló negatív összefüggést mutatott az életkorral minden vizsgált csoportban (T1DM és „prediabetes”: $r: -0,35$; $p < 0,01$ vs. kontroll: $r: -0,72$; $p < 0,001$). A diabeteses és „prediabeteses” csoportban a CD5+ B és $\gamma\delta$ T lymphocyták aránya kisebb ütemben csökkent, mint a kontroll személyekben.

A diabeteses és „prediabeteses” csoport között nem észleltünk szignifikáns eltérést a keringő CD5+ B lymphocyták arányában. Ugyanakkor arányuk szignifikánsan magasabb volt mind újonnan diagnosztizált T1DM gyermekekben, mind „prediabeteses” egyénekben a kontroll csoporthoz viszonyítva (7. ábra).



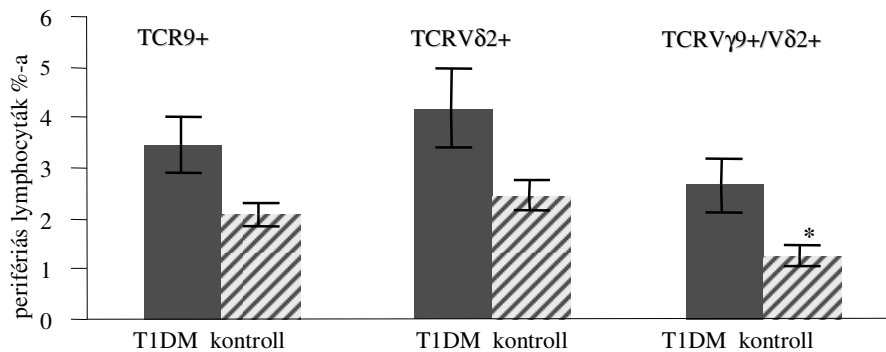
7. ábra CD5+ B lymphocyták aránya újonnan diagnosztizált T1DM gyermekekben, „prediabeteses” és kontroll személyekben (átlag±SE; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$)

A $\gamma\delta$ T lymphocyták aránya a CD5+ B lymphocytákéhoz hasonló eltérést mutatott a diabeteses és „prediabetes” egyénekben, emellett nem igazolódott különbség a két csoport között (8. ábra).



8. ábra Keringő $\gamma\delta$ T lymphocyták aránya újonnan diagnosztizált T1DM gyermekekben, „prediabeteses” és kontroll személyekben (átlag±SE; **: $p < 0,001$)

Ad II/2.2.) Flow-cytometriás módszerrel elemezve a keringő $\gamma\delta$ lymphocyták egyes eltérő TCR-láncokat használó alcsoportjait T1DM betegekben kizárólag a TCR V γ 9+/V δ 2+ (kettős pozitív) lymphocyták arányában észleltünk szignifikáns emelkedést a kontroll csoporthoz viszonyítva. A TCR/V δ 1+ sejtek tekintetében nem mutatkozott eltérés, emellett a TCR/V γ 9+ és TCR/V δ 2+ (szimpla pozitív) sejtek arányának változását sem találtuk szignifikánsnak (9. ábra).

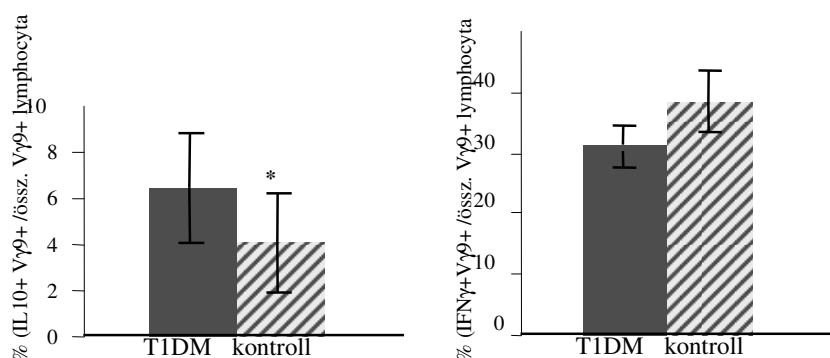


9. ábra Perifériás lymphocyták T sejt receptor (TCR) lánchasználata T1DM betegekben és kontroll személyekben (átlag±SE; * $p < 0,05$)

Betegeinkben lineáris korrelációt észleltünk TCR/V γ 9+/V δ 2+ lymphocyták és a TCR/V γ 9+ (r:0,971; p <0,001), illetve a TCR/V δ 2+ sejtek aránya között (r: 0,975; p <0,001). A V γ 9+ TCR láncok 77%-ban a V δ 2+, míg a V δ 2+ láncok 64%-ban V γ 9+ láncokkal kombinálódtak.

A TCR/V γ 9+/V δ 2+ lymphocyták aránya alapján két csoport volt elkülöníthető a diabeteseseken belül: A betegek kisebb alcsoportjánál a TCR/V γ 9+/V δ 2+ lymphocyták aránya magasabb volt, mint a kontroll személyekben észlelt értékek felső 95%-os konfidencia határa (T1DM-„magas” alcsoport), míg a betegek többségében a TCR/V γ 9+/V δ 2+ arány nem növekedett jelentősen (T1DM-„normál” alcsoport).

A keringő T (CD3+) lymphocyták aránya nem különbözött a diabeteses és a kontroll csoportban (70,44 \pm 1,76 vs. 71,77 \pm 1,53; NS; átlag \pm SE). Emellett nem észleltünk eltérést az IFN γ + és IL10+ sejtek arányában sem a teljes T sejt populáción belül (17,87 \pm 2,25 vs. 16,50 \pm 1,65; NS, és 2,37 \pm 0,42 vs. 1,57 \pm 0,30; NS). Ugyanakkor a T1DM betegekben a γ δ lymphocyták egyes eltérő TCR-láncokat használó alcsoportjainak citokin-termelése változást mutatott. A betegek csoportjában a TCR/V γ 9+ lymphocytá alcsoporton belül szignifikánsan növekedett az IL10 termelő sejtek aránya az IFN γ + sejtek csökkenő aránya mellett (10. ábra).



10. ábra IL10+ and IFN γ + V γ 9+ lymphocyták aránya T1DM betegekben és kontrollokban (átlag \pm SE); * p <0,05)

A teljes lymphocytá populáción belül a betegekben emelkedés mutatkozott az IL10+/TCRV γ 9+ és az IFN γ -/TCRV γ 9+ lymphocyták arányában (0,16 \pm 0,03 vs. 0,09 \pm 0,03%; p <0,01; 2,38 \pm 0,38 vs. 1,24 \pm 0,15%; p <0,05, átlag \pm SE).

A T1DM betegek csoportján belül több eltérést észleltünk a CD3+ T lymphocyták és a γ δ T lymphocytá alcsoportok citokin-termelése tekintetében. A diabeteses betegekben a TCR/V γ 9+/V δ 2+ lymphocyták magas aránya együtt járt a T lymphocyták nagyobb hányadának IFN γ termelésével; emellett e betegekben (T1DM-„magas” alcsoport) az IL10 és IFN γ termelő TCR/V γ 9+ lymphocyták százalékos aránya nem mutatott jelentős eltérést a

kontrollokhoz viszonyítva. Ugyanakkor a T1DM betegek másik alcsoportjában (T1DM-„normál” alcsoport) a T lymphocyták IFN γ termelése nem tért el a kontroll csoportban észlelethez, azonban a TCR/V γ 9+ lymphocyták nagyobb arányban termeltek IL10-t és valamelyest csökkent az IFN γ termelő sejtek aránya is. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a γ δ lymphocytá alcsoportok arányának változása és a diabeteses betegek klinikai paraméterei – diabetes időtartama, HgbA1c, napi insulin igény- között, bár a T1DM betegek „magas” TCRV γ 9+ aránnyal bíró alcsoportjában a napi átlagos insulin-igény valamelyest alacsonyabb volt (**6. táblázat**).

6. táblázat CD3+és V γ 9+ lymphocyták citokin-termelése a T1DM betegek „normál”, illetve „magas” V γ 9+/V δ 2+ lymphocytá aránnyal bíró csoportjaiban és kontroll személyekben. A betegek csoportjában feltüntetettük a napi insulin igény.(*átlag \pm SE*)

	1. T1DM-magas γ 9 δ 2%	2. T1DM-normál γ 9 δ 2%	3. kontroll	P 1 vs. 2	P 1 vs. 3	P 2 vs. 3
	(n=6)	(n=16)	(n=24)			
IFNγ+CD3+ CD3+ly %-a	27,30 \pm 4,11	13,43 \pm 1,81	16,50 \pm 1,65	< 0,05	< 0,05	ns
IL10+Vγ9+ V γ 9+ly %-a	4,50 \pm 1,07	7,32 \pm 3,38	4,09 \pm 2,18	ns	ns	< 0,05
IFNγ+Vγ9+ V γ 9+ly %-a	35,80 \pm 4,93	29,26 \pm 4,11	38,35 \pm 5,05	ns	ns	ns 0,06
napi insulin (IU/tskg/nap)	0,87 \pm 0,08	1,02 \pm 0,04	-	ns 0,06	-	-

VI. Összefoglalás, az eredmények gyakorlati hasznosítása

A cukorháztartás perinatális vonatkozásai és koraszülöttekben előforduló

hyperglycaemia vizsgálata

- Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az *igen kis súlyú koraszülöttek közel felében átmenetileg hyperglycaemia alakul ki a születést követő ápolási időszakban. Az előfordulás fordított összefüggést mutat a születési súllyal és a gesztációs korról, immaturus koraszülöttekben az incidencia elérheti a 70%-ot is. A gyakoriság a posztnatális kor növekedésével csökken.*

A vércukor meghatározások száma jelentősen befolyásolja a tünetmentes hyperglycaemia észlelését. Immaturus koraszülöttekben az első élethét során, vagy a glucose-háztartást befolyásoló kezelés alatt napi 3-5 meghatározás szükséges, hogy reális képet kapjunk az előfordulási rátáról.

- *Az első két hét során észlelt hyperglycaemiás epizódok csaknem kizárólag egyidejű parenterális glucose-bevitel mellett jelentkeztek, ugyanakkor betegeinkben a parenterális glucose-bevitel üteme nem volt magasabb a hyperglycaemiás koraszülöttekben. Ez arra utal, hogy a vércukorszint emelkedés kialakulásában a reguláció zavara a meghatározó.*

Összefüggést észleltünk a hyperglycaemia és az egyidejű szteroid-kezelés között, mely felhívja a figyelmet a rendszeres vércukor ellenőrzés fontosságára szteroiddal kezelt koraszülötteknél. A fentiek mellett szignifikáns kapcsolatot találtunk a bakteriális szepszis előfordulása és a hyperglycaemia jelenléte között.

- *ELBW koraszülöttjeinkben a hyperglycaemia előfordulása nem befolyásolta a mortalitási rátát, nem mutatott összefüggést az általános állapot súlyosságát jellemző CRIB pontszámmal sem. Ugyanakkor a hyperglycaemiás betegekben szignifikánsan gyakrabban fordult elő intrakraniális vérzés.*

- *Az 1500 gramm alatti születési súlyú koraszülöttekben a hyperglycaemia jelenléte az alacsony gesztációs kor mellett független rizikótényezőnek bizonyult a koraszülött retinopathia bármely stádiumának kialakulására. Súlykategóriánként eltérést észleltünk a retinopathia rizikófaktoraiban: az 1000-1499 gramm közti súlykategóriában a hyperglycaemia jelenléte az alacsonyabb gesztációs kor mellett együtt járt a ROP kialakulásának magasabb kockázatával. Ugyanakkor az 1000 gramm alatti születési súlyú koraszülöttekben a magasabb CRIB score és az alacsonyabb gesztációs kor bizonyultak a ROP független rizikófaktoraiknak. A fenti eredmények alapján a hyperglycaemiás koraszülöttek fokozott szemészeti utánkötése indokolt. Eredményeinkkel felhívjuk a*

figyelmet a ROP egy új potenciális rizikófaktorára és a háttérben álló folyamatok vizsgálatának szükségességére.

- Újszülöttekben és koraszülöttekben elsőként vizsgáltuk egy glycaemiás marker, a szérumban fructosamine alkalmazhatóságát a koraszülöttek cukorháztartásának retrospektív vizsgálatára. Közvetlenül *születést követően* immaturus és praematurus koraszülöttekben magasabb fructosamine szinteket észleltünk, mint érett újszülöttekben, mely alacsonyabb gestációs kor mellett relatíve magasabb vércukorszintekre utal *in utero*. A születést követő 7 hét során a koraszülöttek fructosamine szintjeiben szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető, mely csökkenő vércukorszinteket jelez.

- Nem észleltünk eltérést a hyperglycaemiás és normoglycaemiás VLBW koraszülöttek releváns fructosamine szintjei között, emellett a fructosamine szintek nem mutattak összefüggést a hyperglycaemiás napok számával, valamint a hyperglycaemiával kapcsolatos komplikációk jelenlétével. *A fructosamine szintekben észlelt perinatális eltérések új információval szolgáltak a foetus, illetve a koraszülöttek és újszülöttek cukorháztartásával kapcsolatosan, azonban a fructosamine nem bizonyult alkalmas markernek a hyperglycaemiával kapcsolatos utóképek prognosztizálására.*

- *In vitro* vizsgálati eredményekkel támasztottuk alá, hogy a glucose fontos szerepet játszik a leptin-szekréció szabályozásában. Izolált patkány zsírsejteken igazoltuk, hogy *a glucose, dózis-függő módon emeli a sejtek leptin-eltávolítását*, és hogy *a glucose indukálta leptin-szekréció insulin adásával tovább fokozható*. Eredményeink alátámasztják azon hipotézisünket, mely szerint *a glucose és insulin stimulációt követő leptin-eltávolítás az ATP-függő kálium csatornák záródásával, majd a megnyíló feszültségfüggő kalcium-csatornákon keresztül a kalcium sejtbe áramlásával, és az intracelluláris kalcium koncentráció növekedésével függ össze.*

Keringő $\gamma\delta$ T és CD5+ B lymphocyták vizsgálata gyermekkori T1DM-ban

- *A T1DM gyermekeknél emelkedést észleltünk a keringő CD5+ B és $\gamma\delta$ T lymphocyták arányában* közvetlenül a diagnózist követően egészséges kontroll személyekkel összehasonlítva. A $\gamma\delta$ T lymphocyták alcsoportok kvantitatív eltérése a diagnózist követően hetekkel is észlelhető volt. A vizsgált lymphocyták populációk arányában észlelt változás nem függött össze az insulin-kezeléssel.

- *A diabeteses betegekhez hasonlóan mind a CD5+ B, mind a $\gamma\delta$ T lymphocyták aránya szignifikáns emelkedést mutatott a diabeteses betegek diabetes kifejlődésére magas*

kockázattal bíró első fokú rokonainál is. A fentiek együttesen arra utalnak, hogy a sejtek arányában észlelt változások a diabetest kísérő autoimmun folyamattal függenek össze.

- A $\gamma\delta$ sejtek T sejt receptorjainak lánchasználatát, illetve a sejtek citokin-termelését vizsgálva azt találtuk, hogy a *diabeteses gyermekekben emelkedett a $V\gamma9+/V\delta2+$ T lymphocyták aránya, illetve a Th2 típusú citokint (IL10-et) termelő $V\gamma9+$ lymphocyták aránya az összes lymphocytán belül kontrollokkal összehasonlítva.*

- Ugyanakkor a *T1DM betegek csoportján belül megosztottságot észleltünk a $\gamma\delta$ T lymphocytá alcsoportok arányainak változása tekintetében, mely együtt járt a T lymphocyták citokin-termelésének eltéréseivel. A betegeink kisebb hányadánál jelentős mértékben emelkedett a $V\gamma9+/V\delta2+$ lymphocyták aránya, melyet a T lymphocyták citokin-termelésének Th1 irányú eltolódása kísért, viszont a $V\gamma9+$ sejtek citokin-termelése nem mutatott jelentős eltérést a kontroll személyekkel összehasonlítva. A diabeteses gyerekek többségében ugyanakkor a $V\gamma9+/V\delta2+$ lymphocytá populáció aránya nem növekedett szignifikánsan, de az IL10 termelő $V\gamma9+$ sejtek relatíve aránya emelkedett a T lymphocyták citokin-termelésének jelentős változása nélkül.*

- Nem találtunk szignifikáns összefüggést a vizsgált foetális lymphocyták aránya és a betegséggel összefüggő klinikai paraméterek között.

VII. Tudományos közlemények, előadások és poszterek listája

VIII/1. Az értekezés témakörében megjelent tudományos közlemények

- [1] Gyarmati J, Szekeres-Bartho J, Fischer B, Soltesz Gy: Fetal type lymphocytes in insulin dependent diabetes mellitus. *Autoimmunity*. 1999; 30:63-69. **IF: 1.232**
- [2] Levy JR, Gyarmati J, Lesko JM, Adler RA, Stevens W: Dual regulation of leptin secretion: intracellular energy and calcium dependence of regulated pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 278:E892-E901. **IF: 3.183**
- [3] Gyarmati J, Ertl T, Funke S, Sárkány I, Vida G, Szabó I: Hyperglycaemia 1000 gramm alatti koraszülöttekben. *Gyermekgyógy.* 2004; 55:633-639.
- [4] Ertl T, Gyarmati J, Gaál V: Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. (abstract) *Paediatric and Perinatal Drug Therapy*. 2004; 6: 70.
- [5] Ertl T, Gyarmati J, Gaál V, Szabó I: Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Biol Neonate*. 2005; 89:56-59. **IF: 1.681**
- [6] Ertl T, Gyarmati J, Gaál V, Szabó I, Sárkány I, Funke S, Vida G: A hyperglycaemia szerepe koraszülöttek retinopathiájának kialakulásában. *Gyermekgyógy.* 2005; 56:599-604.
- [7] Gyarmati J, Tőkés-Füzesi M, Kovács LG, Gaál V, Vida G, Ertl T: Fructosamine levels and hyperglycemia in preterm neonates. (abstract) *Acta Paediatrica*. 2007; 96(S456):24. **IF: 1.411**
- [8] Vida G, Sárkány I, Funke S, Gyarmati J, Storcz J, Gaál V, Vincze O, Ertl T: Extrém alacsony gesztációs korú koraszülöttek életkilátásai. *Orv. Hetilap*. 2007; 148:2279-2284.
- [9] Gyarmati J, Tőkés-Füzesi M, Kovács LG, Gaál V, Vida G, Ertl T: Fructosamine levels and hyperglycemia in preterm neonates. *Neonatology*, 2009; 95:267-270. **IF: 1.904**
- [10] Gyarmati J, Szekeres-Bartho J, Soltesz Gy: *Alteration of the $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets' cytokine profile in type 1 diabetic children. (Diabetes Res Clin Pract; submitted for publication)*

VIII/2. Az értekezés témakörében elhangzott előadások, poszterek

- Gyarmati J, Kozári A, Adamovich K, Soltesz Gy: Transient neonatal diabetes mellitus. East-European Postgraduate Course on Diabetes Mellitus, 1995, Sofia, Bulgária
- Gyarmati J, Soltesz Gy, Kozári A: Transiens neonatalis diabetes mellitus. MDT Tudományos Ülése, 1996, Keszthely
- Gyarmati J, Szekeres J, Soltesz Gy: CD5+ B lymphocyták insulin dependens diabetes mellitusban. MGYT és MDT Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, 1996, Salgótarján
- Gyarmati J, Szekeres J, Soltesz Gy: Természetes autoimmunitás insulin dependens diabetes mellitusban. MIT Tudományos Ülése, 1996, Kecskemét
- Gyarmati J, Szekeres J, Soltesz Gy: $\gamma\delta$ T és CD5+ B lymphocyták insulin dependens diabetes mellitusban. PTE ÁOK Orvostudományi Szakosztály Tudományos Ülése, 1996, Pécs
- Gyarmati J, Ertl T, Funke S, Sárkány I, Szabó I, Vida G: Hyperglycaemia előfordulása 1000 gramm alatti koraszülöttekben. Magyar Perinatológus Társaság I. kongresszusa, 2002. szeptember 27-28, Lakitelek

- Gyarmati J, Ertl T, Flach E, Funke S, Sárkány I, Till Á, Vida G, Szabó I: Exrémén alacsony súlyú koraszülöttek túlélési esélyei, életkilátásai. Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, 2003. szeptember 26-27, Zalakaros
- Ertl T, Gyarmati J, Gaál V: Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. 9th Biennial Congress of the European Society for Developmental Perinatal & Paediatric Society, 2004 június 16-20, Marburg, Germany
- Gyarmati J, Ertl T, Gaál V, Szabó I: A hyperglycaemia szerepe az igen kis súlyú koraszülöttek retinopathiájának kialakulásában. Magyar Perinatológiai Társaság IV. Kongresszusa, 2005. szeptember 8-10, Gyula
- Vida G, Funke S, Sárkány I, Gyarmati J, Ertl T, Szabó I: Extrém alacsony gestatiós korú koraszülöttek életkilátásai. Magyar Perinatológiai Társaság IV. Kongresszusa, 2005. szeptember 8-10, Gyula
- Ertl T, Gyarmati J: A hyperglycaemia perinatológiai jelentősége. Szülészeti és Perinatológiai Aneszteziológiai Társaság XIII. Nemzeti Kongresszusa, 2007. március 30, Debrecen
- Gyarmati J, Tókes-Füzesi M, Kovács LG, Gaál V, Vida G, Ertl T: Fructosamine levels and hyperglycemia in preterm neonates. 48th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research, 2007. október 6-8, Prague, Czech Republic
- Gyarmati J, Tókes-Füzesi M, Kovács L.G, Ert T: Fructosamine szintek újszülöttekben és koraszülöttekben: van-e létjogosultsága a neonatológiában? Magyar Perinatológiai Társaság VII. Kongresszusa. Az UENPS 1. Kongresszusának Magyarországi Post-Konferenciája, 2008. november 20-22, Budapest

VIII/3. Nem az értekezés témakörében megjelent tudományos közlemények

- Gyarmati J, Ertl T, Szabo I: Born small for gestational age: a new indication for the growth hormone therapy? Paediatric and Perinatal Drug Therapy. 2004; 6:70.
- Kellermayer R, Gyarmati J, Czakó M, Tészás A, Masszi Gy, Ertl T, Kosztolányi Gy: Mos. 46, XX r(18).ish r(18)(18ptel-,18qtel-)/46,XX,ish del(18)(18ptel-): An example for successive ring chromosome formation. Am J Med Genet A. 2005; 139:234-235. **IF: 1.913**
- Vida G, Sulyok E, Ertl T, Gyarmati J, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM: Plasma levels of asymmetric dimethylarginine in term infants. Acta Paediatrica. 2007; 96(S456):198. **IF: 1.411**
- Sáfrány B, Faust Zs, Hriczkó J, Veszprémi B, Gyarmati J, Nemes I: The importance of early diagnosis and treatment in neonatal alloimmune thrombocytopaenia. Hematológia Transzfuziológia. 2007; 40:225-229.
- Flach E, Kellermayer R, Ert T, Vida G, Sárkány I, Funke S, Gyarmati J: Cutis marmorata telangiectatica congenita egy eset kapcsán. Orv. Hetil. 2007; 148:1717-1720.
- Flach E, Funke S, Sarkany I, Vida G, Gyarmati J, Ertl T: Effect of late preterm birth on neonatal morbidity risk. Earl Hum Develop. 2008; 84:S36. **IF: 1.850**

VIII/4. Nem az értekezés témakörében elhangzott előadások, poszterek

- Flach E, Ertl T, Gyarmati J, Vida G, Funke S, Sárkány I, Till Á, Szabó I: Újszülöttkori ultrahangvizsgálat jelentősége. Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, 2003. szeptember 26-27, Zalakaros

- Gyarmati J, Szilágyi A, Szász M: Sikeres terhességi kimenetel súlyos Rh izoimmunizáció során. PTE-OEC-ÁOK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztály Tudományos Ülése, 2004. február, Pécs
- Gyarmati J, Ertl T, Szabó I: Born small for gestational age: a new indication for the growth hormone therapy? 9th Biennial Congress of the European Society for Developmental Perinatal & Paediatric Society, 2004 június 16-20, Marburg, Germany
- Flach E, Ertl T, Sárkány I, Funke S, Vida G, Gyarmati J, Till Á, Szabó I: Extrémén kissúlyú koraszülöttek postnatalis növekedése az első kilenc héten. Magyar Perinatológus Társaság III. Kongresszusa, 2004. Nyíregyháza
- Gyarmati J, Kellermayer R, Masszi Gy, Ertl T: Veleszületett szívfeloldási rendellenességek differenciáldiagnosztikai nehézségei egy ritka congenitális vitiummal született újszülött esetének ismertetése kapcsán. PTE-OEC-ÁOK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztály Tudományos Ülése, 2005. április, Pécs
- Gyarmati J, Kellermayer R, Flach E, Funke S, Sárkány I, , Vida G, Ertl T: Ritka congenitális vitiummal született újszülött esete kapcsán felmerülő differenciáldiagnosztikai problémák. Magyar Perinatológiai Társaság V. Kongresszusa, 2006. szeptember 8-9, Szolnok
- Funke S, Kellermayer R, Flach E, Sárkány I, Vida G, Gyarmati J, Ertl T: Congenitális chylothorax kezelésére alkalmazott somatostatin analógal szerzett tapasztalataink. Magyar Perinatológiai Társaság V. Kongresszusa, 2006. szeptember 8-9, Szolnok
- Lipóczki T, Váczi T, Vida G, Gyarmati J, Ertl T: Az 1500 gramm alatti koraszülöttek súlyfejlődése. Magyar Perinatológiai Társaság V. Kongresszusa, 2006. szeptember 8-9, Szolnok
- Flach E, Funke S, Sárkány I, Vida G, Gyarmati J, Ertl T: Terminusközeli koraszülöttek morbiditási mutatói. Magyar Perinatológiai Társaság VI. Országos Kongresszusa, 2007. szeptember 27-29, Győr
- Vida G, Sulyok E, Ertl T, Gyarmati J, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM: Plasma levels of asymmetric dimethylarginine in term infants. 48th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research, 2007. október 6-8, Prague, Czech Republic
- Ertl T, Gyarmati J, Vida G, Bódis J: Igen kis súlyú koraszülöttek mortalitása régióinkban. Magyar Nőorvos Társaság Dél-Dúnántúli Szekciójának Tudományos Ülése, 2007. október 19, Szombathely
- Sárkány I, Ertl T, Vízer M, Vida G, Funke S, Gyarmati J, Flach E, Arany A: Effectiveness of direct fetal betamethasone treatment in obstetric subgroups. 11th Congress of the European Society for Developmental Perinatal and Paediatric Pharmacology, 2008. június 4-7, Rotterdam, Netherlands
- Flach E, Funke S, Sarkany I, Vida G, Gyarmati J, Ertl T: Effect of late preterm birth on neonatal morbidity risk. 1st International Congress of UENPS, 2008. november 17-19, Rome, Italy
- Vida G, Ert T, Sulyok E, Gyarmati J, Sárkány I, Martens-Lobenhoffer J: Alacsony súlyú koraszülöttek ADMA szintjének nyomonkövetése. Magyar Perinatológiai Társaság VII. Kongresszusa. Az UENPS 1. Kongresszusának Magyarországi Post-Konferenciája, 2008. november 20-22, Budapest

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Ertl Tibor Professor Úrnak azt a készséges segítséget, és szakmai irányítást, melyet értekezésem elkészítése során nyújtott. Messzemenő támogatásának és biztatásának meghatározó szerepe volt abban, hogy e munka elkészült.

Köszönöm Bódis József Professor Úrnak a lehetőséget, mellyel biztosította, hogy munkámat zavartalanul végezhessem és csatlakozhassam doktori iskolájához.

Köszönöm Soltész Gyula Professor Úrnak, hogy elindított a klinikai kutatások útján, nagyfokú szakmai igényességéből sokat tanultam.

Hálával tartozom Szekeres Júlia Professor Asszonynak, aki által megtanultam tisztelni a laboratóriumi kutatómunkát, és aki mindig nagy önzetlenséggel segédkezett problémáim megoldásában.

Köszönöm James Levy Professor Úrnak, hogy külföldi laboratóriumi munkám során segítségemre volt, és nagy türelemmel irányította azt.

Ezúton szeretném megköszönni kollégáimnak és a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika minden dolgozójának, hogy munkámban támogattak. Külön szeretnék köszönetet mondani az Újszülött Osztály dolgozóinak segítségükért.

Köszönettel tartozom az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet Víruslabor dolgozóinak, hogy a laboratóriumi munkámat segítették, és hogy a laboratóriumban eltöltött idő során értékes emberi kapcsolatokkal lettem gazdagabb.

Köszönöm volt munkahelyem a PTE ÁOK Gyermekklinika orvosainak és szakdolgozóinak is a munkámhoz nyújtott segítséget.

Szeretném megköszönni barátaimnak folyamatos figyelmüket és biztatásukat.

Hálával tartozom szüleimnek, azért hogy biztos alapokat nyújtottak és önzetlen szeretettel támogatják egész életem. Külön köszönöm nővérem áldozatkész segítségét és szeretetét.

Ajánlom ezen értekezést gyermekeimnek, Sárának és Bencének, akik türelmüket és végtelen szeretetüket adták e munkához.