

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet

Szérum Chromogranin-A szintek időbeli változása 1-es típusú diabetes mellitusban

Készítette: Herold Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Somogyi Anikó

Egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar

II. sz. Belgyógyászati Klinika

Társtémavezető: Dr. Patócs Attila, PhD

Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet

MTA-SE „Lendület” Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Kövér Szilvia, PhD

Tudományos munkatárs

SZIE ÁOTK, Biológiai Intézet

Ökológiai tanszék

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés	5
I. Elméleti összefoglaló	7
1. Az 1-es típusú diabetes mellitus.....	7
1.1 A diabetes mellitus meghatározása és felosztása	7
1.1.1 Az 1-es típusú diabetes mellitus osztályozása	7
1.2 Incidencia	8
1.3 Az 1-es típusú diabetes mellitus pathogenezeise	8
1.3.1 Az autoimmun folyamat.....	8
1.3.2 A regulátoros T-sejtek szerepe	10
1.4 A diabetes mellitus társbetegségei és szövődményei.....	10
1.5 Gasztrointesztinális elváltozások az 1-es típusú diabetes mellitusban.....	11
2. Chromogranin-A	12
2.1. Általános jellemzői: bioszintézis, szekréció, reguláció és biokémiai tulajdonságok	12
2.2. A Chromogranin-A szervezetbeli eloszlása	13
2.3. A Chromogranin-A és a belőle képződő fehérjék funkciója a szervezetben	14
2.4. A Chromogranin-A-ból származó peptidok és a diabetes mellitus kapcsolata	15
2.4.1. Chromogranin-A a 2-es típusú cukorbetegségben.....	16
2.4.2. Chromogranin-A az 1-es típusú cukorbetegségben	17
2.5. A Chromogranin-A egyéb diagnosztikai felhasználása	20
2.5.1. A Chromogranin-A, mint keringő tumormarker.....	21
2.5.2. Chromogranin-A szintek nem onkológiai betegségek esetén.....	21
II. Szérum Chromogranin-A szintek időbeli változása 1-es típusú diabetes mellitusban.....	23
1. A vizsgálat célja	23
2. Vizsgálati módszerek és beteganyag.....	23
2.1. Beteganyag.....	23
2.2 Mintavétel	24
2.3 Chromogranin-A meghatározása	24
2.4 Rutin- és immunlaboratóriumi paraméterek meghatározása	25
2.5 A számított glomerulus filtrációs ráta (eGFR) kiszámítása.....	25
2.6 Statisztikai elemzések.....	25

3. Eredmények	27
3.1 A vizsgált paraméterek és összefüggéseik a kiindulási vérvételkor	27
3.1.1 A Normál CgA csoport paramétereinek összefüggései a kiindulási időpontban	30
3.1.2. Az Emelkedett CgA csoport paramétereinek összefüggései a kiindulási időpontban	31
3.2 A vizsgált paraméterek és összefüggéseik az ismételt vérvételt követően	32
3.2.1 A csoportok paramétereinek összefüggései az ismételt vérvételt követően	33
3.3 A két vérvételi időpont között történt változások kiértékelése	34
3.3.1 A Normál CgA csoport változásai	34
3.3.2 Az Emelkedett CgA csoport változásai	37
3.4 Statisztikai modell a Chromogranin-A változásainak becsléséhez.....	38
3.4.1 A Chromogranin-A változásainak becslése a vizsgálati csoportokban	41
4. Megbeszélés.....	45
III. Összefoglalás	49
IV. Summary	50
V. Irodalomjegyzék.....	51
VI. Köszönetnyilvánítás	58
Elhelyezési Megállapodás és Szerzői Jogi Nyilatkozat.....	59
Témavezetői nyilatkozat	61
Társtémavezetői nyilatkozat	62

Rövidítésjegyzék

APS	autoimmun poliendokrin szindróma
ATPO	pajzsmirigy peroxidáz elleni autoantitest
BMI	testtömegindex
CD	cluster of differentiation
CgA	Chromogranin-A
DNES	diffúz neuroendokrin rendszer
ECL	enterochromaffin-szerű
eGFR	számított glomerulus filtrációs ráta
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GADA/GAD ₆₅	glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest
HbA1C	glikozilált hemoglobin
HDL	magas denzitású lipoprotein
HLA	humán leukocytá antigén
hsCRP	magas szenzitivitású C reaktív protein
IA2-A	tirozin-foszfátáz elleni antitest (insulinoma associated proteintyrosine phosphatase antibody)
IAA	inzulin ellenes antitest (insulin autoantibody)
ICA	szigetsejt ellenes antitest (islet cell autoantibody)
IFN	interferon
IL	interleukin
LADA	látens felnőttkori autoimmun diabetes
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
mRNS	messenger ribonukleinsav
NOD	nem obes diabéteszes
OGTT	orális glükóztolerancia teszt
PCA	parietális sejt ellenes antitestek
RIA	Radioimmune assay
rpm	fordulat per perc
SD	szórás (standard deviance)
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis

T1DM	1-es típusú diabetes mellitus
T2DM	2-es típusú diabetes mellitus
T3	trijód-tironin
T4	tiroxin
T _H	helper T-sejt
T _{reg}	regulátoros T-sejt
TGáz	transzglutamináz enzim
TNF	tumor nekrosis faktor
TSH	thyreoidea stimuláló hormon
VNTR	változó számú tandemismétlődések (variable number tandem repeat)

Bevezetés

Napjaink egyik leggyakrabban előforduló krónikus betegsége a cukorbetegség, melynek középpontjában a szénhidrát-anyagcsere zavara áll, közvetve azonban a zsír,- és protein-anyagcserét is érinti. 2013-as adatok alapján világszerte a cukorbetegségben szenvedők száma 382 millió fő, mely 2035-re elérheti az 592 milliót is. A diabetes mellitus egy gyűjtőfogalom, amelyen belül az inzulinhatás hiánya, vagy elégtelenségét okozó kórfolyamat alapján határozzuk meg a betegség típusait. A diabétesz két fő megjelenési formája az autoimmun eredetű, teljes inzulinhiánnyal járó 1-es típus, illetve a 2-es típusú cukorbetegség, melynek alapja a perifériás szövetek inzulinérzékenységének csökkenéséből adódó relatív inzulinhiány és az ehhez általában később társuló β -sejt diszfunkció. A cukorbetegség közel 10%-a az 1-es, míg a fennmaradó része a 2-es típusba tartozik [1].

A betegség mindkét típusára jellemzőek a hosszabb-rövidebb fennállást követően kialakuló szövődmények. A cukorbetegség szövődményei alapjaiban érintik a keringést és az immunológiai folyamatokat. A leggyakrabban kialakuló szövődmények a retinopathia, a nephropathia, a neuropathia, és különböző a keringési rendszert érintő megbetegedések, mint pl. a perifériás keringési zavarok, a stroke és az iszkémiás szívbetegségek. Fentiek mellett ismeretes még, hogy az egészséges populációhoz képest a cukorbetegség fogékonyabbak az akut és a krónikus infekciókra. Az 1-es típusú cukorbetegségben a zajló autoimmun folyamatok részeként 5-7%-ban alakul ki autoimmun eredetű gastritis, mely rizikófaktora a gasztrointesztinális traktusban kialakuló karcinoid-, és neuroendokrin sejt tumoroknak [1, 2].

Az 1-es típusú diabéteszre a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található, az inzulin elválasztásáért felelős β -sejtek szelektív pusztulásából adódó abszolút inzulinhiány jellemző [3]. Az 1-es típuson belül megkülönböztetünk gyorsan- és lassan progrediáló variánst. A β -sejtek pusztulásához vezető tényezőkről viszonylag keveset tudunk. A háttérben az esetek túlnyomó többségében bizonyítható az autoimmun folyamat jelenléte, azonban a betegség kialakulásáért és fenntartásáért felelős tényezőkről csak kevés információnk és van. Az egyetlen hatékony kezelési lehetőség ma is az inzulin külső forrásból történő pótlása [4].

A Chromogranin-A a granin családba tartozó savas kémhatású fehérje, melyet a neuroendokrin sejtek termelnek és ezek szekréciós granulumaiból származik. A Chromogranin-A-ból számos, jól és mindezidáig kevésbé tisztázott funkciójú fehérje

képződik. Jelenleg a Chromogranin-A vérben mérhető szintjének meghatározását elsősorban a neuroendokrin sejtes daganatok laboratóriumi diagnosztikájában használják. Emellett megfigyelték, hogy a Chromogranin-A is szerepelhet autoantigénként az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásában. A Chromogranin-A egyik hasítási terméke, a WE-14 fehérje a hasnyálmirigy β -sejtjeinek elpusztításában résztvevő diabetogén T-sejtek újonnan felfedezett autoantigénje, mely megfigyelhető mind az 1-es típusú diabetes mellitus modellállatában, a nem obes diabetogén egerekben, mind frissen diagnosztizált 1-es típusú cukorbeteg személyekben [5, 6].

Jelen dolgozat célja az 1-es típusú diabetes mellitus és a Chromogranin-A közötti kapcsolatok ismertetése, a munkacsoportunk által kezelt 1-es típusú cukorbetegekben a szérum Chromogranin-A szintek meghatározása különböző időpontokban utókövetéses módszerrel, illetve az egyes időpontokban a szérum Chromogranin-A koncentrációk kapcsolata a különböző laboratóriumi paraméterekkel, és a beteg fennálló betegségeivel.

I. Elméleti összefoglaló

1. Az 1-es típusú diabetes mellitus [4, 7, 8]

1.1 A diabetes mellitus meghatározása és felosztása

A diabetes mellitus (cukorbetegség vagy cukorbaij) olyan anyagcsere-betegség, melynek középpontjában a szénhidrát-anyagcsere zavara áll. Alapvető oka az inzulin teljes vagy részleges hiánya, illetve az inzulinhatás elmaradása.

A cukorbetegség csak látszólag egységes kórkép, számos típusa és besorolása ismert. Klinikai tünetei is részben attól függenek, hogy milyen típusú diabetesről van szó.

A cukorbetegség kórisméjét a klinikai tünetek keltette gyanú alapján, illetve szűrővizsgálat során a vércukor-meghatározás eredménye biztosítja. A betegség diagnosztizálásához vénás plazmát használnak, és minden esetben laboratóriumi módszerrel határozzák meg a vércukrot. A betegség megállapításához egyaránt használható a nap bármely szakában vett (random) vércukorérték ($\geq 11,1$ mmol/l), vagy az éhomi vércukorszint ($\geq 7,0$ mmol/l), vagy az orális glükóztoleranciateszt (OGTT) során a két óra elteltével levett vér glükóz-szintje ($\geq 11,1$ mmol/l).

1.1.1 Az 1-es típusú diabetes mellitus osztályozása

A cukorbetegség jelenleg érvényes osztályozása kóroki csoportosításra törekszik.

Az 1-es típusú, insulin dependens diabetes mellitus kialakulásáért a pancreas insulintermelő β -sejteinek autoimmun gyulladás okozta pusztulása felelős. A genetikailag hajlamos személyekben, környezeti tényezők – mint pl. vírusfertőzések, vagy korai glutén és/vagy tehéntej expozíció– hatására alakul ki [7, 9].

Az 1-es típusú diabetes mellitusra az inzulint termelő béta-sejtek teljes pusztulása a jellemző, melynek következtében a betegnek az életben maradáshoz inzulin adása szükséges. Inzulin hiányában ketoacidotikus kóma, végül halál következik be. A kórkép klasszikus klinikai tünetei jellemzően 35 éves kor előtt jelentkeznek.

Az 1-es típusú diabetes két alcsoportra osztható: autoimmun mechanizmusú (1A) és idiopathiás (1B). Az 1A típusú cukorbetegségben a béta-sejtek pusztulása T-sejtek által közvetített autoimmun reakció következménye. A folyamatot a Langerhans-szigetekben termelődő inzulin- és szigetsejt ellenes autoantitestek jelzik, melyek egyike a betegség felismerésekor 85-90%-ban mutathatóak ki a betegekben. A betegek jelentős részében

további, más speciális antitestek is kimutathatóak. Ez a forma gyakran társul egyéb autoimmun kórképekkel.

Kifejezetten a felnőttkorra jellemző a látens felnőttkori autoimmun diabetes (LADA). Progressziója lassabb, tünetei hónapok alatt alakulnak ki, ezért inkább a 2-es típusú diabetesre emlékeztet. Az 1-es típusú cukorbetegségre jellemző antitestek jelenlétének igazolásával különíthető el a 2-es típustól.

Az idiopathiás 1-es típusú diabetes (1B) esetén autoimmun folyamatra utaló jelek nem ismertek, a béta-sejt pusztulás kiváltó oka ezen formánál ma még nem ismert. Az 1B típusú cukorbetegség gyakrabban észlelhető ázsiai és afrikai származású betegeknél.

1.2 Incidencia

A cukorbetegség előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat. Az 1-es típus esetében a növekvő incidencia oka – a kiváltó okhoz hasonlóan – ismeretlen. Európában mintegy kétmillió ember szenved 1-es típusú diabetesben [9]. Földrajzi eloszlását tekintve az északi féltekén a betegség jóval elterjedtebb.

A diabetes mellitus hazai prevalenciája kb. 7%, az International Diabetes Federation 2015-re vonatkozó adatai alapján jelenleg 695.000 cukorbeteg kezelnek hazánkban [10]. A betegek csak kevesebb, mint 10%-a tartozik az 1-es típusba [11]. Gyorsabb kialakulása, illetve az életet veszélyeztető akut tünetei miatt – a 2-es típussal szemben – az 1-es típusú betegek számáról jóval pontosabb adatokkal rendelkezünk [12]. Az Egészségügyi Minisztérium 2007-től a gyermekkori diabetest a bejelentendő betegségek körébe sorolta és a betegség előfordulását regisztrálják.

1.3 Az 1-es típusú diabetes mellitus pathogenezeise

Az 1-es típusú diabetes mellitus multifaktoriális kórkép. Jelenlegi ismereteink szerint mind genetikai faktorok, mind környezeti tényezők egyidejű megléte szükséges hozzá, hogy adott egyénben a béta-sejtek pusztulásához vezető autoimmun folyamat elinduljon.

1.3.1 Az autoimmun folyamat

Az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásának alapját a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található, az inzulin elválasztásáért felelős β -sejtek szelektív pusztulása okozza. A térben el nem különülő glukagont termelő α -, és a szomatosztatint termelő δ -sejtek a folyamatban nem érintettek.

Bár a betegség patomechanizmusát összefüggéseiben még nem ismerjük, jelenleg négy genetikai tényező szerepe valószínű a folyamat elindításában és fenntartásában. Az iker- és családvizsgálatok alapján a genetikai faktorok szerepe a betegség kialakulásában 40-60% közöttire becsülhető [12].

Az autoimmun betegségek többségéhez hasonlóan az 1-es típusú diabetes is összefügg bizonyos HLA haplotípusok jelenlétével. Hajlamosító tényezőnek tartjuk a HLA-DR3 és HLA-DR4, valamint a DQ8 és DQ2 allélok meglétét [7]. Az inzulin génjében fellelhető polimorfizmusoknak is komoly jelentőséget tulajdonítanak. Akiknél az inzulin-géne rövidebb VNTR szakaszok találhatók, azok nagyobb eséllyel betegszenek meg, mint akik hosszabb szakaszokat hordoznak [9].

A folyamat az esetek kisebbik részében ismeretlen eredetű, míg az esetek túlnyomó többségében azonban autoantitestek kimutatásával bizonyítható az autoimmunitás jelenléte a háttérben. Ezeket szigetsejt ellenes autoantitesteknek (ICA: islet cell antibody) nevezzük. Ide tartozik a glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest (GADA: glutamic acid decarboxylase antibody), és a tirozin-foszfataz elleni antitest (IA2-A: insulinoma associated proteintyrosine phosphatase antibody). Az inzulin ellen is termelődhet antitest (IAA: insuline autoantibody), azonban ez nem része az ICA pozitívitásnak. Legtöbbször ez utóbbi jelenik meg a legkorábban, meghatározásának azonban csak az inzulinkezelés megkezdése előtt van értelme [7].

A béta-sejtek károsításában a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek, valamint a macrophagok szerepe tűnik a legvalószínűbbnek [8]. A folyamat során a macrophagok az egyik első immunsejt típus, melyek képesek infiltrálni a pancreas szigetsejtjeit. Fontos szerepet játszanak a β -sejtek antigénként való felismerésében és prezentálásában, majd a T_H1-es immunválasz indukálásában [13]. A közvetlen destrukció pórusképzés (CD8⁺ sejtek) és a β -sejtekre toxikus TNF- α termelése (macrophagok) révén valósul meg [14].

Egészen új megfigyelés, hogy a Chromogranin-A is szerepelhet autoantigénként az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulása során. Stadinski és mtsai. az 1-es típusú cukorbetegség kísérletes modelljeként szolgáló NOD (non-obese diabetic) egerekben izolálták a Chromogranin-A részét képező WE14 fehérjét, mint az erősen diabetogén CD4⁺ sejtek által felismert antigént. A WE14 atípusosan kötődik az MHC-II molekulához, erősítve azt a feltételezést, hogy az autoreaktív T-sejtek rendellenesen prezentált saját fehérjékkel reagálnak [5].

1.3.2 A regulátoros T-sejtek szerepe

Folyamatosan növekszik azoknak az adatoknak a száma, amelyek a regulátoros T-sejtek (T_{reg}) fontosságát támasztják alá az autoimmun betegségek kialakulásában. A T_{reg} sejtek mind a $CD4^+$, mind a $CD8^+$ szubpopuláción belül megtalálhatóak. A perifériás $CD4^+$ szubpopulációnak körülbelül 5-10%-át teszik ki.

Meggyőző adatok szólnak amellett, hogy az autoimmun eredetű 1-es típusú diabetes kialakulásában is szerepe lehet a regulátoros T-sejtek nem megfelelő működésének. A $CD4^+CD25^+$ T_{reg} sejtek képesek mind a többi $CD4^+$ sejt, mind a $CD8^+$ sejtek proliferációját és citokintermelését gátolni. Egyes megfigyelések szerint 1-es típusú diabetesben szenvedő betegek az egészséges kontroll személyekkel azonos mennyiségű T_{reg} sejtrel rendelkeznek, ezek azonban nem képesek megfelelően ellátni funkciójukat [15].

1.4 A diabetes mellitus társbetegségei és szövődményei

A diabetes mellitusra jellemzőek a hosszabb-rövidebb fennállás során kialakuló gyorsan (akut) és lassan megjelenő (krónikus) társbetegségek, illetve szövődmények. A cukorbetegség szövődményei érintik mind a keringést és az immunológiai folyamatokat, amelyek egyéb specifikus szövetkárosodásokkal együtt jelentős életminőség-romláshoz, magasabb mortalitáshoz vezetnek. A leggyakrabban előforduló társbetegségeket, illetve szövődményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A cukorbetegség immunszuprimált állapotnak tekinthető, aminek következtében az egészséges populációhoz képest gyakoribbak a bőrön át terjedő infekciók. A magas vércukorszint, különösen a ketontestek jelenlétével együtt, gátlólag hat a phagocytafunkcióra.

A cukorbetegség szív-érrendszeri kockázata jelentősen magasabb a normális szénhidrát-anyagcserével rendelkező társaikénál. A vaszkuláris szövődmények (micro-, és macroangiopathia) kialakulásában az endothel szerepe tűnik elsődlegesnek. A cukorbetegségben az endothelfüggő vasodilatatio elmaradása jelzi a microcirkuláció károsodását. Kardiális dekompenzáció a cukorbetegség között 33%-kal fordul elő gyakrabban az egészséges populációhoz viszonyítva. Kezdetben inkább a diastolés funkció károsodik [16].

Az 1-es típusú diabetes súlyos akut szövődménye a diabeteses ketoacidózis, illetve az ezt követő még súlyosabb állapot, a ketoacidotikus kóma. Mortalitása az inzulin felfedezése előtt 100% volt, mára ez 4-8% közé csökkent [7].

1. táblázat: A diabetes mellitusban leggyakrabban előforduló társbetegségek és szövődmények [7, 8, 16-18]

Szervrendszer	Szövődmények	Társbetegségek
<i>Szív- és érrendszer</i>	Angiopathia, stroke, infarktus	Hypertonia, atherosclerosis
<i>Vese</i>	Abluminuria, nephropathia	
<i>Idegrendszer</i>	Neuropathia	
<i>Érzékszervek</i>	Retinopathia	
<i>Endokrin rendszer</i>		APS-2, APS-3A autoimmun thyroiditis
<i>Gasztrointesztinális rendszer</i>	Gastropathia	Autoimmun gastritis, coeliakia, Chron betegség

1.5 Gasztrointesztinális elváltozások az 1-es típusú diabetes mellitusban

Az egészséges populációhoz képest 1-es típusú cukorbetegségben két-háromszor gyakrabban jelennek meg parietális sejt ellenes autoantitestek (PCA). A PCA pozitív betegek közel egyharmadában alakul ki autoimmun eredetű gastritis. Az autoimmun gastritises betegek egy részében anaemia perniciosa alakul ki. Karcinoid gyomor daganatok az autoimmun gastritisben szenvedő betegek 4-9%-ában alakul ki.

Az autoimmun gastritis korai diagnózisa T1DM betegek esetén rendkívül fontos az enterokromaffin-szerű (ECL) sejtes hiper- és diszplázia, illetve a karcinoid daganatok megelőzése és kezelése szempontjából.

De Block és munkatársai vizsgálataik során PCA pozitív (PCA⁺) és negatív 1-es típusú cukorbetegeket vizsgáltak. A PCA⁺ autoimmun gastritisben szenvedő betegek 33%-ánál találtak proliferatív ECL-sejtes elváltozásokat, beleértve egy esetben karcinoid gyomor daganatot is. A teljes lakosságra vonatkoztatva a PCA pozitivitást 9%-ra becsülik. Javaslatuk alapján a PCA pozitív 1-es típusú diabeteszes betegek rendszeresen vizsgálni kellene karcinoid tumorok irányában, különösen azon esetekben, ahol a diabetes felfedezése 3 éven belül történt és ICA, GAD₆₅ és thyroid peroxidáz antitest pozitivitás is igazolt [2].

2. Chromogranin-A [4, 6]

A Chromogranin-A (CgA) egy, a granin glükoprotein családba tartozó savas kémhatású, hidrofil, 439 aminosavból (48kDa) álló fehérje, melyet számos endokrin és neuroendokrin sejttípus képes szintetizálni. Az elnevezés 1967-ből származik, amikor Blashko és mtsai. szarvasmarhák chromaffin típusú granulumaiból szolubilis fehérjét izoláltak, melyeket chromograninoknak [19], míg a felfedezett fehérjék fő komponensét Chromogranin-A-nak nevezték el [20, 21].

A humán szervezetben a CgA termelése a terhesség során a 6. és 8. hetes embriókban észlelhető először, a mellékvese primordiumában, az emésztőszervek endokrin sejtjeiben, majd a 9. héten megjelenő, a chromaffin sejtek előalakjainak tekinthető „nagymeretű sejtekben” mutatható ki [22].

2.1. Általános jellemzői: bioszintézis, szekréció, reguláció és biokémiai tulajdonságok

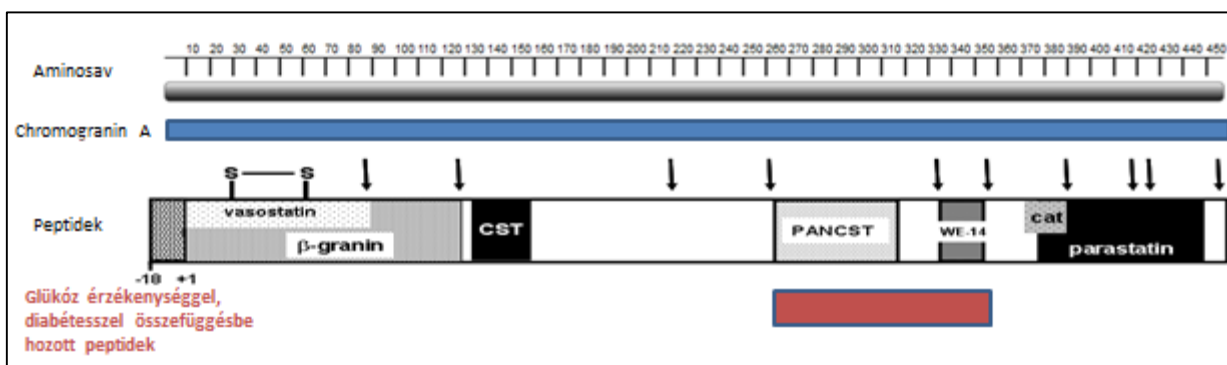
A CgA bioszintézisének szabályozásában számos intracelluláris hírvivő molekula vesz részt. A protein kináz C jelátviteli útvonal sejt-specifikusan szabályozza a CgA termelődését. A hisztamin, a nikotin, az angiotenzin II, a prosztaglandin E₂ és a kálium-ionok is elősegíthetik a CgA bioszintézisét, melyet a feszültségfüggő kalcium-ioncsatornák aktiválásával fokoznak.

Egészséges állapotban is termelődik a szervezetben, vérplazma szintje cirkadián ritmust mutat (reggel alacsonyabb, míg este magasabb) [23]. A molekula szérumszintjének az egészséges tartománynál (19,4 - 98,1 ng/ml) intenzívebb növekedése általában valamilyen kóros, neuroendokrin sejtgyökér kialakulását jelzi [24].

A humán CgA-t kódoló gén 12 kilobázis hosszúságú, 8 exonból áll és a 14q32.12-es lókuszon található [25], az általt fehérje 439 aminosav hosszú [26]. Szerkezete némileg konzervált a különböző fajok között, de a CgA mérete az egyes állatfajokban változó; a legrövidebb 430 aminosavból álló CgA fehérjével a sertések, míg a leghosszabb 445 aminosavból álló variánszal az egerek rendelkeznek. Minden vizsgált állatfajban igazoltak két darab cisztein reziduumot (Cys¹⁷, Cys³⁸) az amino-terminális szakaszban, melyek között egy diszulfid híd alakul ki. Ezen szerkezeti sajátosság megfigyelhető a Chromogranin-B, és egyéb, a granin-családba tartozó fehérjékben is (**1. ábra**) [27].

A CgA-t kódoló gén expresszióját különböző szteroid hormonok is befolyásolhatják; az agyalapi mirigyben a glükokortikoidok fokozzák, az ösztrogén pedig gátolja a CgA termelést [26].

A Chromogranin-A számos más biológiailag aktív peptid előalakja, amelyek a CgA hasításával jönnek létre. Ezek közé tartoznak a pancreastatin, a β -granin, a chromostatin, a vasostatin és a parastatin. A fehérje poszttranszlációs módosulásai – glikolizáció, foszforiláció, szulfatáció vagy karboximetiláció – során a molekula mérete jelentősen meg is nőhet (akár 75-80kDa) (**1. ábra**) [26, 28].

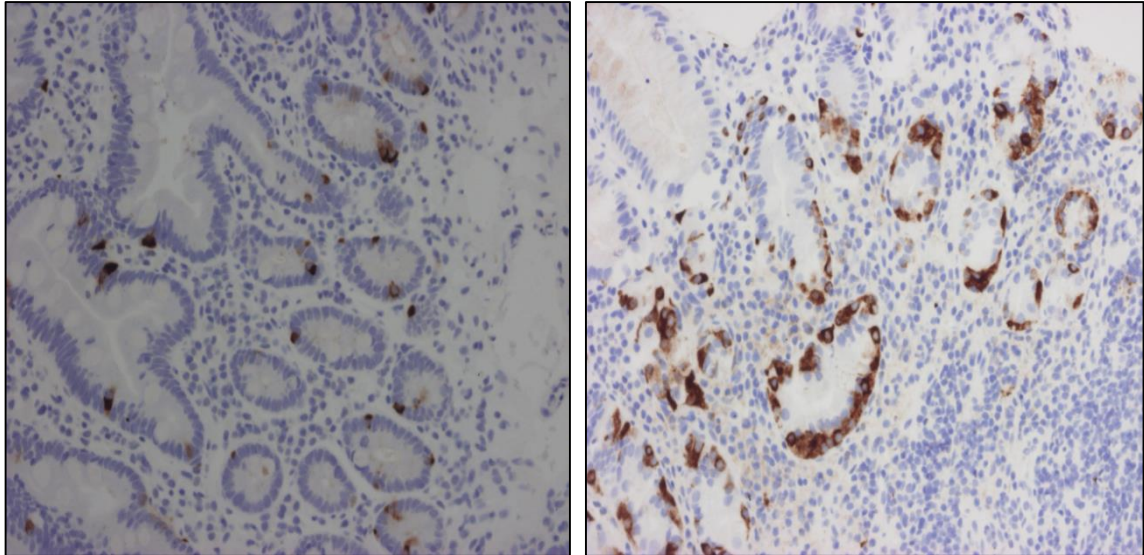


1. ábra: A humán Chromogranin-A aminosav, fehérje és a CgA hasításával képződő peptidek szerkezete, strukturális és funkcionális doménjei. A fehérje N-terminális végén egy diszulfid híd található. A molekula egyes részei megegyeznek az alábbi biológiailag aktív peptidekkel: β -granin, vasostatin, chromostatin (CST), pancreastatin (PANCST), WE-14, katesztatin (cat) és a parastatin. Forrás: [6].

2.2. A Chromogranin-A szerkezetbeli eloszlása

Legnagyobb mennyiségben a CgA a mellékvese velőállományának chromaffin sejtjeiben fordul elő, illetve a szimpatikus idegrostok elektrondenz vezikulumaiban. Az egyes neuroendokrin sejtjeiben a CgA tartalom a szövet típusa szerint változik. A központi és perifériás idegrendszer, az agyalapi mirigy és a mellékpajzsmirigy szintén CgA-ban gazdag területek. CgA-t termelő sejtek találhatóak még a pajzsmirigy kalcitonin termelő C-sejtjeiben, és a pancreas inzulin- és glukagon termelő exokrin szöveteiben is, illetve a tüdőben, a lépben, a prosztatában, a csecsemőmirigyben, és a gyomor-bél traktusban található diffúz neuroendokrin rendszerben (DNES) is [29].

Fontos kiemelni, hogy a fentebb részletezett sejtípusokból kiinduló daganatok szintén CgA-ban gazdagok lehetnek, ami a neuroendokrin eredetet igazolja (**2. ábra**). Diagnosztikailag a CgA emelkedett szintjének immunhisztokémiával történő igazolása különösen fontos a DNES-ből származó daganatok, elsősorban a gyomor-bélrendszeri és a bronchopulmonaris daganatok eseteiben [28, 30].



2. ábra: Felső panendoscopiás vizsgálat során vett, DAKO DAK-A3-as Chromogranin-A-t kimutató immunhisztokémiai festéssel kezelt biopsziás minták. A DAKO DAK-A3 kitben található antitestek segítségével a normál sejtek és a neuroendokrin eredetű hyperpláziák különíthetők el. A bal oldali mintában hyperplázia nem, míg a jobb oldali mintában lineáris hyperplázia figyelhető meg (nagyítás mérete: 200x). Fotó: Prof. Dr. Nagy Péter.

Forrás: [6]

2.3. A Chromogranin-A és a belőle képződő fehérjék funkciója a szervezetben

A Chromogranin-A megfelelő biológiai aktivitásához a fehérje proteolitikus módosulásai szükségesek, melyek mind intracellulárisan, mind extracellulárisan végbemehetnek. A CgA-ból több, biológiailag aktív fehérje is kialakulhat, egyes feltevések szerint azonban akár további, mindezidáig még fel nem fedezett fehérjék is képződhetnek belőle. A legtöbb lehasadó fehérje biológiai hatásának pontos mechanizmusa ma még nem teljesen ismert [26, 28], de számos olyan intra- és extracelluláris hatás ismert, amelyeket összefüggésbe hoztak a Chromogranin-A-val, illetve a belőle képződő peptidekkel.

A Chromogranin-A intracelluláris funkciói közül nagy kapacitású és alacsony affinitású kalcium-kötő képessége emelendő ki, melyet elsősorban a szekréciónak granulumban történő felszabadulása során a változó pH szabályoz [31]. A H^+ - és Ca^{2+} -ionok koncentrációja a granulumban képes akár konformációs változásokat is okozni a fehérjében, illetve a kalcium képes fokozni a CgA membránokhoz való kapcsolódását is [32, 33]. A molekula aminosav sorrendjének több régiója hasonlóságot mutat jól ismert kalcium-kötő proteinek kalcium-kötő doménjeihez, mint például a kalmodulin vagy a bélrendszeri D-vitamin-függő kalcium-kötő protein (kalbindin D9K). A fehérje kalcium-kötő sajátosságai járulnak hozzá a molekula

azon tulajdonságához is, hogy képes bizonyos peptidhormonok és neurotranszmitterek kapcsolódás útján történő szelektív válogatására, majd a kapcsolódott fehérjék szekréciónak granulumba csomagolására. A Golgi ciszternák kémhatása normál esetben semleges, azonban a beáramló H^+ - és Ca^{2+} -ionok a kémhatást a savas irányba tudják eltolni. A transz-Golgiban kialakuló savas eltolódás a CgA, és az ahhoz kötődött fehérjék és neurotranszmitterek szekréciónak granulumba történő aggregációját okozza. Az aggregációt követően a szekréciónak granulumba zárva válnak le a Golgi apparátusról. A nem-CgA kapcsolt fehérjék a leváló granulumba nem kerülnek bele [26].

Extracelluláris funkcióit a molekulából lehasadó, származtatott peptidek felfedezéseivel bizonyították. Az első bizonyítékot, hogy a CgA más hormonfehérjék előalakja lehet, a glükóz-indukálta inzulin kibocsátást gátló pancreastatin, egy 49 aminosavból álló, karboxilamidált fehérje adta. A pancreastatin nagymértékű hasonlóságot mutat a sertésből izolált CgA fehérje 240. és 288. aminosav közötti szakaszával. Fentiekből arra következtettek, hogy a keletkezett fehérje a szervezetben *in vivo* alakulhat ki a CgA molekulából [34].

A pancreastatin mellett további, a CgA-ból származtatható, biológiailag aktív fehérjéket azonosítottak. Ezek egyike a 20kDa méretű β -granin, amely a CgA 1-128. aminosav közötti szakaszának feleltethető meg. A fehérje a hasnyálmirigy β -sejtjeiben termelődik. *In vitro* kísérletek során a mellékpajzsmirigy sejt szekréciónak gátló hatását mutattak ki, azonban pontos funkciója a szervezetben nem ismert [35].

Szintén *in vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a vasostatin, mely a korábban említett β -granin szekvencián belül található (CgA-[1-76]), gátolja a véredények TNF- α által indukált permeabilitását és az endoteliális sejt-proliferációt [36].

A chromostatin szintén a CgA egy hasítási terméke, mely a CgA gén VII. exonján kódolódik és 20 aminosavból áll. Galindo és munkatársai kimutatták, hogy a chromostatin gátolja a chromaffin-sejtek szekréciónak, feltehetően, mint a katekolamin-asszociált válaszok endokrin modulátora [37]. A hasnyálmirigy β -sejtjeiben termelődő chromostatin pontos funkciója ma még nem ismert.

2.4. A Chromogranin-A-ból származó peptidek és a diabetes mellitus kapcsolata

A CgA és a diabetes mellitus kapcsolatát a betegség gyakori előfordulása ellenére eddig igen kevesen vizsgálták [38]. Több közlemény számolt be arról, hogy a CgA-ból képződő pancreastatin és a WE-14 nevű fehérjemolekula is szerepet játszhat a cukoranyagcserében. A pancreastatinról kimutatták, hogy szabályozza a cukor-, zsír- és fehérje anyagcserét a májban és a zsírszövetekben. Szintén igazolták, hogy szabályozza a leptin szekréciónak és

expresszióját a zsírszövetben. Csökkenti a máj cukorfelvételt, glikogenezist indukál és gátolja a glikogén szintézisét. Ezen hatások közvetítésében a pertussis-toxinra érzéketlen G-protein ($G_{\alpha q/11}$) által aktivált foszfolipáz C $\beta 3$ -izoformája játszik szerepet a májsejtek citoplazmatikus Ca^{2+} ion-koncentrációjának növelésével és a protein kináz C stimulálásával [39].

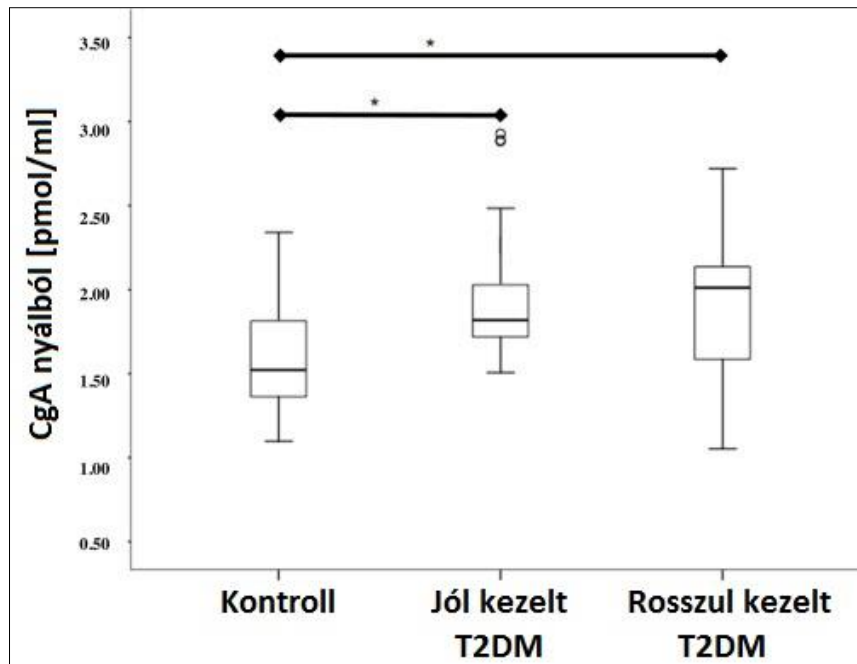
Sánchez-Margalet és mtsai. [40] a pancreastatin emelkedett szintjét figyelték meg terhesség során kialakult cukorbetegségben, gestációs diabetesesekben kontroll egyénekhez képest. Ugyanebben a vizsgálatban pozitív korrelációt mutattak ki a pancreastatin és egyes catecholaminok (epinefrin és norepinefrin) szintje között.

2.4.1. Chromogranin-A a 2-es típusú cukorbetegségben

Funakoshi és munkatársai 2-es típusú cukorbetegségben (T2DM) az étkezéseket követően szignifikáns pancreastatin szint emelkedéseket figyeltek meg, kontroll személyekhez hasonlítva [41]. A betegekben ez a kismértékű emelkedés feltehetően a pancreastatint termelő hasnyálmirigysejtek glükóz-érzékenységre utalhat, ami alapján feltételezhető, hogy a 2-es típusú cukorbetegségben kialakuló kismértékű pancreastatin hyperszekréció szerepet játszhat a glükóz-indukálta inzulin szekréció gátlásában, ami végső soron hyperglycaemiát válthat ki.

Soell kutatócsoportja 2010-ben kezdte el vizsgálni 2-es típusú cukorbeteg, és egészséges kontroll személyek bevonásával a nyálban lévő Chromogranin-A koncentrációkat. A nyálmintákból a CgA és származékainak koncentrációit SDS-PAGE gélelektroforézist követően immunoblotolással (Western Blot) módszerrel határozták meg. Eredményeik alapján a vizsgált 2-es típusú cukorbeteg teljes populációjában a CgA túltermelése több, mint kilencszerese volt az egészséges egyénekhez képest [42].

Soell megfigyeléseit követően egy brazil munkacsoport is vizsgálni kezdte a nyálban található Chromogranin-A különböző hatásait 2-es típusú cukorbeteg személyekben. Első vizsgálatukba jól, és rosszul kezelt 2-es típusú cukorbetegeket, illetve kontroll személyeket vontak be. Mind a nyálban (**3. ábra**), mind a vérben mérhető CgA szintek szignifikánsan magasabbak voltak a T2DM betegek esetében. Illetve a magasabb Chromogranin-A koncentrációk mellett mindkét cukorbeteg csoportban szignifikánsan magasabb számban fordultak elő különböző fogágybetegségek (vérzések, klinikai tapadásvesztés, magasabb plakk index) [43].



3. ábra: Chromogranin-A koncentrációk (pmol/mL) jól és rosszul kezelt 2-es típusú cukorbeteg, illetve egészséges kontroll személyek nyálában. Forrás: [43].

Szintén a brazil Kogawa és munkacsoportjának megfigyelése, hogy a stimulálás nélküli labiális és teljes nyáltermelés a 2-es típusú cukorbeteg esetében lényegesen alacsonyabb, melyhez kapcsolódóan magasabb Chromogranin-A szinteket mértek mind nyálból, mind serumból. A fenti eredmények mellett a vizsgálat során két CgA gén polimorfizmust (T-415C és Glu264Asp) is megvizsgáltak, amik eredményeik alapján a 2-es típusú cukorbetegség során a nyálmirigyek alulműködését, illetve a nyálban mérhető magasabb CgA koncentrációkat okozhatják [44].

2.4.2. Chromogranin-A az 1-es típusú cukorbetegségben

Az 1-es típusú cukorbetegségben az autoreaktív T-sejteknek a β -sejtek ellen termelt antigénjei központi szerepet játszanak a pancreas β -sejtjeinek pusztulásában mind a humán 1-es típusú cukorbetegségben (T1DM), mind pedig a T1DM modellállataiban, a nem-obes diabeteszes (NOD) egerekben. A korán felfedezett autoreaktív T-sejtek a β -sejtek pusztulását jelezhetik előre, illetve a pre-diabeteszes állapotok biomarkerei lehetnek [5].

A CgA-ból kialakuló WE-14 fehérjét (CgA-[359-372]) Guillemot és munkatársai elsőként a mellékvesevelő chromaffin sejtjeiből kialakuló catecholamin termelő tumorból (pheochromocytoma) izolálták. Az izolációt követően kimutatták, hogy a fehérje megtalálható mind az embriók, mind a felnőttek chromaffin sejtjeiben is, illetve primer

phaeochromocytoma tenyészetekben is sikeresen detektálták. Kísérleteik során igazolták, hogy a CgA-hoz hasonlóan a WE-14 is könnyen detektálható egészséges egyének véréből vett mintákból [45].

Később a WE-14 jelenlétét igazolták a hasnyálmirigy β -sejtjeiben és egyéb gastro-entero-pancreatikus szövetekben is [5]. Haskins és munkacsoportja már 1989-ben igazolni tudták NOD egerekben a diabetogén autoantitestek jelenlétét a hasnyálmirigy szigetsejtjeiben [46], azonban az autoimmunitást kiváltó molekulát csak sokkal később, Stadinski és munkatársai fedezték fel 2010-ben, proteomikai módszerekkel. Megállapították, hogy a WE-14 a β -sejtekre diabetogén hatású reaktív $CD4^+$ T-sejt klónok antigénjeként funkcionál. A WE-14-en megtalálható antigén motívum ellenére hiányoznak róla azok az N-terminális aminosavak, amelyek elfoglalnák az MHC II antigénjének, az I-A^{g7} p1-p4 közötti peptidkötő helyeit, melyek rendszerint szükségesek a stabil MHC II kötéshez. Adataik alapján feltételezhető, hogy a WE-14 C-terminálisa aspecifikus kölcsönhatást alakít ki az I-A^{g7} egy olyan kötőhelyén, mely kívül esik a szokásos peptidkötő barázdán [5].

NOD egerek hasnyálmirigy β -sejtjei mellett további egyéb gastro-entero-pancreatikus szövetmintákon is megvizsgálták a Chromogranin-A-ra adott immunreakciókat. E kísérletek során a hasnyálmirigy β -sejtjein kívül az egyéb szövetekben CgA-indukálta autoimmun folyamatok nem voltak igazolhatóak [47]. Hogy a NOD egerekben a β -sejteken kívül más szövetekben miért nem figyelhető meg a β -sejtekéhez hasonló CgA indukálta autoimmun reakció, az jelenlegi ismereteink szerint még nem világos. Stadinskiék [5] feltevései szerint a CgA csak akkor működhet a hasnyálmirigyben autoantigénként, ha a molekula hasnyálmirigy-specifikus posztranszlációs módosításokon esik át. Míg egy másik elmélet szerint [48] a β -sejtek szelektív pusztulása annak tulajdonítható, hogy azok nagyobb érzékenységet mutatnak a gyulladással járó károsodásokra, mint az a többi szekretoros pancreas sejttípus esetén megfigyelhető.

A fenti két elmélet mellett Standinskiék tanulmányában [5] felmerült a kérdés, hogy a thymus fejlődése során miként alakulhatnak ki olyan T-lymphocyták, amik kifejezetten a CgA-ra specifikusak? Mint ismeretes a CgA már a fejlődés korai szakaszában nagy mennyiségben termelődik a szervezetben [22], így feltételezhető lenne, hogy a thymusban lejátszódó T-sejtek érése során a CgA-érékeny T-sejtek kellő mennyiségben szelektálódnak. Azonban a thymus medulláris epithélium sejtjein végzett kísérletek során [49] a CgA gén mRNS-e nem volt detektálható, és feltételezhetően ezen CgA-mRNS hiánynak lehet az oka, hogy nem szelektálódnak ki kellő mennyiségben a CgA-ra reagáló T-sejtek az érés során.

A WE-14 fehérje antigén aktivitása szöveti transzglutamináz enzim (TGáz) kezelés hatására drámaian megnő. A TGáz különböző fehérjék módosítását katalizálja, amely dezamidálás (glutamin lebontása glutaminsavvá) és a fehérjék keresztkötéseinek átalakítása (a fehérjék glutamin és lizin aminosav-oldalláncai között alakít ki izopeptid kötéseket) [50]. A TGáz kezelés hatására bekövetkező magasabb antigenitást a WE-14 fehérje esetében egyedül a keresztkötések átalakítása okozza, a dezamidációs módosítások esetén nem figyelhető meg erősebb antigenitás [51].

Delong és munkatársai az 1-es típusú cukorbetegség kísérletes modelljeként szolgáló NOD egerekben vizsgálták a WE-14 és a TGáz kapcsolatát. Eredményeik alapján a TGáz a WE-14 fehérjét egy gyengén stimuláló antigénből jelentős agonistává alakítja a CgA-reaktív és I-A^{g7}-korlátozott CD4⁺ T-sejtek számára. Az átalakított fehérje alacsony koncentrációja nem csak a diabetogén β -sejtekre jellemző BDC T-sejt és BDC-2.5 TCR-Tg T-sejt klónok esetén, hanem a nem-transzgen NOD egér T-sejt klónok esetén is erős reakciókat mutatott. A primer CD4⁺ T-sejtek jelenléte a poliklonális NOD populációk esetén, – melyek szintén reagálnak a megváltozott WE-14 peptid esetén is – azt sugallja, hogy a WE-14 fehérje fontos autoantigén epitóp lehet az 1-es típusú diabetesben [51].

Gottlieb és munkatársai frissen diagnosztizált 1-es típusú cukorbeteg és egészséges kontroll személyek vizsgálatával kimutatták, hogy a CgA-ból kialakuló WE-14 fehérje az autoreaktív T-sejtek célpontjaként szolgál az újonnan diagnosztizált 1-es típusú diabeteses betegeknél, míg az egészséges kontroll populációban az antigenitás nem volt igazolható. A TGáz enzimmel módosított WE-14 egyes betegeknél tovább fokozta az antigén hatást [52].

Jin és munkacsoportja [53] a transzglutamináz mellett további fehérjemódosításokat is feltételeztek a WE-14 molekula kapcsán. Eredményeik alapján a fehérje poszttranszlációs módosításai kiegészülnek különböző aminosav-lánc addíciókkal is, melyek a fehérje N-terminális végéhez kapcsolódnak. Az arginin-leucin-glicin-leucin (RLGL-) aminosav szakasszal módosított WE-14-t tesztelték különböző NOD egér T-sejt hibridóma vonalakon. Megállapították, hogy az így kialakított RLGL-WE14 már alacsony koncentrációban is képes kapcsolatba lépni a T-sejt receptorok V α , J α , V β , J β és CDR3 hurkainak különböző szegmenseivel, így kialakítva az immunreakciót a pancreas szigetsejtjeiben. Az N terminális végén extra-aminosavakkal kapcsolt WE-14 kialakulásában nagy szerepet gondolnak a reverz proteolízisnek, avagy transzpeptidációs mechanizmusoknak, mely a prohormon konvertáz által vezérelt, teljes Chromogranin-A fehérjéről történő lehasadását követően játszódhat le.

Li és munkatársai [54] az 1-es típusú cukorbetegség kialakulása során szerepet játszó T-lymphocyták egy másik ismert diabetogén szubpopulációját, a CD8⁺ T-sejteket vizsgálták Chromogranin-A-val szemben HLA-A*0201 transzgenikus egérben és T1DM beteg személyekben. A vizsgálatok során az egérből származó mChgA₁₀₋₁₉ és mChgA₄₃₋₅₂ CgA-fehérjeszármazékokkal reagáltatott CD8⁺ T-sejteknél jelentős IFN- γ , perforin termelést igazoltak. A CgA-reaktív T-sejt klónok mellett egy másik CD8⁺ T-sejt klónpopuláció intenzív IL-17 termelésbe kezdett – melyet az mInsA₂₋₁₀ indukálta CD8⁺ T-sejteknél is igazoltak – [55, 56], mely szintén szerepet játszhat a betegség kialakításában.

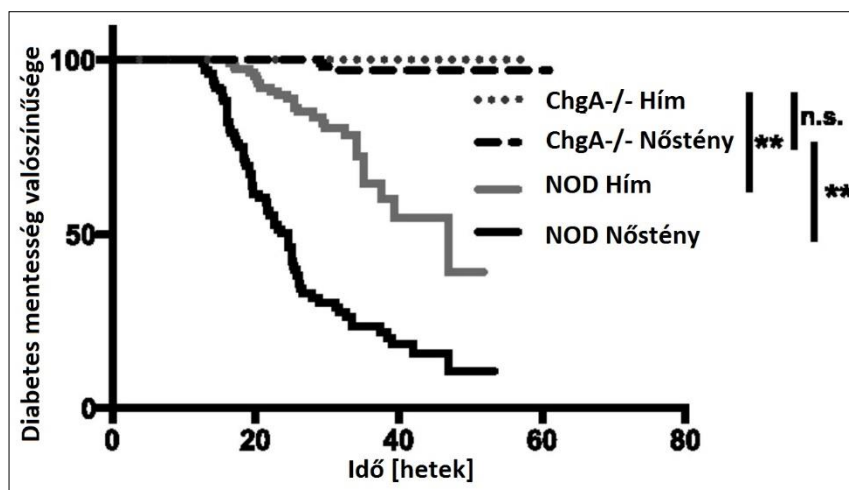
Baker munkacsoportjának legfrissebb eredményei alapján [57] a Chromogranin-A deficiens knockout egereknél (NOD.ChgA^{-/-}), a vad típusú NOD egerekhez képest az 1-es típusú cukorbetegség nem, vagy csak nagyon kis számban alakul ki. A 12 hónapon át tartó megfigyelések során a betegség a vizsgálatba vont vad típusú nőstény NOD egerek több mint 90%-ánál volt megfigyelhető, míg a NOD.ChgA^{-/-} nőstények esetében a 118 egyedből csupán 3 mutatta a betegség tüneteit. A megfigyelés ideje alatt a hím knockout egereknél pedig a betegség nem is alakult ki (**4. ábra**). Az 52 hetes megfigyelést követően patológiai módszerekkel vizsgálták meg az egerek hasnyálmirigyeit, és a CgA deficiens egereknél a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben kialakuló gyulladás, az insulitis csupán az állatok kevesebb, mint 20%-ban volt igazolható. Ugyanez a vad típusú egyedeknél 100-ban jelen volt.

A kioperált hasnyálmirigyekből immunológiai vizsgálatokat is végeztek. Kimutatták, hogy a NOD.ChgA^{-/-} egerek hasnyálmirigyében, a vad típusú NOD egerekéhez hasonlóan, az infiltrációra képes CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ és CD45⁺ T-sejt klónok száma szignifikánsan alacsonyabb [57].

2.5. A Chromogranin-A egyéb diagnosztikai felhasználása

A CgA kimutatása szérum vagy plazma vérmintákból radioimmunassay (RIA) vagy ELISA technikákkal lehetséges. Fontos hangsúlyozni, hogy a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően – legyen szó RIA vagy ELISA technológiáról – a detektáláshoz csak a CisBio cég kettős, monoklonális antitestet használó reagensei használhatóak [28].

Külön említést érdemel, hogy a hypoaciditású, atrophias gastritis valamint a savszekréció-gátlás (pl. protonpumpagátló vagy hisztamin H₂-receptor blokkoló kezelés) emeli a szérum CgA szintet másodlagos hypergastrinaemia és a gyomor enterochromaffin-szerű sejtjeinek serkentése által [58, 59]. A CgA mérése előtt az ilyen típusú kezelések felfüggesztése javasolt, a gyógyszer típustól függően legalább három felezési idő erejéig [60].



4. ábra: A Chromogranin-A deficiens NOD egerek védve vannak az 1-es típusú cukorbetegségtől. Mind a hím, mind a nőstény NOD.ChgA^{-/-} egereknél szignifikánsan alacsonyabb a betegség kialakulása ($p < 0.01$). Forrás: [57].

2.5.1. A Chromogranin-A, mint keringő tumormarker

A karcinoid tumorok leggyakoribb peptid szekréciós termékei közül klinikai diagnosztikai szempontból a CgA a legjelentősebb. A szövetmintákban a CgA pozitívitas a daganatok neuroendokrin sejtes eredetére utal. A legmagasabb CgA szinteket a gastrointestinális rendszer neuroendokrin sejtes tumorai esetében regisztrálták, különösen a vékonybél karcinómái és a hasnyálmirigy kóros szigetsejtjei esetében [28].

A serum CgA vizsgálata különösen informatív lehet azokban az esetekben, amikor a daganat hormonálisan inaktív. A legtöbb neuroendokrin daganat esetében, a CgA vérkoncentrációja jelentősen meghaladja a normál tartomány felső határát, így diagnosztikus értéke jó, bár fals pozitív és negatív eredmények is előfordulhatnak [61].

A betegség aktivitásának és a kezelés eredményességének nyomon követésében is hasznos a szérumban CgA koncentráció meghatározása, a CgA érték növekedése a daganatos folyamat progresszióját, a tumor növekedését is jelzi [60].

Az egyes nem neuroendokrin eredetű tumorok esetében is megfigyelhetőek emelkedett CgA értékek, mivel a neuroendokrin tumorsejtek elszórtan megjelenhetnek a kialakult neoplasiákban, vagy esetleg kisebb klasztereket hozhatnak létre azok szöveteiben [62].

2.5.2. Chromogranin-A szintek nem onkológiai betegségek esetén

Különböző mértékben emelkedett CgA szintek detektálhatók abban az esetben is, ha a vizsgált személy valamilyen gyulladáscsökkentő bélbetegségben (pl. Crohn betegség), előrehaladott májelégtelenségben, szívelégtelenség vagy atrófiás gastritisban szenved. Az atrófiás gastritis

esetén a magasabb CgA szintek a gasztrin enterochromaffin-szerű sejtekre (ECL) kifejtett stimulációja miatt alakulnak ki [63].

A legtöbb jelentős CgA növekedésről a veseelégtelenség miatt kialakuló csökkent peptid szekréció esetén számoltak be. Intenzív sympathoadrenalis stimuláció (stressz, testmozgás) képes akár a normális kétszeresére megnövelni a CgA szintjét. Enyhe CgA emelkedésről számoltak be menopauzás nők esetén is [63, 64].

A vasostatin (vasostatin-1 és vasostatin-2), mely a CgA N-terminális fragmentuma, az értónus befolyásolása révén szabályozza a vérnyomást. A CgA és a humán artériás hipertonia közötti összefüggés első bizonyítéka 1985-ből származik, mikor is O'Connor megfigyelte, hogy magas vérnyomású betegekben magasabb a vérben mérhető CgA szintje, mint egészséges személyekben [65].

Egyes CgA-eredetű peptidek képesek gátolni a katekolamin felszabadulását. Ennek, a katekolamint gátló molekulának a katesztatin (humán CgA-[352–372]) nevet adták. Hypertoniás betegeknél, illetve a magas vérnyomás szempontjából fokozott genetikai kockázattal rendelkezőknél alacsonyabb katesztatinszintek mérhetők, mint egészséges kontrollszemélyeknél. Végstádiumú vesebetegségben szenvedő hypertoniás betegeknél szintén csökkent a katesztatin szintje [66].

II. Szérum Chromogranin-A szintek időbeli változása 1-es típusú diabetes mellitusban

1. A vizsgálat célja

Vizsgálatunk során arra kerestük a választ, hogy olyan 1-es típusú cukorbetegekben, akiknek a betegségük során Chromogranin-A koncentráció szint mérés történt, 3 év múlva változott-e a mérhető szérum Chromogranin-A szint. A betegek a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Anyagcsere ambulanciáján kezelt 1-es típusú cukorbetegek voltak. A betegek CgA szint változásai mellett vizsgáltuk azt is, hogy található-e összefüggés a szérum Chromogranin-A szintek változásai és az 1-es típusú diabetes mellitus mellett kialakuló további autoimmun és nem-autoimmun megbetegedések megjelenésének gyakorisága, és egyes rutin- és immunlaboratóriumi paraméterek (pl.: HbA_{1c}, koleszterinek, gasztrin, vérkép, ATPO) változásai között?

Fenti kérdéseink megválaszolása segíthet annak megítélésében, hogy 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegekben a szérum Chromogranin-A koncentráció vizsgálatát be kell-e építeni a betegek vizsgálati protokolljába..

2. Vizsgálati módszerek és beteganyag [4]

2.1. Beteganyag

A Chromogranin-A-val kapcsolatos utókövetéses szűrővizsgálatainkba összesen 79, 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő személy vett részt, ebből 13 beteg latens felnőttkori autoimmun diabeteses (LADA). A betegek átlagéletkora 35.0 ± 10.97 év (átlag \pm szórás) volt. A vizsgált személyeket szérum Chromogranin-A szintjeik alapján két csoportba osztottuk. A normál tartományon belüli szérum CgA szinttel rendelkező betegek életkora 34.8 ± 11.41 év, míg a normál tartományon kívüli, emelkedett CgA szinttel (>98.1 ng/ml) rendelkező betegek életkora 35.4 ± 9.37 év volt.

Mivel a savszekréció-gátlás (pl. protonpumpa-gátlóval történő gyógyszeres kezelés) emeli a szérum CgA szintet másodlagos hypergastrinaemia és a gyomor enterochromoffin-szerű sejtjeinek serkentése által [23], a vizsgálatban részt vevő személyek ez irányú kezelését ideiglenesen leállítottuk, a vérvétel napja előtti egy hétben a betegek nem szedtek semmilyen savcsökkentő gyógyszert.

A Chromogranin-A koncentrációkat a vese károsodásai befolyásolják [63, 64], a betegek ez irányú vizsgálata minden esetben megtörtént, és a vesebeteg személyek adatait nem használtuk fel munkánk során.

2.2 Mintavétel

A vizsgálatban résztvevő személyeknél írásbeli hozzájárulásukat követően éhgyomri vérvétel történt. A vérminták egy részéből, a vizsgálat szempontjából fontosabb laboratóriumi paraméterek meghatározása (vérkép, HbA_{1C}, se glukóz, koleszterin, HDL, LDL, triglicerid, kreatinin, húgysav, gasztrin, ATPO) az Egyetem Központi-, és az Endokrin laboratóriumában történt. A minták másik részét pedig az általunk elvégzett mérésekhez a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Anyagcsere laboratóriumában dolgoztuk fel.

A résztvevő betegektől részletes anamnézist vettünk fel, rendszeresen szedett gyógyszereikről, életmódjukról, étkezési szokásaikról kérdeztük ki őket. Az alapvető fizikális paramétereik – pl. testsúly, testmagasság, vérnyomás – meghatározása is történt.

A Chromogranin-A szintek meghatározásához a levett natív véreket 4°C-on 3000rpm-el centrifugáltuk, a szérumot Eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd mérésig a mintákat -20°C-on tároltuk.

Fenti vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Tudományos Etikai Bizottsága engedélyezte (SE TUKEB engedély szám: 21-8/1994).

2.3 Chromogranin-A meghatározása

A szérum Chromogranin-A szintek meghatározására a Cisbio Bioassays CGA-RIACT radioimmunoassay (RIA) kitjét használtuk. A CGA-RIACT egy szilárd fázisú „szendvics” immunradiometriás eljárás, melyhez két féle monoklonális ellenanyagot alkalmazunk. Az első a szilárd fázisra kötve található (bevonatos cső), ehhez kötődik először a CgA molekula, végül pedig a kialakult komplexhez kapcsolódik hozzá a második antigén (125-ös jódtól izotóppal radioaktívan jelzett molekula; nyomjelző). A kialakulást követően, ha nincs megfelelő mennyiségű CgA molekula a mintában, a nyomjelző könnyen kimosható a rendszerből.

A kitben található antigénnel bevont csövekbe először 500µl puffer oldatot, majd az előkészített szérum mintákból 50µl-t pipettáztunk. Minden vérmintából duplikátumot készítettünk. A mintákat vortexelést és 18-20 órán át, szobahőmérsékleten (18-25°C) tartó

inkubációt követően többször átmostuk. Ezután minden egyes mintához 500 μ l 125 I-al jelölt nyomjelző oldatot adtunk. A nyomjelző hozzáadása után egy 120 ± 5 percig tartó inkubáció következett, melyet folyamatos, 400rpm-es rázás mellett végeztünk. Az előkészített minták által kibocsátott maradék gammasugárzást gamma-szcintillációs számlálóval, RIA-mat 280 automatizált RIA készülékkel detektáltuk.

A kibocsátott sugárzásból számolt eredmények meghatározásához a kitben található kalibrátor mintákból kapott standard görbét használtuk. Az adatok kiértékeléskor az egyes mintapárok átlagát használtuk.

2.4 Rutin- és immunlaboratóriumi paraméterek meghatározása

A Semmelweis Egyetem központi laboratóriumában határozták meg a vérkép, az éhomi vércukor, a HbA₁C, a koleszterin, a HDL, az LDL, a triglicerid, a kreatinin, a magas szenzitivitású C reaktív protein, a pajzsmirigy hormon, és a pajzsmirigy-ellenes antitestek (ATPO) értékeit.

A gasztrin értékeket pedig a Semmelweis Egyetem Endokrin laboratóriumában határozták meg.

2.5 A számított glomerulus filtrációs ráta (eGFR) kiszámítása

A vese állapotának (vesefunkció) a legjobb jelzője a glomerulus filtrációs ráta (GFR). A GFR meghatározása a legpontosabban izotópos clearance vizsgálatokkal végezhető el, illetve használnak még egy módszert is, a 24 órás vizeletgyűjtésből számított clearance számítást. A vizeletgyűjtés nehézkesen végezhető. Fentiek miatt javasolta 2005-ben a Magyar Nephrologiai Társaság a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társasággal közösen kidolgozott ajánlásukban [67], hogy a GFR értékek képletekkel történő számítását. 2006-tól felnőttekre a módosított 4v MDRD („175-ös”) formula javasolt:

$$eGFR_{Férfi} = 175 * (0.0113 * Kreatinin)^{-1.154} * Kor^{-0.203}$$

$$eGFR_{Nő} = 175 * (0.0113 * Kreatinin)^{-1.154} * Kor^{-0.203} * 0.742$$

Fekete rasszba tartozó páciens esetén a fenti eGFR értéket még 1.21-el szorozzuk [68].

2.6 Statisztikai elemzések

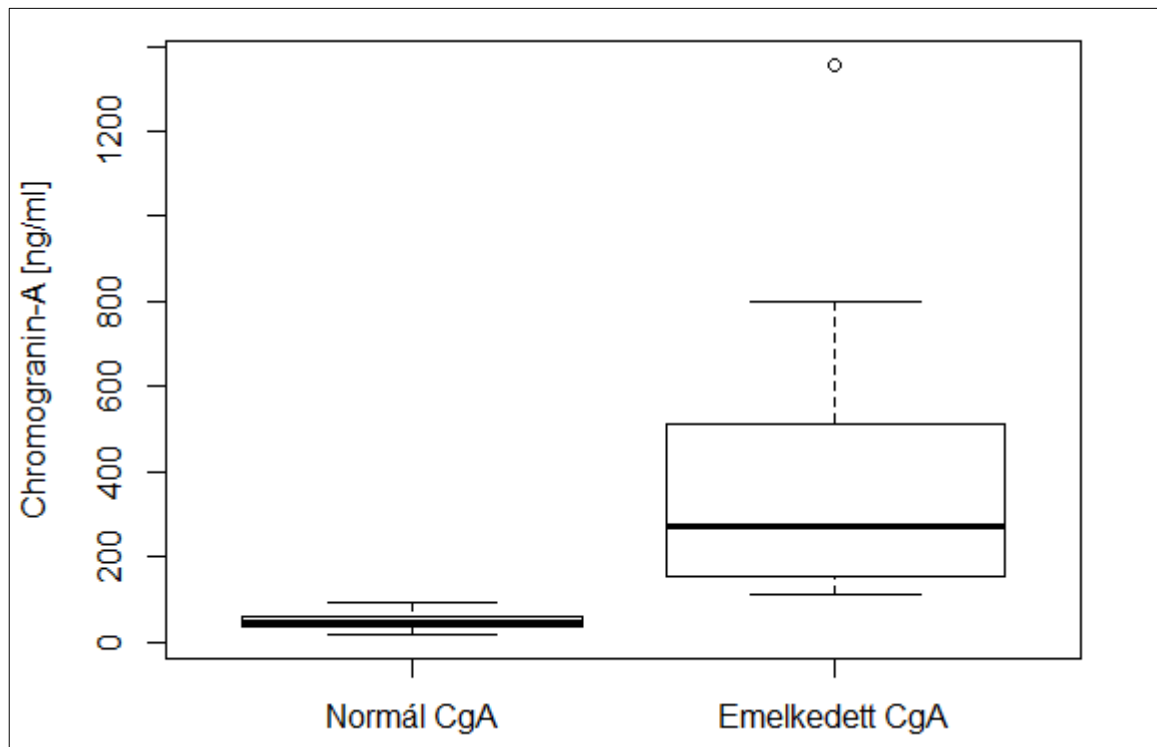
Statisztikai elemzéseinket az R for Windows version 3.2.3 [69] és az RStudio version 0.99.891 [70] programmal végeztük. Az adatok elemzéséhez felhasználtunk mind parametrikus és nem parametrikus elemzéseket is. Az adatok értékeléséhez felhasználtunk

Wilcoxon-Mann-Whitney-féle U-tesztet, Wilcoxon-féle előjeles rang próbát, Spearman-korrelációs elemzéseket, illetve Yates-korrekciónal alkalmazott χ^2 -teszteket. A kapott p-értékek korrekcióját Holm módszerrel végeztük el [71-73].

A Chromogranin-A szintek időben történő modellezéséhez random konstans lineáris kevert modellt (random intercept linear mixed effect model) alkalmaztunk, melyekhez az nlme R-csomagot használtuk [74]. A kevert modellek segítségével a vizsgált célváltozót nem csak a megfigyelt paraméterek (fix hatások) függvényében tudjuk elemezni, hanem ún. random hatás(oka)t is alkalmazunk az elemzések során. A random hatások mindig csak az egyes megfigyelési egységekre vonatkoznak, és elsősorban a fix hatások pontosabb becslése miatt kerülnek bele a modellbe. Általában egy 0 várható értékű normális eloszlású végtelen méretű populációnak tekinthetők, és magát a hatást a vizsgált paraméterhez tartozó adatokból kapott szórással jellemezzük [75].

3. Eredmények

Követéses vizsgálatunkba 79, 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő beteg vett részt. A betegeket a kiindulási vérvételkor szérumban Chromogranin-A szintjeik alapján két csoportba soroltuk. A normál tartományon belüli szérumban CgA szinttel rendelkező betegek csoportjába 63, míg a normál tartományhoz képest emelkedett CgA szinttel (>98.1 ng/ml) rendelkező betegek csoportjába 16 beteg került besorolásra (5. ábra). A betegek csoportosítását az ismételt vérvételkor nem módosítottuk, minden beteg ugyanabban a kiinduláskori csoportjában maradt a vizsgálat végéig.



5. ábra: Szérumban Chromogranin-A koncentrációk a két vizsgált csoportban, a kiindulási vérvételkor ($p < 0.001$).

3.1 A vizsgált paraméterek és összefüggéseik a kiindulási vérvételkor

A vizsgálatban részt vevő mindkét csoportban vizsgáltuk a Chromogranin-A, a gasztrin, a rutin laboratóriumi paramétereket (vércép, HbA1C, koleszterinek, magas szenzitivitású C reaktív protein), az autoimmun pajzsmirigybetegségekre utaló ATPO, valamint a kor és a diabetesz fennállási idejét, illetve a paraméterek között az összefüggéseket.

A vizsgálatban résztvevő betegek laboratóriumi, és egyéb paramétereit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

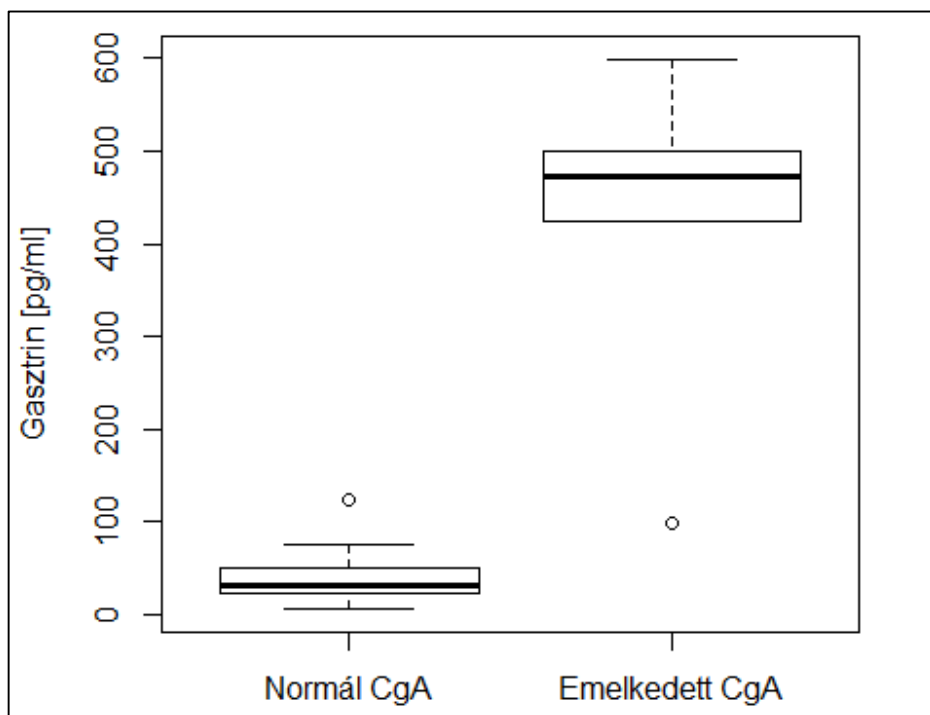
2. táblázat: A vizsgált csoportok laboratóriumi és egyéb paramétereit a kiindulási időpontban (átlag ± szórás)

<i>Paraméter</i>	<i>Normál CgA csoport</i>	<i>Emelkedett CgA csoport</i>
<i>Chromogranin [ng/ml]</i>	49.2 ± 18.35	385.2 ± 329.55
<i>Kor [év]</i>	34.8 ± 11.41	35.4 ± 9.37
<i>Diabétesz fennállási ideje [év]</i>	12.6 ± 10.05	17.0 ± 7.41
<i>Gasztrin [pg/ml]</i>	42.2 ± 30.68	419.1 ± 189.90
<i>Tiroidea-stimuláló hormon (TSH) [mIU/l]</i>	2.7 ± 3.27	1.9 ± 1.98
<i>Trijód-tironin (T3) [pmol/l]</i>	4.7 ± 0.79	3.2 ± 1.25
<i>Tiroxin (T4) [pmol/l]</i>	13.7 ± 2.02	13.7 ± 1.76
<i>Vörösvértest [Tera/l]</i>	5.0 ± 0.58	4.6 ± 0.49
<i>Fehérvérsejt [Giga/l]</i>	7.3 ± 1.99	8.0 ± 2.20
<i>HbA_{1C} [%]</i>	7.8 ± 1.84	10.0 ± 2.18
<i>Koleszterin [mmol/l]</i>	5.1 ± 1.05	5.7 ± 1.54
<i>Kreatinin [μmol/l]</i>	75.4 ± 14.13	74.8 ± 25.41
<i>eGFR [ml/min/1.73m²]</i>	100.9 ± 21.53	97.6 ± 25.82
<i>ATPO [IU/ml]</i>	109.3 ± 178.07	173.7 ± 254.28
<i>BMI [kg/m²]</i>	24.7 ± 3.91	23.4 ± 3.02

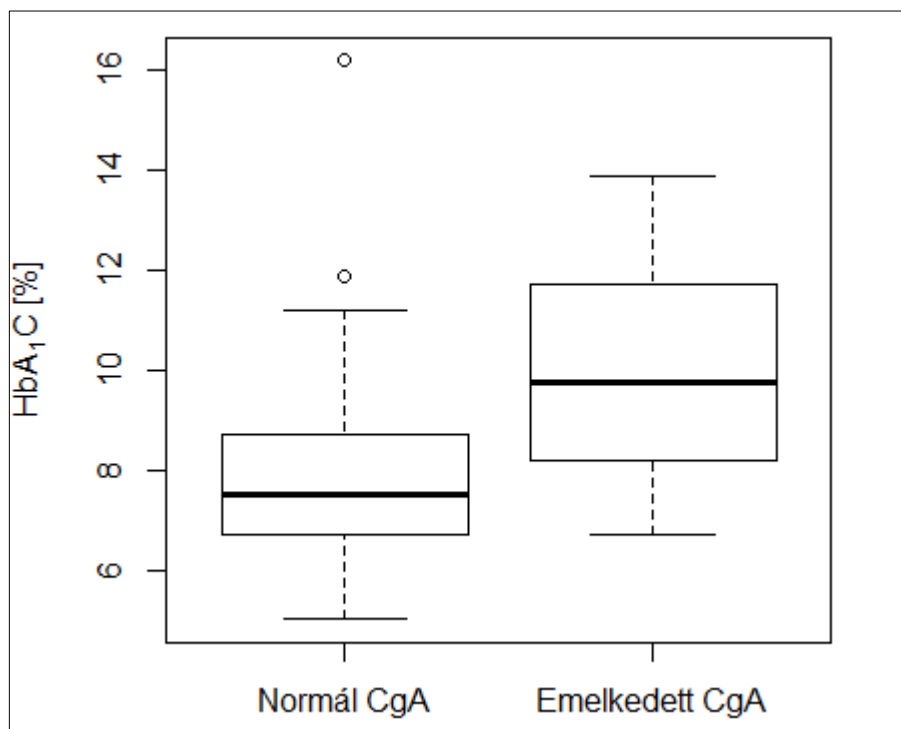
Az Emelkedett CgA csoportnál szignifikánsan magasabb szérumban Chromogranin-A koncentrációkat igazoltunk ($p < 0.001$) (6. ábra). Szintén statisztikailag magasabb értékeket kaptunk az Emelkedett CgA csoportban a diabétesz fennállási ideje ($p = 0.045$), a szérumban gasztrin ($p = 0.00934$) és a HbA_{1C} ($p = 0.00545$) koncentrációk esetében (6. és 7. ábra). Míg a trijód-tironin ($p = 0.00133$) és a vörösvértest ($p = 0.0162$) esetében szignifikánsan alacsonyabb értékeket figyeltünk meg az Emelkedett CgA csoportban (8. ábra).

A laboratóriumi paraméterek mellett felmértük a betegeknél a diabéteszhez társuló autoimmun és nem-autoimmun betegségek előfordulását. A két csoportban az előfordulási gyakoriságokat Yates-korrektcióval alkalmazott χ^2 -tesztekkel hasonlítottuk össze. A Normál CgA csoportban szignifikánsan több esetben fordul elő (Normál CgA csoport: 12 eset, Emelkedett CgA csoport: 1 eset) latens felnőttkori autoimmun diabetes (LADA). Az Emelkedett CgA csoportban szignifikánsan több esetben társult az alapbetegséghez anaemia

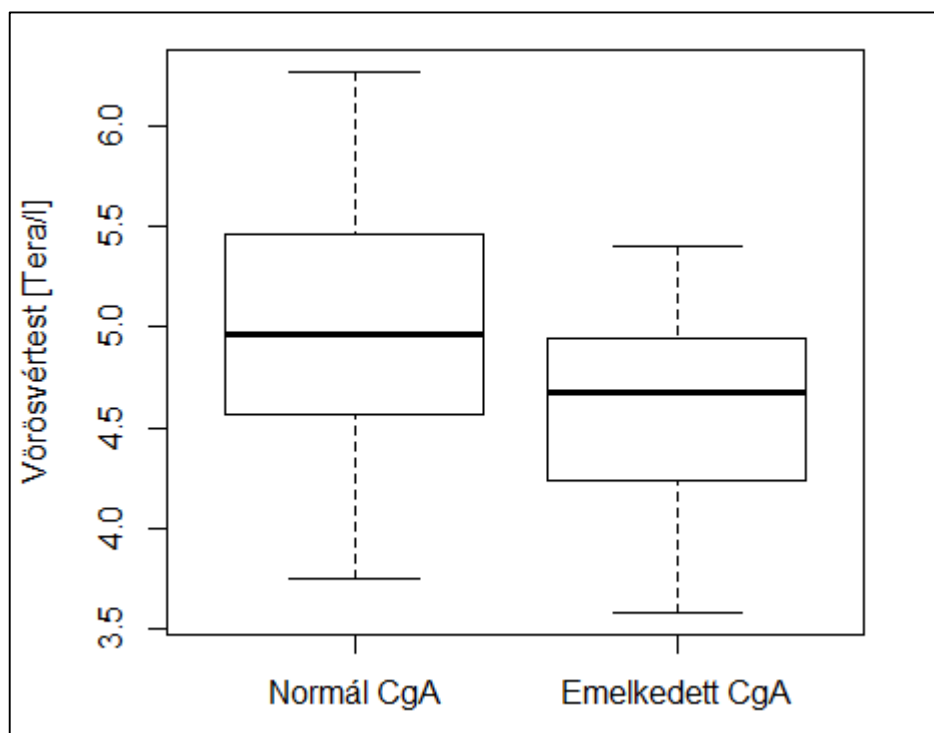
perniciosa, illetve nagyobb számban figyeltünk meg hypertóniát ezeknél a betegeknél, de ennek az eredménye csak marginálisan volt szignifikáns (3. táblázat).



6. ábra: Szérum gasztrin koncentrációk a Normál és az Emelkedett CgA vizsgálati csoportokban, a kiindulási időpontban.



7. ábra: HbA₁C szintek a Normál és az Emelkedett CgA vizsgálati csoportokban a kiindulási időpontban.



8. ábra: Vörösvértest koncentrációk a Normál és az Emelkedett CgA vizsgálati csoportokban, a kiindulási időpontban.

3. táblázat: A vizsgált betegeknél előforduló társbetegségek százalékos előfordulási arányai a kiindulási időpontban

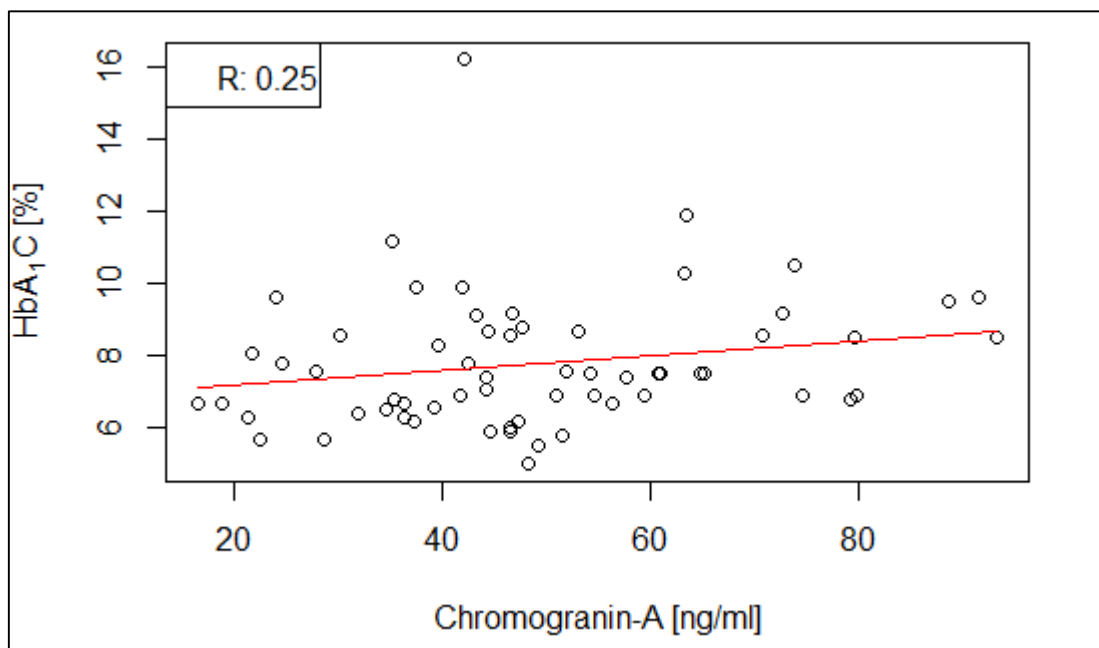
<i>Társbetegség</i>	<i>Normál CgA csoport</i>		<i>Emelkedett CgA csoport</i>		<i>P-érték</i>
	<i>Nincs</i>	<i>Van</i>	<i>Nincs</i>	<i>Van</i>	
<i>LADA</i>	81%	19%	94%	6%	p=0.0103
<i>Hypertonia</i>	63%	37%	50%	50%	p=0.08697
<i>Autoimmun megbetegedés</i>	75%	25%	75%	25%	p=1
<i>Vitiligo</i>	94%	6%	94%	6%	p=1
<i>Alopecia</i>	95%	5%	94%	6%	p=1
<i>Anaemia perniciososa</i>	95%	5%	81%	19%	p=0.004673
<i>Pajzsmirigybetegség</i>	75%	25%	69%	31%	p=0.431

3.1.1 A Normál CgA csoport paramétereinek összefüggései a kiindulási időpontban

A meghatározott szérumszintű Chromogranin-A koncentrációk alapján 63 beteget soroltunk be a Normál CgA csoportba. A csoport szérumszintű CgA koncentrációja 49.2 ± 18.35 ng/ml volt (átlag

± szórás). A betegek további vizsgált laboratóriumi és egyéb paramétereit részletesen a 2. táblázatban korábban ismertettük.

A csoporton belül elemeztük a vizsgált paraméterek közötti összefüggéseket is. Emelkedő Chromogranin-A szintek mellett növekvő HbA_{1c} értékeket figyeltünk meg (R: +0.25, p=0.0497) (9. ábra).



9. ábra: A Chromogranin-A és a HbA_{1c} koncentrációk összefüggése a Normál CgA csoportban, a kiindulási időpontban.

Korábbi publikációkból ismeretes, hogy a keringő magas szenzitivitású C reaktív protein (hsCRP) és a testzsír mérőszámai – mint amilyen pl. a testtömegindex (BMI) is – között szoros összefüggés figyelhető meg [76]. A Normál CgA csoportban ezt a megfigyelést mi is igazolni tudtuk, a hsCRP szintek emelkedésével növekedtek a BMI értékek (R: 0.46, p=0.012).

3.1.2. Az Emelkedett CgA csoport paramétereinek összefüggései a kiindulási időpontban

A szérum Chromogranin-A szintek alapján az Emelkedett CgA csoportba 16 beteget soroltunk be. A csoport Chromogranin-A koncentrációja $385,2 \pm 329,55$ ng/ml volt. A betegek további, a vizsgálat során megfigyelt laboratóriumi és egyéb paramétereit az 1. táblázat (26. oldal) tartalmazza.

A Normál CgA csoporthoz hasonlóan az Emelkedett CgA csoportnál is megvizsgáltuk a paraméterek között fennálló korrelációkat. Az irodalomból már jól ismert összefüggések kivételével, a Chromogranin-A koncentrációkkal, vagy a vizsgálat szempontjából fontos

paraméterekkel – mint pl. a gyomorkarcinómákban szintén jelentős szerepet játszó gasztrin – kapcsolatos új korrelációs összefüggéseket ebben a csoportban nem tudunk igazolni.

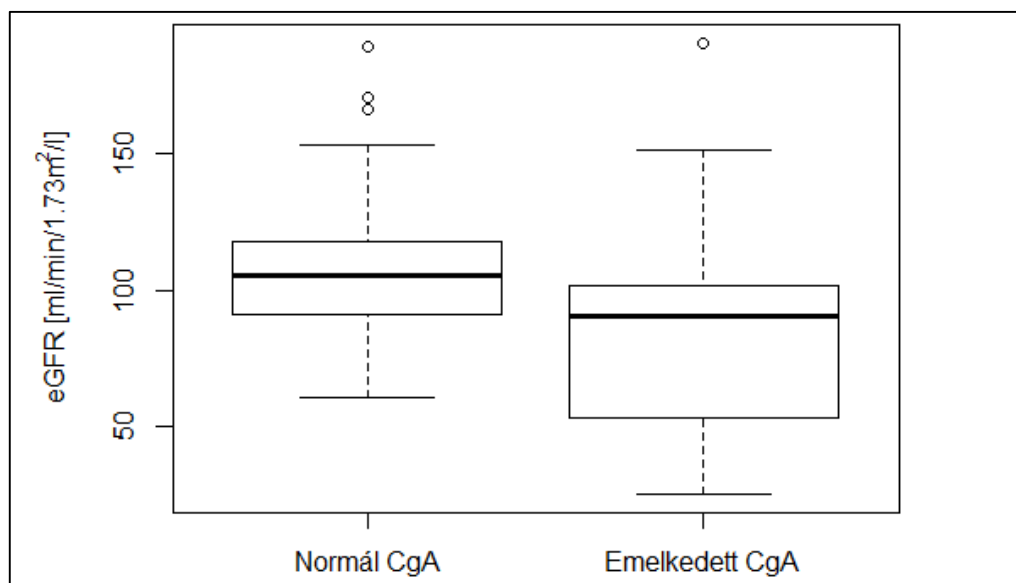
3.2 A vizsgált paraméterek és összefüggéseik az ismételt vérvételt követően

A vizsgálatban részt vevő személyeket átlagosan kb. 3 év elteltével visszahívtuk az előző eredmények követése céljából. Az eltelt idő 3.5 ± 1.68 év volt mind a 79 beteg esetében. Az egyes csoportokban külön-külön vizsgálva az eltelt időt, a Normál CgA csoportban 3.7 ± 1.67 , míg az ez Emelkedett CgA csoportban 2.6 ± 1.54 év telt el a két vérvétel között. Az első vérvételhez hasonlóan mindkét csoportban vizsgáltuk az egyes paramétereket a csoportok között, illetve a paraméterek között fennálló összefüggéseket.

A második vérvételen megjelent betegek laboratóriumi, és egyéb paramétereit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

A csoportok közötti, a kiindulási állapotban fennálló különbségeket a visszaméréskor a trijód-tironin kivételével – melyet a betegeknél alkalmazott megfelelő pajzsmirigy-kezeléssel magyarázunk – ismét igazolni tudtuk mind a Chromogranin-A ($p < 0.001$), a diabétesz fennállási ideje ($p = 0.044$), a gasztrin ($p = 0.00895$), a vörösvértest ($p = 0.0124$) és a HbA1C ($p = 0.0063$) esetében is.

A fentiek mellett a körül-belül 3.5 év elteltét követően, a második vérvételkor szignifikánsan alacsonyabb, de még normál tartományon belüli számított glomerulus filtrációs rátát ($p = 0.021$) igazoltunk az Emelkedett CgA csoportban (**10. ábra**).



10. ábra: Számított glomerulus filtrációs ráta (eGFR) a két vizsgált csoportban, a második időpontban történt vérvételkor.

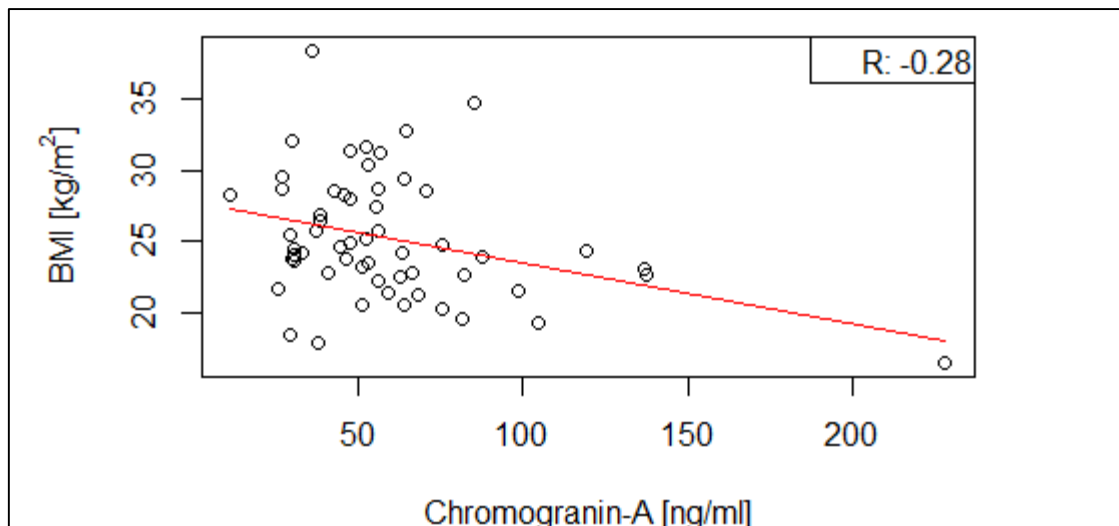
4. táblázat: A vizsgált csoportok laboratóriumi és egyéb paramétereit a második vérvétel során (átlag \pm szórás)

<i>Paraméter</i>	<i>Normál CgA csoport</i>	<i>Emelkedett CgA csoport</i>
<i>Chromogranin [ng/ml]</i>	59.9 \pm 33.32	509.2 \pm 632.05
<i>Gasztrin [pg/ml]</i>	35.5 \pm 20.92	348.1 \pm 353.55
<i>Tiroidea-stimuláló hormon (TSH) [mIU/l]</i>	2.0 \pm 2.00	1.5 \pm 0.98
<i>Trijód-tironin (T3) [pmol/l]</i>	4.3 \pm 0.57	4.0 \pm 0.57
<i>Tiroxin (T4) [pmol/l]</i>	12.8 \pm 2.22	15.8 \pm 0.98
<i>Vörösvértest [Tera/l]</i>	4.9 \pm 0.46	4.6 \pm 0.34
<i>Fehérvérsejt [Giga/l]</i>	7.0 \pm 2.17	7.9 \pm 2.62
<i>HbA_{1C} [%]</i>	7.8 \pm 1.50	9.1 \pm 1.62
<i>Koleszterin [mmol/l]</i>	5.2 \pm 1.13	5.3 \pm 1.29
<i>Kreatinin [μmol/l]</i>	72.3 \pm 14.01	94.4 \pm 54.08
<i>eGFR [ml/min/1.73m²]</i>	106.4 \pm 25.58	88.0 \pm 42.82
<i>ATPO [IU/ml]</i>	90.5 \pm 158.73	136.9 \pm 199.46
<i>BMI [kg/m²]</i>	25.2 \pm 4.34	23.4 \pm 3.12

A laboratóriumi paraméterek mellett érdekelt minket az is, hogy az eltelt idő során kialakult-e a betegeknél újabb, a diabéteszhez társuló autoimmun és/vagy nem-autoimmun betegség. A két csoport közül egyedül a Normál CgA csoportban tudtunk igazolni újonnan kialakult társbetegség(ek)et. Újabb társuló autoimmun eredetű pajzsmirigy megbetegedés 1 esetben, magas vérnyomás-betegség pedig 4 esetben alakult ki a vizsgált személyeknél. Az esetszámokban történt változások egyik esetben sem eredményeztek statisztikailag szignifikáns eltérést.

3.2.1 A csoportok paramétereinek összefüggései az ismételt vérvételt követően

A csoportok összehasonlításai mellett ismét megvizsgáltuk a paraméterek korrelációs összefüggéseit. A kiindulási állapothoz képest a Normál CgA csoportban az emelkedő Chromogranin-A koncentrációkhoz csökkenő BMI értékeket igazoltunk (R: -0.28, p=0.035) **(11. ábra)**.



11. ábra: A szérumban Chromogranin-A koncentrációk és a BMI értékek összefüggése a Normál CgA csoportban, a második vérvétel időpontjában.

Az Emelkedett CgA csoportban, a kiindulási vérvételhez képest újabb összefüggéseket nem találtunk a visszahívásokat követően.

3.3 A két vérvételi időpont között történt változások kiértékelése

Párosított statisztikai próbákkal elvégeztük a két vérvételi időpont között történt változások elemzését. Az így kapott változások segíthetnek megállapítani, hogy az adott csoportban a betegek anyagcsere állapota, illetve az alkalmazott kezelés mennyire hatékony.

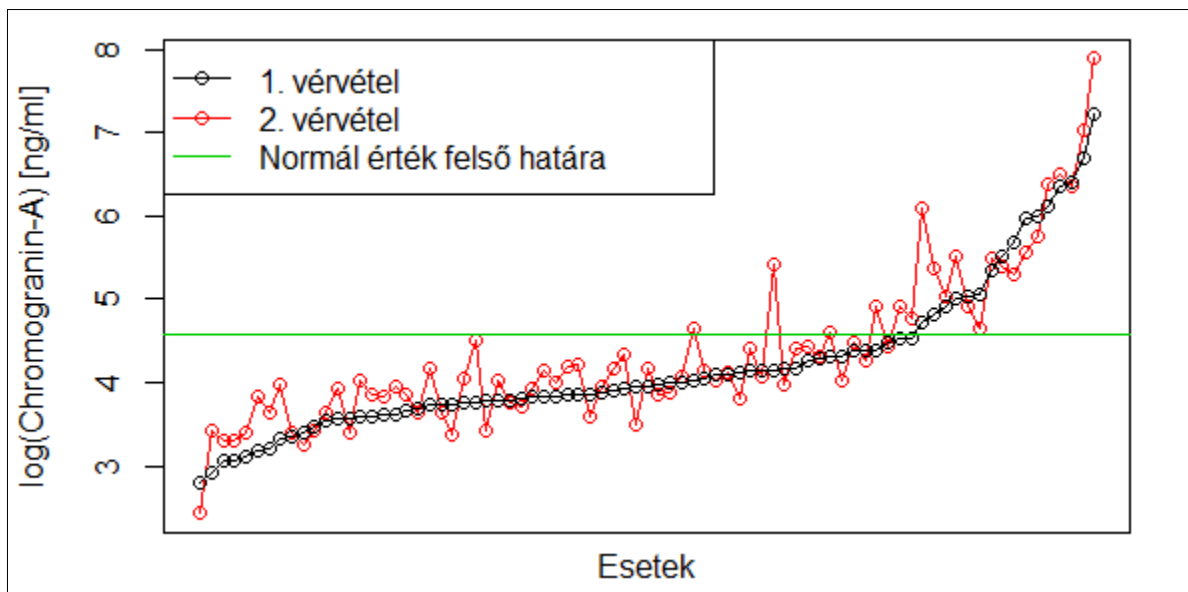
A szérumban Chromogranin-A szintek változásait megvizsgáltuk az összes betegben, és a két időpont között szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk a második időpontban ($p=0.024$) (12. ábra).

3.3.1 A Normál CgA csoport változásai

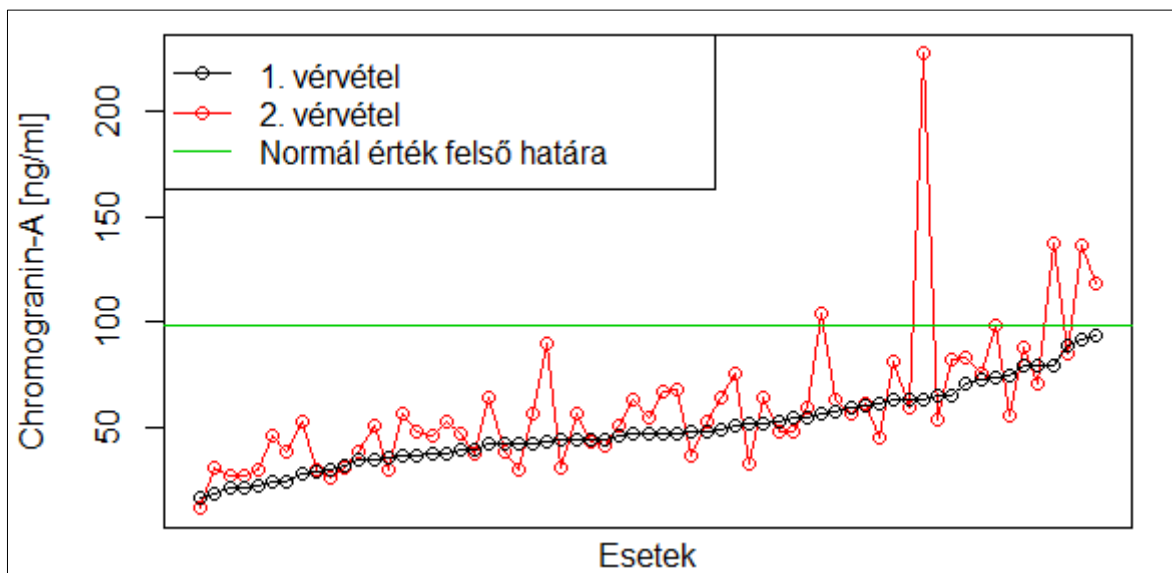
A Normál CgA csoportnál a két vérvétel között az összes betegnél kapott eredményhez hasonlóan szignifikánsan magasabb Chromogranin-A értékeket mértünk a 2. vérvételkor (1. vérvétel: 49.2 ± 18.35 , 2. vérvétel: 59.9 ± 33.32 , $p=0.0035$). A Normál CgA csoportban 6 betegnél a szérumban CgA szintek a második mintavételkor meghaladták a laboratóriumi normáltartomány felső határát (13. ábra).

A betegek vizsgált paramétereiben emelkedő értékeket figyeltünk meg a második vérvételkor a magas szenzitivitású C reaktív protein koncentrációk (1. vérvétel: 1.9 ± 2.85 , 2. vérvétel: 3.5 ± 5.87 , $p=0.020$) és a BMI értékek (1. vérvétel: 24.7 ± 2.91 , 2. vérvétel: 25.2

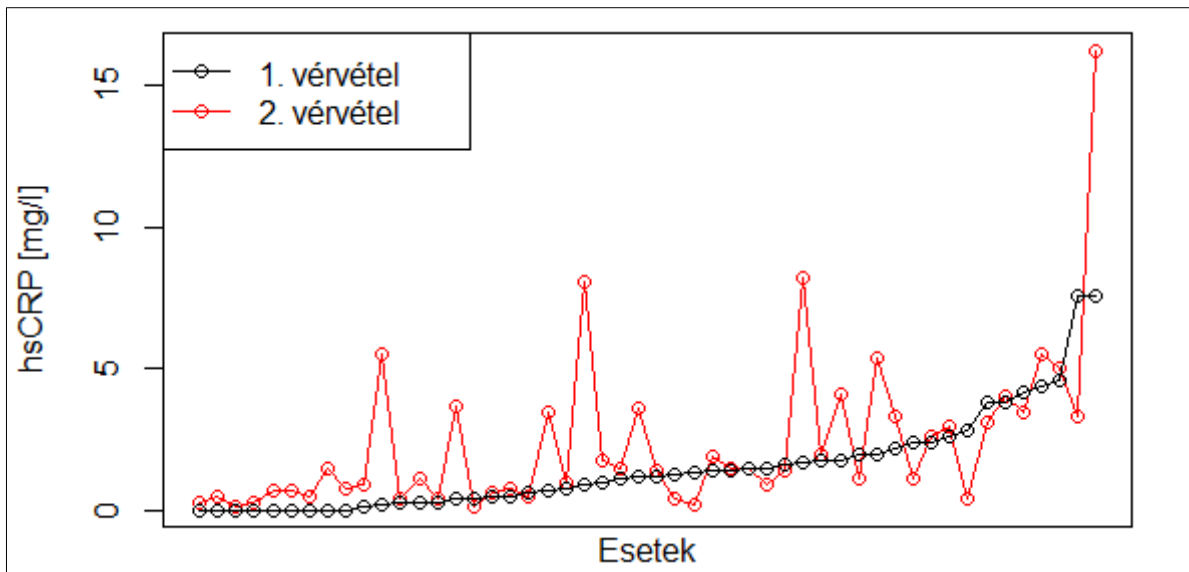
± 4.34 , $p=0.032$) esetén. A kreatinin koncentrációk (1. vérévétel: 75.4 ± 14.13 , 2. vérévétel: 72.3 ± 14.01 , $p=0.012$) esetén pedig csökkenő tendenciát figyeltünk meg a laboratóriumi értékek vizsgálatakor (**14. és 15. ábra**).



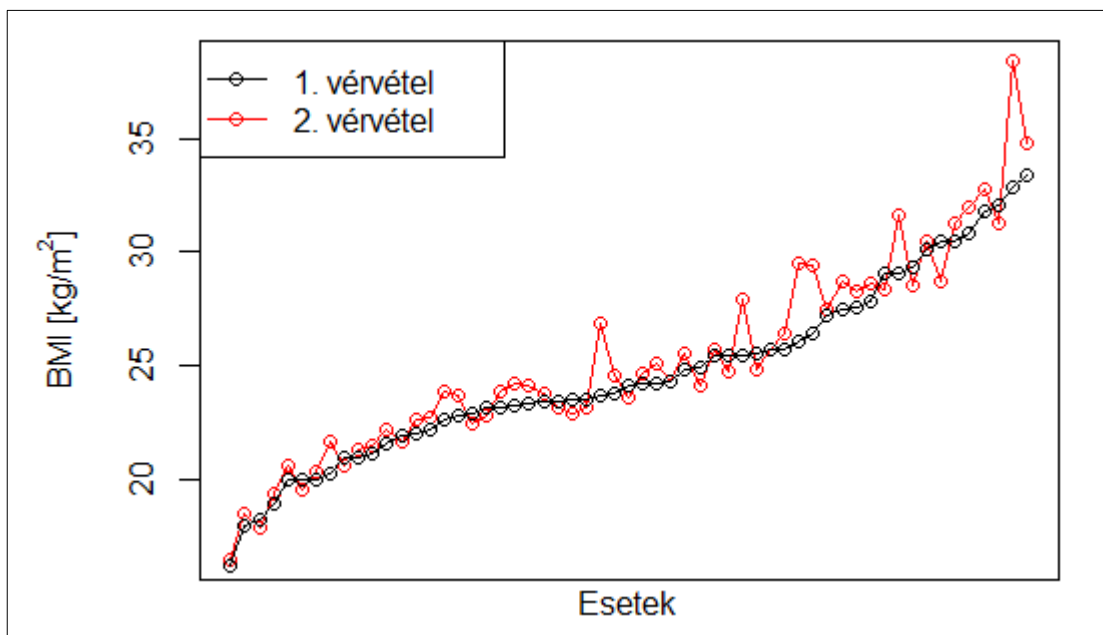
12. ábra: Szérum Chromogranin-A koncentrációk változása az összes beteg vizsgálva a két vérévételi időpont között. Az egyes esetek az első vérévételi időpont szerinti emelkedő sorrendben vannak ábrázolva. (Az ábrán a Chromogranin-A értékeket a jobb ábrázolhatóság végett logaritmikus skálára konvertáltuk át.)



13. ábra: Szérum Chromogranin-A koncentrációk változása a két vérévételi időpont között a Normál CgA csoportban ($p=0.0035$). Az egyes esetek az első vérévételi időpont szerinti emelkedő sorrendben vannak ábrázolva.



14. ábra: A vérben keringő magas szenzitivitású C reaktív protein (hsCRP) koncentrációk változása a két vérvételi időpont között a Normál CgA csoportban. Az egyes esetek az első vérvételi időpont szerinti emelkedő sorrendben vannak ábrázolva.

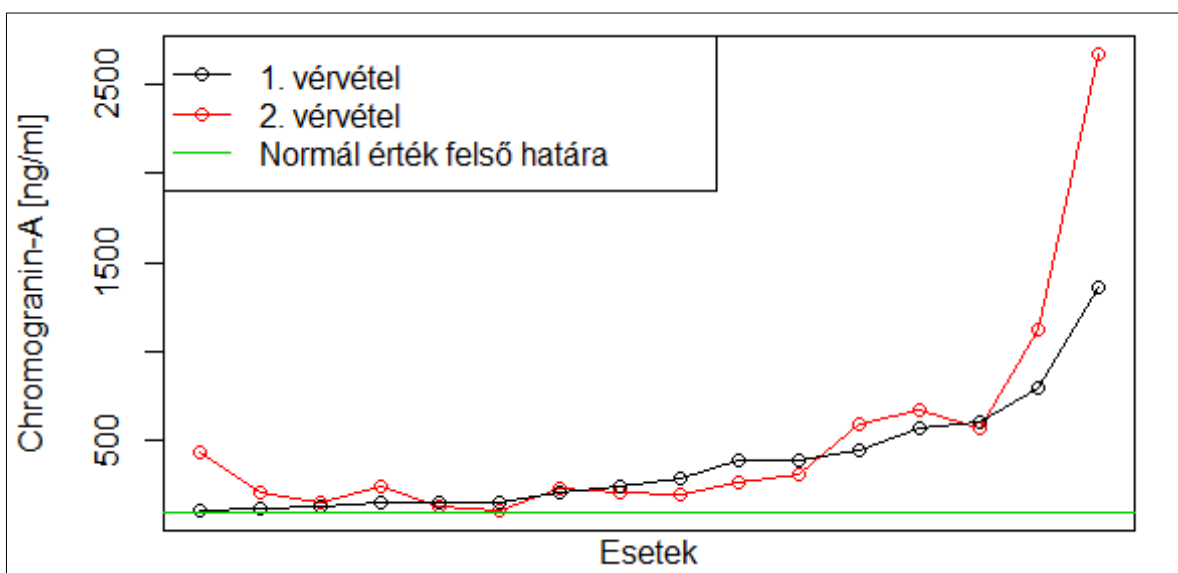


15. ábra: BMI értékek változása a két vérvételi időpont között a Normál CgA csoportban. Az egyes esetek az első vérvételi időpont szerinti emelkedő sorrendben vannak ábrázolva.

A kiindulási időponttól eltelt körül-belül 3.5 év alatt 4 betegnél alakult ki újonnan magasvérnyomás-betegség ($p=0.4268$), illetve 1 betegnél autoimmun eredetű pajzsmirigy megbetegedés ($p=0.8719$) alakult ki. A két időpont között az esetszám-változások statisztikailag mérhető eltérést nem okoztak a betegségek előfordulási gyakoriságában.

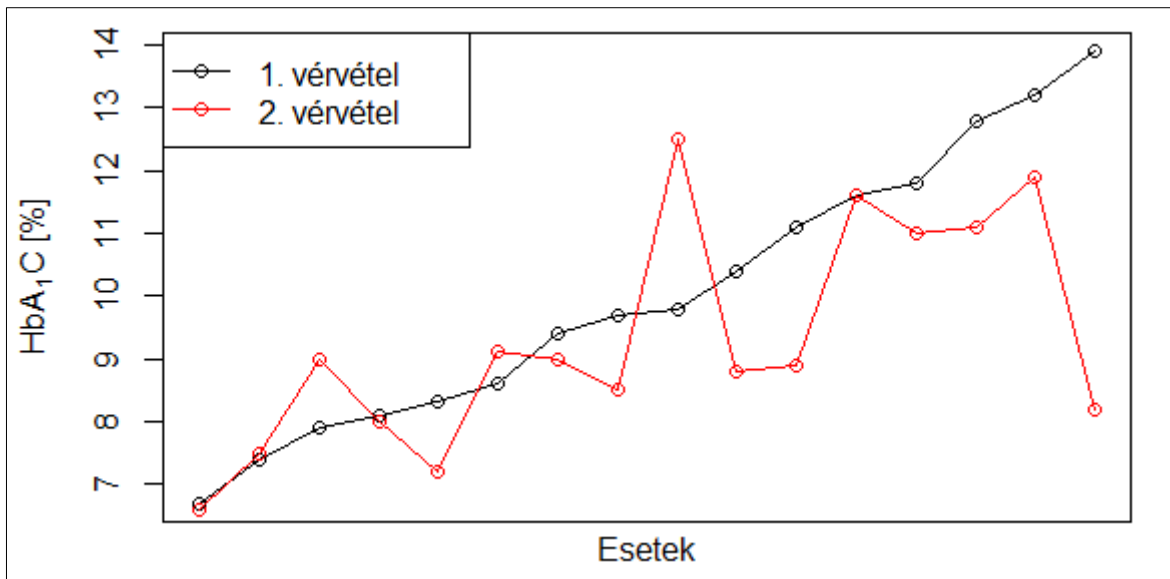
3.3.2 Az Emelkedett CgA csoport változásai

Habár az egyes betegek esetén a második vérvétel során nagyrészt magasabb szérumszintű Chromogranin-A koncentrációkat mértünk (1. vérvétel: 385.2 ± 329.55 , 2. vérvétel: 509.2 ± 632.05 , $p=0.21$), azok szignifikáns eltérést a kiindulási időponthoz képest nem mutattak (16. ábra).



16. ábra: A szérumszintű Chromogranin-A koncentrációk változása a két vérvételi időpont között az Emelkedett CgA csoportban. Az egyes esetek az első vérvételi időpont szerinti emelkedő sorrendben vannak ábrázolva.

A kiindulási állapotban a betegek átlagos vércukorszintje a vérvételt megelőző három hónapban, mely a HbA_{1c} értékekkel határozható meg a csoportban 10.0 ± 2.18 % volt. A második vérvételre a HbA_{1c} értékek 9.1 ± 1.62 %-ra csökkentek a szorosabb szénhidrátanyagcsere követésnek köszönhetően. ($p=0.016$) (17. ábra). Habár statisztikailag csökkenő tendencia figyelhető meg, a betegek továbbra is jobb anyagcsere helyzetűek maradtak.



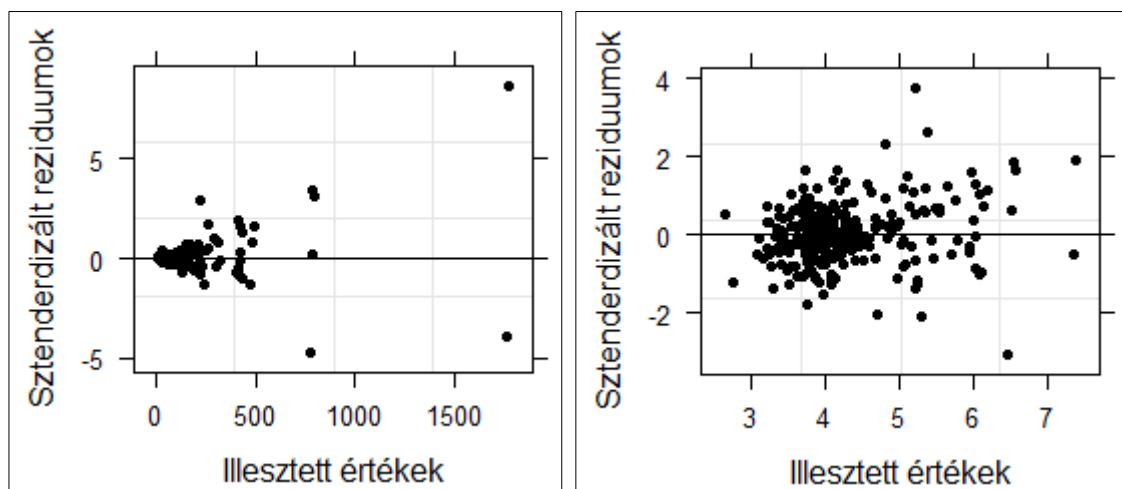
17. ábra: HbA₁C értékek változása a két vérvételi időpont között az Emelkedett CgA csoportban. Az egyes esetek az első vérvételi időpont szerinti emelkedő sorrendben vannak ábrázolva.

3.4 Statisztikai modell a Chromogranin-A változásainak becsléséhez

A szérum Chromogranin-A koncentrációk időben történő változásának becsléséhez egy random konstans kevert modellt (random intercept linear mixed effect model) alkalmaztunk. Az ilyen típusú modellek a random faktorok segítségével képesek a vizsgálati egységekre jellemző egyéni hatásokat / eltéréseket is figyelembe venni. A modellben alkalmazhatóak olyan minták is, amikhez csupán egyetlen egy mérési eredmény tartozik – nincs ismételt (vissza)mérés –, illetve képesek akár 2-nél több, ugyanazon vizsgálati egységhez tartozó esetet is kezelni.

A fenti tulajdonságokat kihasználva egy olyan modellt terveztünk meg, amiben a 79 utókövetéses beteg CgA adatai mellett felhasználtuk további 57, 1-es típusú cukorbeteg mérési adatait is, akik az első vérvételt követően az ismételt mérésre már eljőni nem tudtak. Továbbá kigyűjtöttük azokat a további Chromogranin-A mérési eredményeket is, amik a két tervezett vizsgálati időpont között történtek. Időközi mérés(ek) összesen 42 betegnél történt(ek), melyek célja az emelkedett, illetve a normál tartomány felső határához közel lévő Chromogranin-A koncentrációkkal rendelkező betegek szorosabb kontrollja volt. Összesen tehát 136 beteg, 291 darab Chromogranin-A mérési adatait tudtuk felhasználni a modellhez.

A végső modellben a Chromogranin-A értékek természetes alapú logaritmussal transzponált értékeit használtuk, mivel a modelldiagnosztikai elemzések során a modellben a CgA, mint célváltozó növekedésével jelentősen nőtt a modellben a reziduumok szórása (**18. ábra**).



18. ábra: A modelldiagnosztika reziduum-szórási ábrája az eredeti (bal oldalon), illetve a logaritmizált (jobb oldalon) értékekkel.

Az Chromogranin-A szintek becsléséhez függő változóként a két vérvétel között eltelt időt választottuk, random faktorként pedig az egyes betegeket (ID) jelöltük ki. A végső modell (1. egyenlet):

$$\log_n(\text{Chromogranin} - A) \sim \text{Eltelt idő}; \text{random} = \sim 1 | \text{Beteg_ID}$$

1. egyenlet: Az alkalmazott modell képlete

A modell lefuttatását követően az években mért eltelt idő ($\beta = 0.022778$, $p = 0.002627$) hatása szignifikánsnak bizonyult. Mivel a célváltozót logaritmussal transzformáltuk, a későbbi becslésekhez visszaskálázás szükséges, amit a fix hatás (2. egyenlet) mellett a random faktoron is végre kell hajtani. A random hatás szórása ± 0.7759801 volt, vissza-transzformáláskor ennek kell venni az e-alapú hatványát. A kapott értékek alapján a random hatás értelmezése a következő: a fix hatások szorozódnak minden beteg esetében egy, a betegtől függő, időben állandó, ún. random tényezővel, melynek értéke átlagosan 0.460 és 2.173 között volt (tehát kb. 46% és 217% között).

$$\text{Chromogranin} - A = e^{(\text{Intercept} + \beta * \text{Eltelt idő})}$$

$$\text{Chromogranin} - A = e^{4.15468} * e^{(0.022778 * \text{Eltelt idő})}$$

$$\text{Chromogranin} - A = 63.73157 * e^{(0.022778 * \text{Eltelt idő})}$$

2. egyenlet: A modell eredménye alapján a fix hatások visszatranszformálása a Chromogranin-A szintek becslésére

A 2. egyenletet felhasználva lehetőség nyílik a betegek szérum Chromogranin-A koncentrációinak jövőbeni becslésére is. Egységnyi idő-intervallummal (1 év) megnövelve az eltelt időt a Chromogranin-A koncentrációk várható értéke közelítőleg $100 * \beta$ -al változik meg (3. egyenlet). De a változásban még nagy szerepet játszanak a random faktorok is, amik további ingadozást (kb. 46 és 217 százalék között) visznek a becslésünkbe.

$$\text{Chromogranin} - A = 63.73157 * e^{\beta * (\text{Eltelt idő} + 1)}$$

$$\text{Chromogranin} - A = 63.73157 * e^{(\beta * \text{Eltelt idő})} * e^{\beta}$$

$$e^{\beta} \approx \frac{1 + \beta}{1 + \beta + \frac{\beta}{2!} + \frac{\beta}{3!} \dots}$$

3. képlet: Egységnyi időintervallummal (1 év) megnövelt CgA becslés

A szérum Chromogranin-A koncentrációk a fenti egyenletekkel, 1 év elteltével bekövetkező növekedése – időegységgel történő változása – a fix és random hatások együttes alkalmazásával 1.05 és 4.95 százalék közé becsülhető ($100 * \beta = 2.2778$, random hatások: 46% és 217%).

A modell ellenőrzésekor (modelldiagnosztika) a reziduumok szórása és a normálishez közelítő eloszlása teljesült, azonban a random hatások a normális eloszláshoz képest egy kisebb jobbra eltoltságot mutattak. A modell tulajdonságaiból adódóan a random hatásokról a fix hatások – jelen esetben az időhatás – le vannak választva, az eltoltságot egy másik, ismeretlen paraméter okozza. Az eltoltságot megpróbáltuk feloldani a mért paraméterek segítségével oly módon, hogy a random konstans (random intercept) helyett random meredekség (random slope) kevert modellt alkalmazunk, ahol slope hatásként először a diabétesz fennállási idejét, majd több labor paramétert is kipróbáltunk. Sajnos azonban a jobbra eltoltságot egyik paraméter sem tudta feloldani, emiatt ezeket a modelleket elvetettük (19. ábra).

3.4.1 A Chromogranin-A változásainak becslése a vizsgálati csoportokban

A teljes adatsorra alkalmazott modellt lefuttattuk a Chromogranin-A szerint felosztott csoportokban is. Mind a Normál CgA, mind az Emelkedett CgA csoportban is felhasználtuk a teljes adatsornál említett kiegészítő adatokat (a visszajönni nem tudó betegek, és a közbenső mérések eredményei).

A Normál CgA csoport esetén a modell szintén szignifikáns eredményt adott a vérvételek között eltelt idő függvényében ($\beta = 0.019429$, $p = 0.002567$). A random hatás szórása ± 0.3653511 volt, a random tényező értéke átlagosan 0.694 és 1.441 között volt (tehát kb. 69% és 144%). A csoportban a szérum Chromogranin-A koncentrációk 1 év elteltével bekövetkező növekedése a fix és random hatások együttes alkalmazásával 1.34 és 2.80 százalék közé becsülhető ($100 \cdot \beta = 1.943$, random hatások: 69% és 144%) (4. egyenlet).

$$\text{Chromogranin} - A (\text{Normál csoport}) = 46.20819 * e^{(0.019429 * \text{Eltelt idő})}$$

4. egyenlet: A fix hatások visszatranszformálása a Normál CgA csoportban

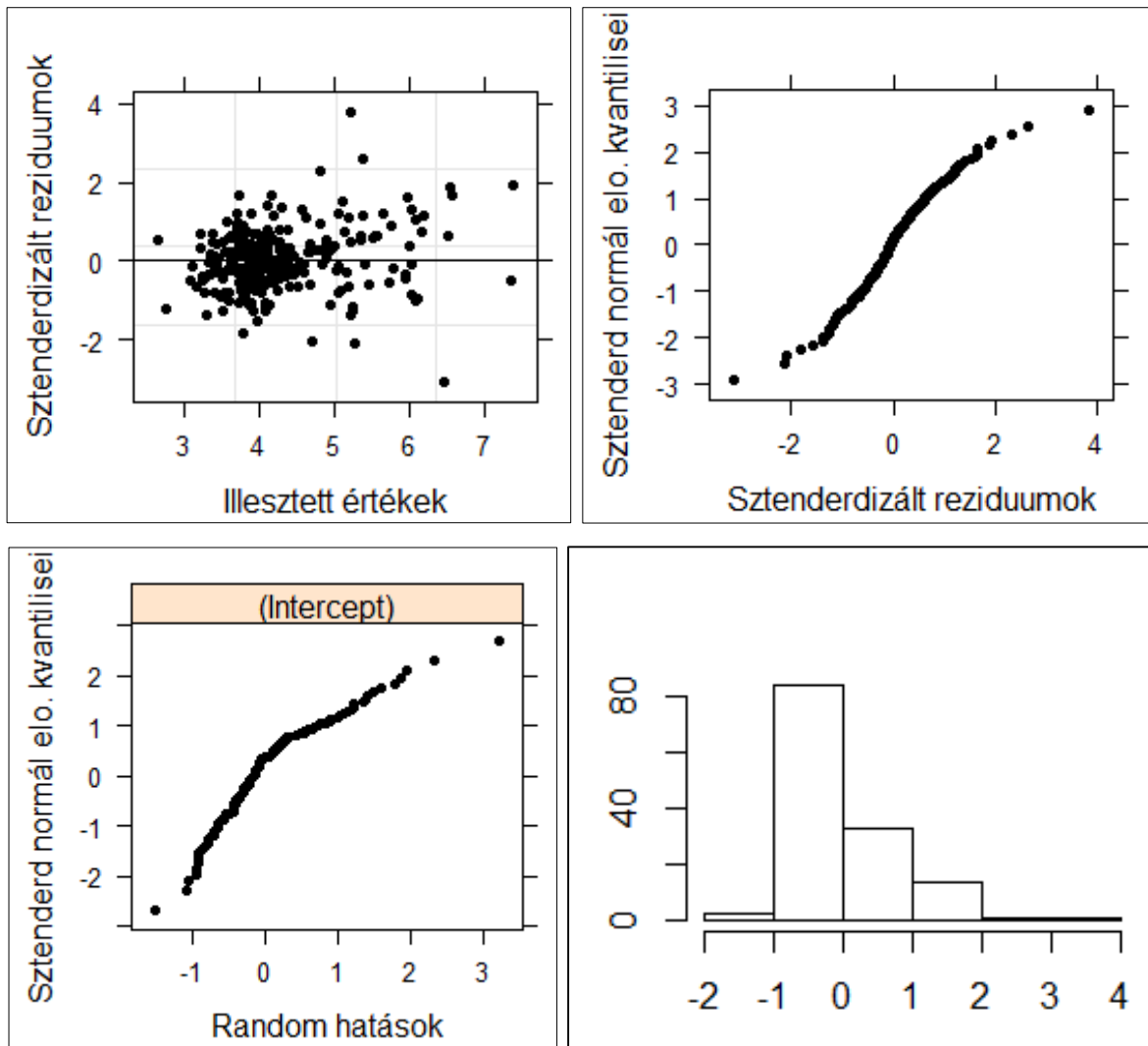
A modelldiagnosztikai ábrák esetén a reziduumok szórása és eloszlása megfelelő, azonban a random faktor eloszlása a korábban az összes adathál megfigyelhető jobbra eltoltságot nem mutatja (**20. ábra**).

Az Emelkedett CgA csoportnál a modell futtatása az előző két esettel szemben csupán marginálisan szignifikáns eredményt adott a vérvételek között eltelt idő függvényében ($\beta = 0.061963$, $p = 0.05707$). A random hatás szórása ± 0.5657458 volt, a random tényező értéke átlagosan 0.568 és 1.761 között volt (tehát kb. 57% és 176%). A csoportban a szérum Chromogranin-A koncentrációk egységnyi idő alatt történő növekedése a fix és random hatások együttes alkalmazásával 3.53 és 10.91 százalék közé becsülhető (5. egyenlet).

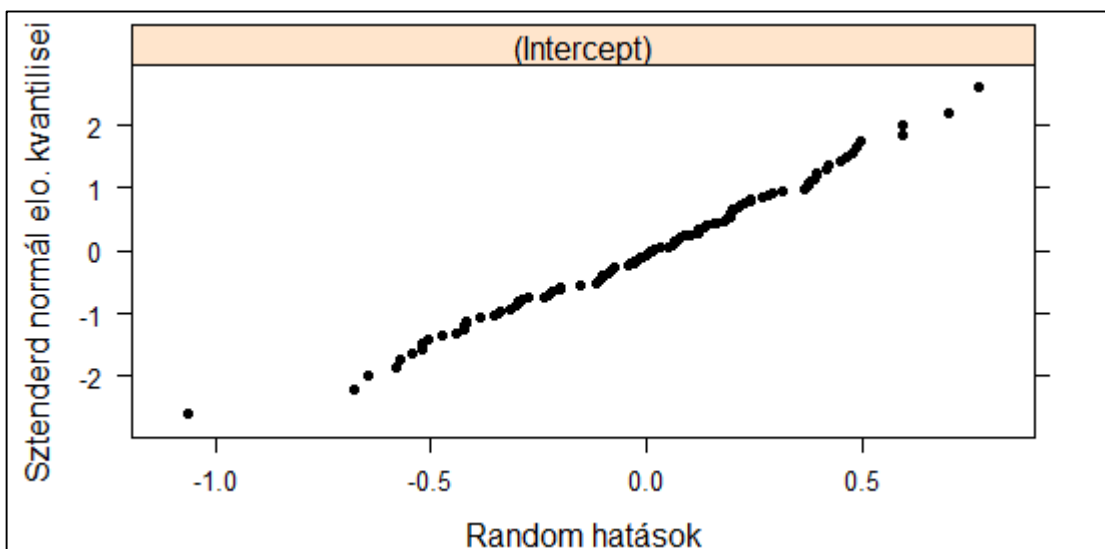
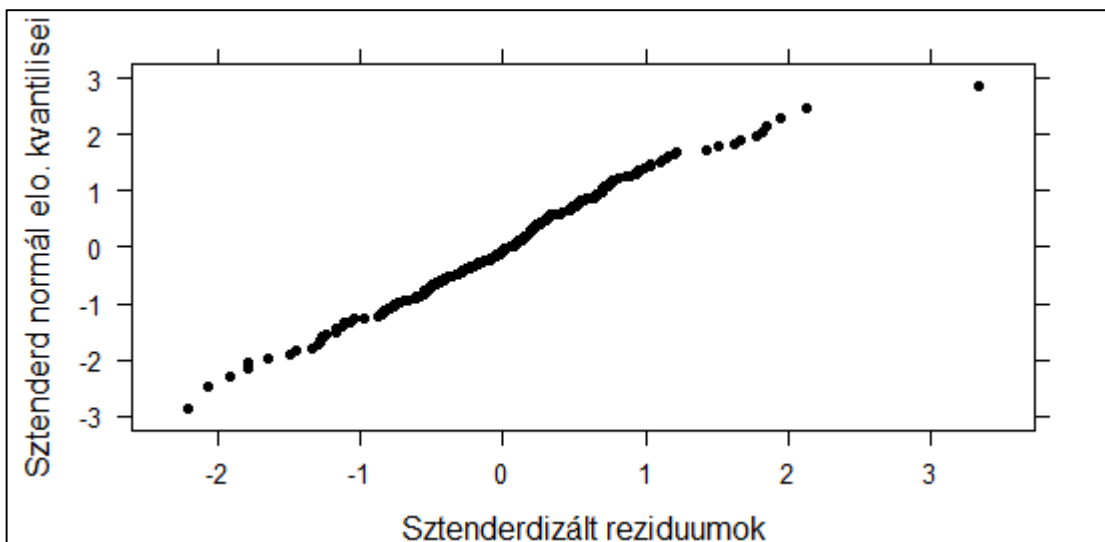
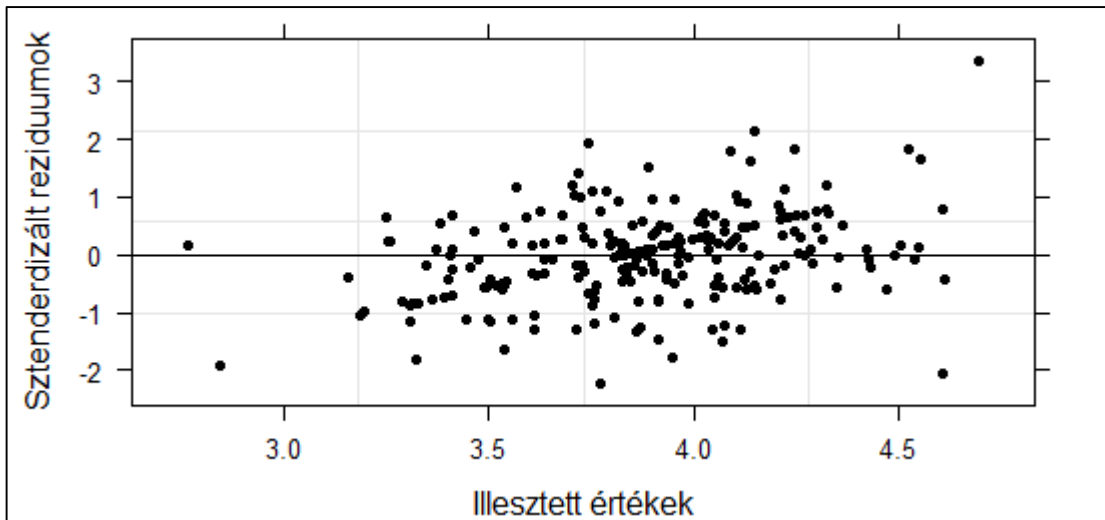
$$\text{Chromogranin} - A (\text{Normál csoport}) = 231.7914 * e^{(0.061963 * \text{Eltelt idő})}$$

5. egyenlet: A fix hatások visszatranszformálása az Emelkedett CgA csoportban

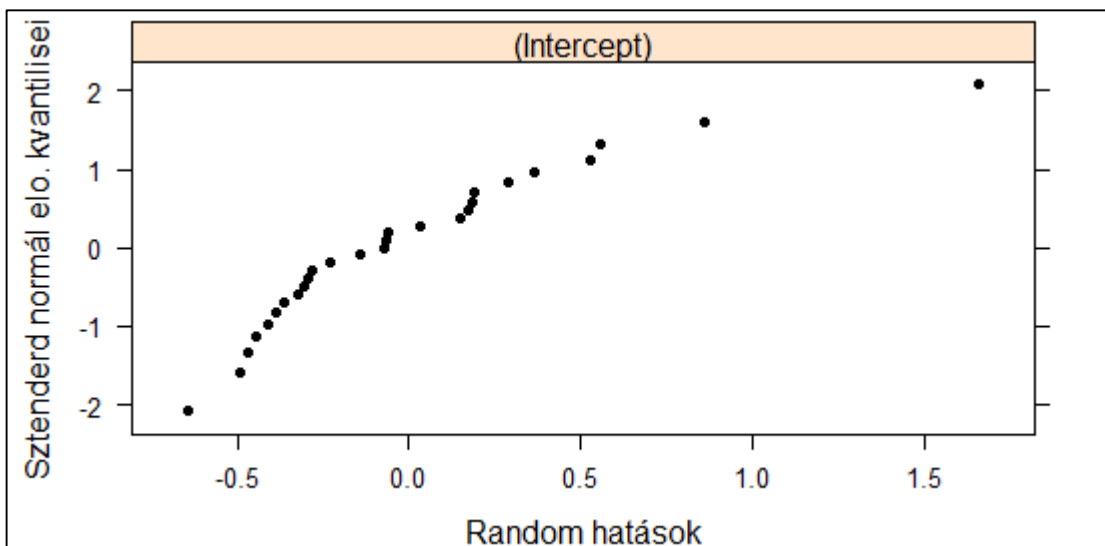
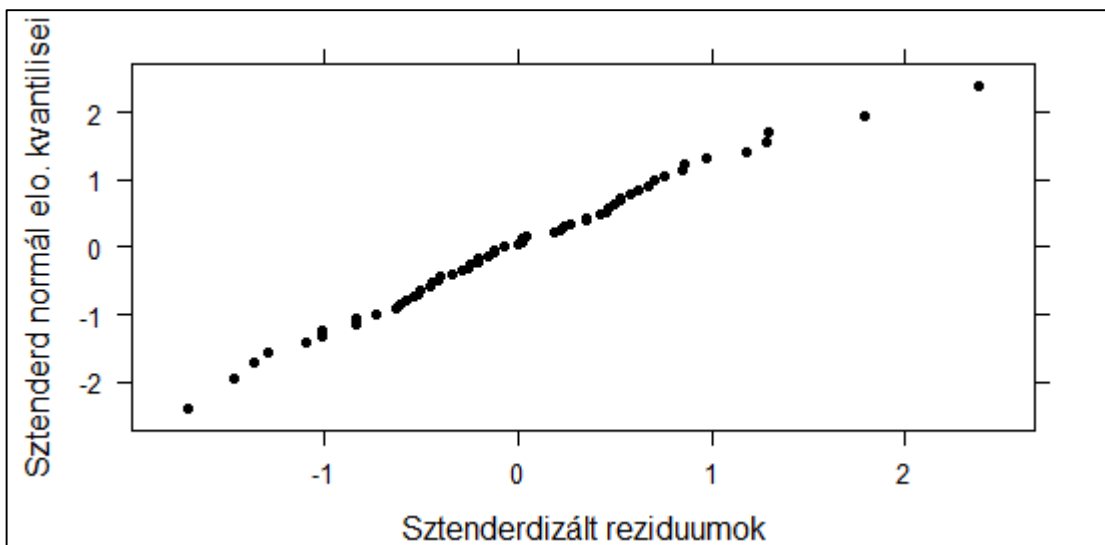
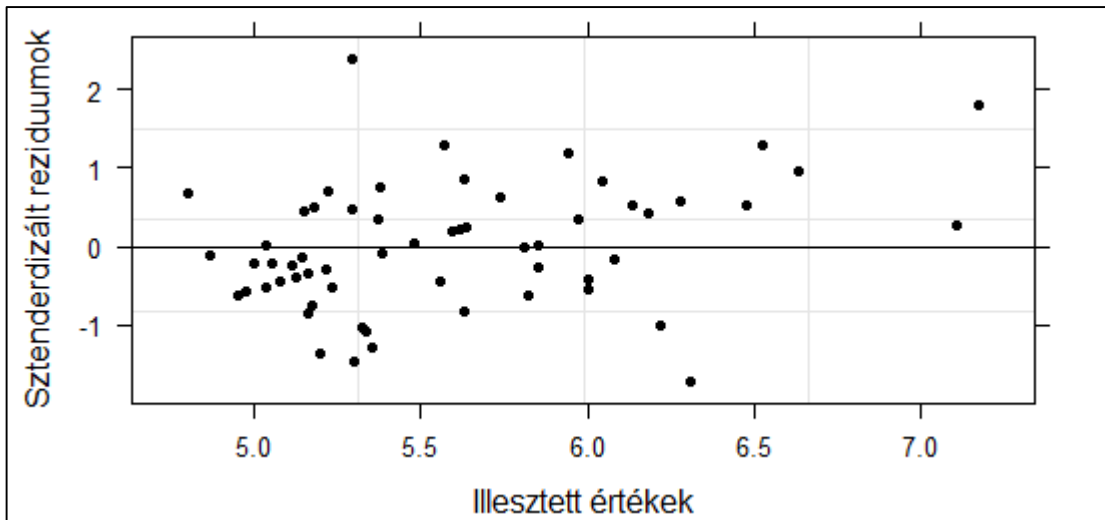
Az Emelkedett CgA csoport modelldiagnosztikai ábrái körül-belül azonosak az összes adathál látottakkal (**21. ábra**).



19. ábra: Modelldiagnosztikai ábrák a Chromogranin-A becslésére szolgáló modellhez. A bal felső ábrán a reziduumok szórása, a jobb felsőn a reziduumok eloszlása, a bal alsón a random hatások eloszlása, míg a jobb alsó ábrán pedig a random hatások jobbra tolttsága olvasható le.



20. ábra: Modelldiagnosztikai ábrák a Chromogranin-A becslésére szolgáló modellhez a Normál CgA csoportban. A felső ábrán a reziduumok szórása, a középsőn a reziduumok eloszlása, az alsón pedig a random hatások eloszlása olvasható le.



21. ábra: Modelldiagnosztikai ábrák a Chromogranin-A becslésére szolgáló modellhez az Emelkedett CgA csoportban. A felső ábrán a reziduumok szórása, a középsőn a reziduumok eloszlása, az alsón pedig a random hatások eloszlása olvasható le.

4. Megbeszélés

Irodalmi adatokból ismeret, hogy a Chromogranin-A (CgA), mely klinikai diagnosztikai szempontból a karcinoid és neuroendokrin sejtes tumorok egyik leggyakoribb peptid szekréciós tumormarker terméke [28, 60-62], szinte minden endokrin és neuroendokrin sejttípus képes előállítani [19-21]. A legfrissebb kutatások során megfigyelték, hogy a Chromogranin-A is jelentős autoantigén szerepet játszhat az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulása során [5]. A diabetes kialakulásakor a CgA-ból lehasadó WE-14 fehérjemolekula (CgA-[359-372]) a diabetogén T-sejtek CD4⁺ és CD8⁺ szubpopulációt is képes aktiválni az immunfolyamatok során [5, 54], mely reakció enzimekkel és poszttranszlációs módosításokkal tovább is fokozható [51-53]. A WE14 termelése, a Chromogranin-A-hoz hasonlóan, a különböző neuroendokrin szövetekben széles körben megfigyelhető [5, 45, 46]. A cukorbetegség kialakulásakor jelentős mennyiségű anti-CgA T-sejt mérhető [52, 54], azonban a betegség progrediálása során nem tudjuk mi történik ezekkel a T-sejt populációkkal. Az 1-es típusú diabetes mellitus diagnosztikai paramétereire közé tartozó paramétereikről – szigetsejt ellenes antitestek (Islet Cell Autantibodies, ICA), glutaminsav-dekarboxiláz ellenes antitestek (GAD), anti-inzulin antitestek, illetve a csökkent inzulin termelésre utaló C-peptid – gyűjtött ismereteink alapján [77, 78] feltételezhető, hogy az anti-CgA antitestek is csökkennek a betegség előrehaladtával, de ennek a feltételezésnek a jövőbeni behatóbb tanulmányozása mindenképp szükséges.

A munkacsoportunk által korábban közölt esettanulmányból tudjuk, hogy a neuroendokrin daganatok eltávolítását követően a szérumban Chromogranin-A koncentrációk visszatérnek a normál tartományba [79]. A publikáció megjelenését követően azóta további 3 ilyen esettel találkoztunk, ahol a tumor sebészi eltávolítását követően minden esetben rendeződtek a CgA szintek.

Habár jelen dolgozat szerves részét nem képezte, korábbi vizsgálatunk alapján ismeretes, hogy az emelkedett Chromogranin-A szintek mellett nagyobb számban figyelhetőek meg hyperpláziás elváltozások a gyomorban, melyek neuroendokrin tumorok előalakjaként definiálhatóak [4]. A betegek visszahívásakor a hyperpláziás elváltozások kontrollálását eddig csak kevés esetben tudtuk elvégezni – melyek rövid időn belüli elvégzését egyik következő célunkként tűztük ki –, de az eddig elvégzett endoszkópiás vizsgálatok eredménye alapján a Chromogranin-A szintek emelkedése mellett a hyperpláziás elváltozások progressziója is megfigyelhető.

Mindezen ismeretek birtokában felmerült bennünk a kérdés, hogy az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulását követően a Chromogranin-A (és közvetve annak egyéb fehérje termékei) befolyásolja-e a betegség további alakulását? Lehet-e valamilyen szerepe a betegség progrediálása során az egyéb, társuló betegségek kialakulásában? Meghatározható-e a molekula szérumban koncentrációinak változásában valamilyen tendencia a betegség fennállási idejével arányosan? Ha igen, milyen időintervallum alatt lehet jelentős a változás, illetve milyen az irányultsága?

Jelen dolgozatban arra kerestük a választ, hogy található-e valamilyen összefüggés a szérumban Chromogranin-A szintek körülbelül 3.5 év alatt bekövetkező változásai és egyéb, a betegekben fennálló megbetegedések, illetve az immun- és a rutin diagnosztikában használt laboratóriumi paraméterek között. Mindezek felhasználásával végső célunk egy rutinszerű vizsgálati protokoll felállítása, mellyel a szérumban CgA szintek alapján előre jelezhetnénk a neuroendokrin tumoros betegségek kialakulásának rizikóját, és a lehetőségekhez mérten megelőzni vagy késleltetni ezek teljes manifesztálódását, javítva ezzel a betegek életminőségét és aktuális állapotuk fenntartását.

A Chromogranin-A-nak és fehérjeszarmazékainak jelentős szerep jut az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásában [5, 52, 54], azonban a betegség további alakulása során a fehérjével kapcsolatos kísérleteket nem végeztek. Jelen vizsgálatunkba olyan 1-es típusú cukorbeteg személyeket vontunk be, akiknél a betegség átlagosan több mint 10 éve fennállt. Eredményeink alapján az 1-es típusú cukorbetegség fennállási idejének növekedésével a szérumban Chromogranin-A koncentrációk emelkednek, és általánosságban elmondható, hogy a normál tartomány felső határa felett, az emelkedett szérumban CgA szintekkel rendelkező betegek anyagcsere állapota a normál tartományon belüli CgA-val rendelkezőkéhez képest szignifikánsan rosszabb. Statisztikailag magasabb HbA_{1c} és gasztrin szint mérhető az emelkedett CgA csoportban, illetve szignifikánsan nagyobb számban fordul elő az 1-es típusú cukorbetegség mellett kialakuló néhány társbetegség, mint pl. a hipertónia és az anaemia perniciosa. Megemlítendő még munkacsoportunk folyóiratban eddig még nem publikált eredménye is – mely a 2014-ben leadott B.Sc. szakdolgozat fő kérdése volt –, miszerint a vizsgált betegeknél az emelkedett szérumban CgA szintek mellett neuroendokrinsejtes hyperplázia a betegek 80%-ánál igazolható volt [4].

Az 1-es típusú diabetes mellitus progressziójának előrehaladtával egyre több és több társbetegség és/vagy diabéteszes szövődmény jelenhet meg [7, 8]. Vizsgálatunkban a 3.5 év elteltét követően egyedül a Normál CgA csoporton belül figyeltünk meg újonnan kialakuló társbetegségeket, azonban az esetszámok növekedése nem volt statisztikailag szignifikáns.

Az Emelkedett CgA csoportban új betegség nem jelent meg, viszont a betegek számított glomerulus filtrációs rátáinak normál tartományon belüli csökkenését figyeltük meg. Mivel a Chromogranin-A koncentrációkat a vese károsodásai igen nagy mértékben befolyásolják [63, 64], a betegek ez irányú vizsgálata minden esetben megtörtént, diabéteszes veseszövődmény, illetve egyéb vesebetegség nem merült fel a vizsgálati személyeknél.

A Chromogranin-A időben történő változásainak modellezésével eddig igen kevesen foglalkoztak [80, 81]. A molekula nem normális eloszlása – tumoros elváltozásoknál pl. a normál értékek több tízszerese is előfordulhat – az elemzések és modellek kidolgozását még nehezebbé teszi. Jelen dolgozatban egy olyan modellt próbáltuk létrehozni, mely segítségével a betegek jövőbeni CgA koncentrációit becsülhetjük meg az idő függvényében. Előzetes predikcióink alapján kezdetben egy olyan statisztikai modellben gondolkoztunk, melyben az eltelt idő különböző hatványainak hatását feltételeztük, amivel a Chromogranin-A-ra általában jellemző nem-linearitást modelleztük volna. A végső modellünkben azonban az időnek a lineáris hatását tudtuk kimutatni, a CgA változását a Normál CgA csoportban 1-3% emelkedés per év, míg az Emelkedett CgA csoport esetén az évenkénti emelkedést 3.5% és 11% közé becsültük. A teljes populációt együttesen vizsgálva pedig a becsült éves Chromogranin-A növekedés 1% és 5% közé tehető. A modellek ellenőrzésekor felmerült, hogy egy ismeretlen paraméter a random hatások jobbra eltoltságát okozza. Az eltoltság feloldását több mért paraméter segítségével próbáltuk feloldani, de a vizsgált paramétereink között egyik sem tudta az eltoltságot megszüntetni. Mivel a Chromogranin-A-t sokféle szövetben ki lehet mutatni [19-21], emiatt igen széles körű lehet azoknak a paramétereknek a halmaza, melyek a CgA-ra hatva modellünkben a jobbra eltoltságot okozhatták. Ennek felderítésére további kísérletek elvégzését tartjuk szükségesnek.

Összesítve a vizsgálatban kapott adataink alapján a már kialakult és progrediáló 1-es típusú diabetes mellitusban a betegség fennállási idejének növekedésével a Chromogranin-A szintek emelkedése figyelhető meg, melyhez a betegséghez társuló autoimmun és nem-autoimmun megbetegedések nagyobb számú megjelenése társul. Magas Chromogranin-A szintek mellett a betegek anyagcsere állapota a normál CgA szintű betegekéhez képest rosszabb, mely jelentősen befolyásolhatja a betegek életkilátásait. A szérumban CgA szintek évenkénti 1-5%, maximum 11%-os emelkedését becsültük statisztikai modellek segítségével.

Összegezve a fent részletezett megfigyeléseink alapján javasoljuk az 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegek esetén a szérumban CgA rendszeres, rutinszerű

vizsgálatát, melyet a szérumban Chromogranin-A koncentrációk alapján a laboratóriumi normál tartomány felső határának közelében (80 – 98.1 ng/ml) és felette (>98.1 ng/ml) évente, míg a normál tartomány alsó és középső intervallumára eső értékek esetén az ismételt mérés elegendő 2 évente.

III. Összefoglalás

Vizsgálatunkba 79, 1-es típusú cukorbetegét vontunk be. A betegeket szérumban Chromogranin-A (CgA) szintjeik alapján két csoportba osztottuk. A Normál CgA csoportba 63, míg az Emelkedett CgA csoportba (szérumban CgA koncentráció magasabb, mint 98.1 ng/ml) 16 beteg került.

Megmértük a CgA, az ATPO, a gasztrin és rutin laboratóriumi diagnosztikában használt paramétereket (vércé, koleszterin, HbA_{1C}, kreatinin, pajzsmirigyhormonok, hsCRP).

A vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy található-e valamilyen összefüggés a szérumban Chromogranin-A szintek körülbelül 3.5 év alatt bekövetkező változásai és egyéb, a betegekben fennálló megbetegedések, illetve az immun- és a rutin diagnosztikában használt laboratóriumi paraméterek között. Mindezek felhasználásával végső célunk egy rutinszerű vizsgálati protokoll felállítása.

Eredményeink alapján a cukorbetegség fennállási idejének emelkedésével nőnek a szérumban a CgA szintek. Az Emelkedett CgA csoportban magasabb HbA_{1C}, és gasztrin, illetve alacsonyabb vörösvértest és trijód-tironin koncentrációk figyelhetőek meg.

A Normál CgA csoportban szignifikánsan több esetben fordul elő latens felnőttkori autoimmun diabetes (LADA), míg az Emelkedett CgA csoportban több esetben társult az alapbetegséghez anaemia perniciosa, illetve hypertonia.

A 3.5 év elteltét követően egyedül a Normál CgA csoporton belül figyeltünk meg újonnan kialakuló társbetegségeket, azonban az esetszámok növekedése nem volt szignifikáns. Az Emelkedett CgA csoportban viszont a betegek számított glomerulus filtrációs rátáinak normál tartományon belüli csökkenését figyeltük meg.

A Chromogranin-A időben történő változásainak modellezésével a Normál CgA csoportban 1-3% emelkedés per év, míg az Emelkedett CgA csoport esetén az évenkénti emelkedést 3.5% és 11% közé becsültük. A teljes populációt együttesen vizsgálva a becsült éves Chromogranin-A növekedés 1% és 5% közé tehető.

Összesítve a vizsgálatban kapott adataink alapján a T1DM fennállási idejének növekedésével a CgA szintek emelkedése figyelhető meg, melyhez a betegséghez társuló autoimmun és nem-autoimmun megbetegedések nagyobb számú megjelenése társul. Fenti megfigyeléseink alapján javasoljuk T1DM-ben a CgA rendszeres, rutinszerű vizsgálatát, melyet a szérumban CgA szintek alapján a laboratóriumi normál tartomány felső határának közelében és felette évente, míg ezek alatt az ismétlés elvégzése 2 évente elegendő.

IV. Summary

Serum Chromogranin-A level changes in time in type 1 diabetes mellitus patients

Seventy-nine type 1 diabetic (T1DM) patients were enrolled into our study. The patients were divided into two groups based on their serum Chromogranin-A (CgA) levels. 63 patients were rolled into the Normal CgA, and 16 patients to the Elevated CgA group (serum CgA concentration was higher than 98,1 ng/ml).

Chromogranin-A, ATPO, gastrin and routine laboratory parameters (haematology, cholesterols, HbA_{1C}, creatinine, thyroid hormones, hsCRP) were measured.

The study goals were to find connections between serum CgA level changes after approx. 3.5 years and other existing autoimmune diseases and other immune- and routine laboratory parameters. Our ultimate goal was to establish a routine test protocol based on CgA levels. Our data suggest that with the mean duration of diabetes CgA levels are increasing. In the Elevated CgA group higher levels of HbA_{1C} and gastrin, and lower levels of red blood cell and triiodothyronine were found.

In the Normal CgA group significantly more cases of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) occurred, while in the Elevated CgA group more cases of associated pernicious anemia and hypertension were present.

After the 3.5 years newly developed associated diseases were only observed in the Normal CgA group, however the increase of the cases was not significant. In the Elevated CgA group we found a decrease in the normal range of the estimated glomerular filtration rate.

With the modeling of the changes in Chromogranin-A levels we found that in the Normal CgA group the estimated CgA increase is 1-3% per year. The same estimation is between 3.5-11% in the Elevated CgA group. In the whole population our model estimated a 1-5% Chromogranin-A increase in every year.

The data collected in the study suggests that with the increasing mean duration of type 1 diabetes Chromogranin-A levels are increasing as well, which is associated with a higher number of coexisting autoimmune and non-autoimmune diseases. Because of these observations we suggest that serum CgA should be tested regularly in T1DM patients with the other routinely checked parameters too. If Chromogranin-A levels are near the upper limit or above we are suggesting a CgA measurement in every year, otherwise it should be done in every 2 years.

V. Irodalomjegyzék

1. FOROUHI N.G., WAREHAM N.J., 2014: Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon)*, 42. 12. p. 698-702.
2. DE BLOCK C.E., COLPIN G., THIELEMANS K., COOPMANS W., BOGERS J.J., PELCKMANS P.A., VAN MARCK E.A., VAN HOOF V., MARTIN M., DE LEEUW I.H., BOUILLON R., VAN GAAL L.F., 2004: Neuroendocrine tumor markers and enterochromaffin-like cell hyper/dysplasia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 27. 6. p. 1387-93.
3. KIS J., ENGELMANN P., HEYAM J., ORBÁN T., 2006: Az immunológiai prevenció lehetősége 1-es típusú diabetes mellitusban. *Lege Artis Medicinæ*, 16. 8-9. p. 771-773.
4. HEROLD Z., 2014: Chromogranin-A vizsgálata 1-es típusú diabetes mellitusban. Bachelor of Science (BSc.) [Szakdolgozat]. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar. <http://www.huveta.hu/handle/10832/1162>
5. STADINSKI B.D., DELONG T., REISDORPH N., REISDORPH R., POWELL R.L., ARMSTRONG M., PIGANELLI J.D., BARBOUR G., BRADLEY B., CRAWFORD F., MARRACK P., MAHATA S.K., KAPPLER J.W., HASKINS K., 2010: Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol*, 11. 3. p. 225-31.
6. HEROLD Z., NAGY P., PATOCS A., SOMOGYI A., 2015: The role of chromogranin-A and its derived peptide, WE-14 in the development of type 1 diabetes mellitus. *Orvosi Hetilap*, 156. 5. p. 163-70.
7. Tulassay Z., 2011: A belgyógyászat alapjai. 3. kiadás. Budapest, Medicina könyvkiadó Zrt. p. 1577-1585.
8. Leövey A., Nagy V.E., Paragh G., Rácz K., 2011: Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve. Budapest, Medicina könyvkiadó Zrt. p. 506-523.
9. GILLESPIE K.M., 2006: Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*, 175. 2. p. 165-70.
10. Diabetes in Hungary - 2015. Az International Diabetes Federation adatbázisa; 2016 [Megtekintve: 2016.04.10.]. Weblapcím: <http://www.idf.org/membership/eur/hungary>.
11. 2006: Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve: A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegség kezelése és gondozása a felnőttkorban. *Egészségügyi Közlöny*, 2. kötet CD melléklete. p.
12. GYÜRÜS É., SOLTÉSZ G., 2004: Az 1-es típusú diabetes mellitus incidenciája Európában, az EURODIAB adatai alapján. *Lege Artis Medicinæ*, 14. 6. p. 399-404.

13. YOON J.W., JUN H.S., 2005: Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther*, 12. 6. p. 580-91.
14. DRUCKER D.J., NAUCK M.A., 2006: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, 368. 9548. p. 1696-705.
15. LINDLEY S., DAYAN C.M., BISHOP A., ROEP B.O., PEAKMAN M., TREE T.I., 2005: Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 54. 1. p. 92-9.
16. NIESZNER É., BÁRDOS P., BARANYI É., PRÉDA I., 2005: A diabetes mellitus cardiovascularis szövődményei és diagnózisuk. *Lege Artis Medicinæ*, 15. 10. p. 722-729.
17. KEMPLER P., 2010: [Treatment of neuropathies]. *Orv Hetil*, 151. 2. p. 62-5.
18. WINKLER G., KEMPLER P., 2010: [Pathomechanism of diabetic neuropathy: background of the pathogenesis-oriented therapy]. *Orv Hetil*, 151. 24. p. 971-81.
19. BLASCHKO H., COMLINE R.S., SCHNEIDER F.H., SILVER M., SMITH A.D., 1967: Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*, 215. 5096. p. 58-9.
20. SCHNEIDER F.H., SMITH A.D., WINKLER H., 1967: Secretion from the adrenal medulla: biochemical evidence for exocytosis. *Br J Pharmacol Chemother*, 31. 1. p. 94-104.
21. FELDMAN S.A., EIDEN L.E., 2003: The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. *Endocr Pathol*, 14. 1. p. 3-23.
22. WINKLER H., FISCHER-COLBRIE R., 1992: The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*, 49. 3. p. 497-528.
23. TAKIYUDDIN M.A., NEUMANN H.P., CERVENKA J.H., KENNEDY B., DINH T.Q., ZIEGLER M.G., BARON A.D., O'CONNOR D.T., 1991: Ultradian variations of chromogranin A in humans. *Am J Physiol*, 261. 4 Pt 2. p. R939-44.
24. SIMON J.P., BADER M.F., AUNIS D., 1989: Effect of secretagogues on chromogranin A synthesis in bovine cultured chromaffin cells. Possible regulation by protein kinase C. *Biochem J*, 260. 3. p. 915-22.
25. DEFTOS L.J., 1991: Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev*, 12. 2. p. 181-7.
26. HENDY G.N., BEVAN S., MATTEI M.G., MOULAND A.J., 1995: Chromogranin A. *Clin Invest Med*, 18. 1. p. 47-65.

27. WU H.J., ROZANSKY D.J., PARMER R.J., GILL B.M., O'CONNOR D.T., 1991: Structure and function of the chromogranin A gene. Clues to evolution and tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 266. 20. p. 13130-4.
28. LOUTHAN O., 2011: Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)*, 57. 5. p. 173-81.
29. ANGELETTI R.H., HICKEY W.F., 1985: A neuroendocrine marker in tissues of the immune system. *Science*, 230. 4721. p. 89-90.
30. LLOYD R.V., CANO M., ROSA P., HILLE A., HUTTNER W.B., 1988: Distribution of chromogranin A and secretogranin I (chromogranin B) in neuroendocrine cells and tumors. *Am J Pathol*, 130. 2. p. 296-304.
31. REIFFEN F.U., GRATZL M., 1986: Chromogranins, widespread in endocrine and nervous tissue, bind Ca²⁺. *FEBS Lett*, 195. 1-2. p. 327-30.
32. GORR S.U., DEAN W.L., RADLEY T.L., COHN D.V., 1988: Calcium-binding and aggregation properties of parathyroid secretory protein-I (chromogranin A). *Bone Miner*, 4. 1. p. 17-25.
33. SETTLEMAN J., NOLAN J., ANGELETTI R.H., 1985: Chromogranin, an integral membrane protein. *J Biol Chem*, 260. 3. p. 1641-4.
34. DREES B.M., HAMILTON J.W., 1992: Pancreastatin and bovine parathyroid cell secretion. *Bone Miner*, 17. 3. p. 335-46.
35. DREES B.M., ROUSE J., JOHNSON J., HAMILTON J.W., 1991: Bovine parathyroid glands secrete a 26-kDa N-terminal fragment of chromogranin-A which inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*, 129. 6. p. 3381-7.
36. AARDAL S., HELLE K.B., 1992: The vaso-inhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. *Regul Pept*, 41. 1. p. 9-18.
37. GALINDO E., RILL A., BADER M.F., AUNIS D., 1991: Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin A, inhibits chromaffin cell secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88. 4. p. 1426-30.
38. GOETZE J.P., ALEHAGEN U., FLYVBJERG A., REHFELD J.F., 2014: Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease. *Biomark Med*, 8. 1. p. 133-40.
39. VALICHERLA G.R., HOSSAIN Z., MAHATA S.K., GAYEN J.R., 2013: Pancreastatin is an endogenous peptide that regulates glucose homeostasis. *Physiol Genomics*, 45. 22. p. 1060-71.

40. SANCHEZ-MARGALET V., LOBON J.A., GONZALEZ A., FERNANDEZ-SOTO M.L., ESCOBAR-JIMENEZ F., GOBERNA R., 1998: Increased plasma pancreastatin-like levels in gestational diabetes: correlation with catecholamine levels. *Diabetes Care*, 21. 11. p. 1951-4.
41. FUNAKOSHI A., TATEISHI K., SHINOZAKI H., MATSUMOTO M., WAKASUGI H., 1990: Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Regul Pept*, 30. 2. p. 159-64.
42. SOELL M., FEKI A., HANNIG M., SANO H., PINGET M., SELIMOVIC D., 2010: Chromogranin A detection in saliva of type 2 diabetes patients. *Bosn J Basic Med Sci*, 10. 1. p. 2-8.
43. KOGAWA E.M., GRISI D.C., FALCAO D.P., AMORIM I.A., REZENDE T.M., DA SILVA I.C., SILVA O.N., FRANCO O.L., DE AMORIM R.F., 2016: Impact of glycemic control on oral health status in type 2 diabetes individuals and its association with salivary and plasma levels of chromogranin A. *Arch Oral Biol*, 62. p. 10-9.
44. KOGAWA E.M., GRISI D.C., FALCAO D.P., AMORIM I.A., REZENDE T.M., DA SILVA I.C., SILVA O.N., FRANCO O.L., DE AMORIM R.F., 2016: Salivary function impairment in type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A. *Clin Oral Investig*, p.
45. GUILLEMOT J., GUERIN M., THOUENNON E., MONTERO-HADJADJE M., LEPRINCE J., LEFEBVRE H., KLEIN M., MURESAN M., ANOUAR Y., YON L., 2014: Characterization and plasma measurement of the WE-14 peptide in patients with pheochromocytoma. *PLoS One*, 9. 2. p. e88698.
46. HASKINS K., PORTAS M., BERGMAN B., LAFFERTY K., BRADLEY B., 1989: Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86. 20. p. 8000-4.
47. GLEESON C.M., CURRY W.J., JOHNSTON C.F., BUCHANAN K.D., 1996: Occurrence of WE-14 and chromogranin A-derived peptides in tissues of the human and bovine gastro-entero-pancreatic system and in human neuroendocrine neoplasia. *J Endocrinol*, 151. 3. p. 409-20.
48. MATHEWS C.E., SUAREZ-PINZON W.L., BAUST J.J., STRYNADKA K., LEITER E.H., RABINOVITCH A., 2005: Mechanisms underlying resistance of pancreatic islets from ALR/Lt mice to cytokine-induced destruction. *J Immunol*, 175. 2. p. 1248-56.
49. ANDERSON M.S., VENANZI E.S., KLEIN L., CHEN Z., BERZINS S.P., TURLEY S.J., VON BOEHMER H., BRONSON R., DIERICH A., BENOIST C., MATHIS D., 2002: Projection of an

immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298. 5597. p. 1395-401.

50. SOLLID L.M., 2000: Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol*, 18. p. 53-81.

51. DELONG T., BAKER R.L., HE J., BARBOUR G., BRADLEY B., HASKINS K., 2012: Diabetogenic T-cell clones recognize an altered peptide of chromogranin A. *Diabetes*, 61. 12. p. 3239-46.

52. GOTTLIEB P.A., DELONG T., BAKER R.L., FITZGERALD-MILLER L., WAGNER R., COOK G., REWERS M.R., MICHELS A., HASKINS K., 2014: Chromogranin A is a T cell antigen in human type 1 diabetes. *J Autoimmun*, 50. p. 38-41.

53. JIN N., WANG Y., CRAWFORD F., WHITE J., MARRACK P., DAI S., KAPPLER J.W., 2015: N-terminal additions to the WE14 peptide of chromogranin A create strong autoantigen agonists in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112. 43. p. 13318-23.

54. LI Y., ZHOU L., LI Y., ZHANG J., GUO B., MENG G., CHEN X., ZHENG Q., ZHANG L., ZHANG M., WANG L., 2015: Identification of autoreactive CD8+ T cell responses targeting chromogranin A in humanized NOD mice and type 1 diabetes patients. *Clin Immunol*, 159. 1. p. 63-71.

55. COSTA V.S., MATTANA T.C., DA SILVA M.E., 2010: Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract*, 88. 3. p. 222-6.

56. HONKANEN J., NIEMINEN J.K., GAO R., LUOPAJARVI K., SALO H.M., ILONEN J., KNIP M., OTONKOSKI T., VAARALA O., 2010: IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol*, 185. 3. p. 1959-67.

57. BAKER R.L., BRADLEY B., WILES T.A., LINDSAY R.S., BARBOUR G., DELONG T., FRIEDMAN R.S., HASKINS K., 2016: Cutting Edge: Nonobese Diabetic Mice Deficient in Chromogranin A Are Protected from Autoimmune Diabetes. *J Immunol*, 196. 1. p. 39-43.

58. PREGUN I., HERSZENYI L., JUHASZ M., MIHELLER P., HRITZ I., PATOCS A., RACZ K., TULASSAY Z., 2011: Effect of proton-pump inhibitor therapy on serum chromogranin a level. *Digestion*, 84. 1. p. 22-8.

59. GLINICKI P., JESKE W., 2010: Chromogranin A (CgA)--the influence of various factors in vivo and in vitro, and existing disorders on it's concentration in blood. *Endokrynol Pol*, 61. 4. p. 384-7.

60. VINIK A.I., SILVA M.P., WOLTERING E.A., GO V.L., WARNER R., CAPLIN M., 2009: Biochemical testing for neuroendocrine tumors. *Pancreas*, 38. 8. p. 876-89.

61. OBERG K., JANSON E.T., ERIKSSON B., 1999: Tumour markers in neuroendocrine tumours. *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 31 Suppl 2. p. S160-2.
62. LINNOILA R.I., MULSHINE J.L., STEINBERG S.M., FUNA K., MATTHEWS M.J., COTELINGAM J.D., GAZDAR A.F., 1988: Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 90. 6. p. 641-52.
63. SCIOLA V., MASSIRONI S., CONTE D., CAPRIOLI F., FERRERO S., CIAFARDINI C., PERACCHI M., BARDELLA M.T., PIODI L., 2009: Plasma chromogranin a in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15. 6. p. 867-71.
64. HSIAO R.J., MEZGER M.S., O'CONNOR D.T., 1990: Chromogranin A in uremia: progressive retention of immunoreactive fragments. *Kidney Int*, 37. 3. p. 955-64.
65. O'CONNOR D.T., 1985: Plasma chromogranin A. Initial studies in human hypertension. *Hypertension*, 7. 3 Pt 2. p. I76-9.
66. DI COMITE G., MORGANTI A., 2011: Chromogranin A: a novel factor acting at the cross road between the neuroendocrine and the cardiovascular systems. *J Hypertens*, 29. 3. p. 409-14.
67. MÁTYUS J., OLÁH A., FODOR B., NAGY J., TÚRI S., HORVÁTH A.R., 2007: A Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság és a Magyar Nephrológiai Társaság tájékoztatója laboratóriumi szakemberek számára a számított GFR (eGFR) bevezetésével kapcsolatos ismeretekről. p. 1-5.
68. LEVEY A.S., CORESH J., GREENE T., STEVENS L.A., ZHANG Y.L., HENDRIKSEN S., KUSEK J.W., VAN LENTE F., CHRONIC KIDNEY DISEASE EPIDEMIOLOGY C., 2006: Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 145. 4. p. 247-54.
69. R CORE TEAM, 2015: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
70. RSTUDIO TEAM, 2015: RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>
71. DINYA E., 2001: Biometria az orvosi gyakorlatban. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt.
72. REICZIGEL J., HARNOS A., SOLYMOSSI N., 2010: Biostatisztika nem statisztikusoknak. 2007-es kiadás javított utánnomása. Nagykovácsi, Pars Kft.
73. HOLM S., 1979: A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6. p. 65-70.

74. PINHEIRO J., BATES D., DEBROY S., SARKAR D., R CORE TEAM, 2015: nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-122, <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
75. Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N.J., Saveliev A.A., Smith G.M., 2009: Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R, Statistics for Biology and Health. New York, Springer Science+Business Media, LLC. p. 105-109.
76. FESTA A., D'AGOSTINO R., JR., WILLIAMS K., KARTER A.J., MAYER-DAVIS E.J., TRACY R.P., HAFFNER S.M., 2001: The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25. 10. p. 1407-15.
77. JENSEN R., GILLIAM L., TORN C., LANDIN-OLSSON M., PALMER J., AKESSON K., KOCKUM I., LERNMARK B., KARLSSON A.F., LYNCH K.F., BRESLOW N., LERNMARK A., SUNDKVIST G., DIABETES INCIDENCE STUDY IN SWEDEN G., 2007: Islet cell autoantibody levels after the diagnosis of young adult diabetic patients. *Diabet Med*, 24. 11. p. 1221-8.
78. SPEAKE C., ODEGARD J.M., 2015: Evaluation of Candidate Biomarkers of Type 1 Diabetes via the Core for Assay Validation. *Biomark Insights*, 10. Suppl 4. p. 19-24.
79. SOMOGYI A., RUZICKSA E., VARGA T., RACZ K., NAGY G., 2007: [Development of silent gastric carcinoid in a type 1 diabetic patient with primer hypothyreosis]. *Orv Hetil*, 148. 35. p. 1667-71.
80. BRAGA F., FERRARO S., IEVA F., PAGANONI A., PANTEGHINI M., 2015: A new robust statistical model for interpretation of differences in serial test results from an individual. *Clin Chem Lab Med*, 53. 5. p. 815-22.
81. BRAGA F., FERRARO S., MOZZI R., DOLCI A., PANTEGHINI M., 2013: Biological variation of neuroendocrine tumor markers chromogranin A and neuron-specific enolase. *Clin Biochem*, 46. 1-2. p. 148-51.

VI. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Somogyi Anikó Professzor Asszonynak szakmai iránymutatásáért, építő kritikájáért és feláldozott szabadidejéért.

Külön köszönöm Dr. Patócs Attilának, társtémavezetőmnek a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségét, hasznos tanácsait.

Köszönöm Dr. Rácz Károly és Dr. Tóth Miklós Professzor Uraknak, hogy lehetővé tették számomra a részvételt az SE II. Belgyógyászati Klinikán folyó kutatómunkában.

Hálásan köszönöm Dr. Lang Zsoltnak a statisztikai modell kidolgozásában és értelmezésében nyújtott segítségét.

Hálás vagyok a SE II. sz. Belgyógyászati Klinika Anyagcsere munkacsoport minden tagjának a dolgozat elkészítéséhez, a labor- és mérés technikai, illetve a statisztikai alapismeretek elsajátításában nyújtott segítségükért.

Továbbá köszönöm a segítséget a II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Laboratórium összes munkatársának is.

HuVetA - SZIA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Herold Zoltán

Elérhetőség (e-mail cím): herzoli@hotmail.com

A feltöltendő mű címe: Szérum Chromogranin-A szintek időbeli változása 1-es típusú diabetes mellitusban

A mű megjelenési adatai: M.Sc. szakdolgozat, 2016

Az átadott fájlok száma: 1db pdf

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2016. április 22.

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A **HuVetA** Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

*A **SZIA** Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.*

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Somogyi Anikó kijelentem, hogy Herold Zoltán „Szérum Chromogranin-A szintek időbeli változása 1-es típusú diabetes mellitusban” c. szakdolgozatának tartalmát ismerem, az abban foglaltakkal egyetértek, és a dolgot benyújtásra, illetve védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2016. április 22.

Prof. Dr. Somogyi Anikó

Egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar

II. sz. Belgyógyászati Klinika

Társtémavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Patócs Attila kijelentem, hogy Herold Zoltán „Szérum Chromogranin-A szintek időbeli változása 1-es típusú diabetes mellitusban” c. szakedolgozatának tartalmát ismerem, az abban foglaltakkal egyetértek, és a dolgozatot benyújtásra, illetve védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2016. április 22.

Dr. Patócs Attila, PhD

Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet
MTA-SE „Lendület” Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport