

Nem-lineáris glükóz kinetika hatásainak vizsgálata hypo- és hyperglükémiás kórállapotokban

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Ragoncsa Gáborné dr. Nagy Zsófia

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető:

Dr. Nagy Tamás, egyetemi docens, Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

PÉCS

2024

ÖSSZEFOGLALÁS

A diabétesz és az Alzheimer betegség (AD) világszerte több millió embert érint külön-külön is, emellett szoros összefüggést találtak a két kórkép között mind epidemiológiai, mind biokémiai hátterüket tekintve. Kimutatták, hogy az inzulin és az inzulinhoz hasonló növekedési faktor termelése, illetve az inzulinreceptorok iránti rezisztencia a glükóz transzporterekkel (GLUT1 és GLUT3) együtt csökken, emellett az FDG-PET CT vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a központi idegrendszerben a glükóz metabolizmusa az egészséges egyénekhez képest alacsonyabb. Az AD kialakulásában számos faktor szerepet játszik, melyek egymással szoros kapcsolatban állnak. Az O-Glikoziláció egy reverzibilis fehérje poszttranszlációs módosulás a proteinek szerin-, illetve Treonin oldalláncain, amely széles körű szabályozó szerepet tölt be és nagy valószínűséggel egy közös elemet jelent az AD és a cukorbetegség patológiájának kialakulásában.

Dolgozatom kettő részből tevődik össze, amik egymással tematikailag összefüggenek. Az AD feltételezett metabolikus hátterének pontosabb megismerése végett neuroblasztóma (SH-SY5Y) sejtvonalon egy 24 órás kísérletsorozatot hajtottunk végre hypoglikémiás környezetben. Extracellulárisan (EC) hat különböző glükózkoncentrációt állítottunk be: 0,5; 0,8; 1,3; 1,8; 3 és 5 mM-t. Az inkubációs idő leteltét követően meghatároztuk a glükóz és laktát szintek mellett az oxigén felhasználást (OCR) és a médium savasodását (ECAR), emellett az ATP- és az intracelluláris glükóz szinteket is. Nyomon követtük a sejtek morfológiáját, életképességét és sejtosztódási rátáját, valamint az O-glikoziláció mértékét. Eredményeink alapján az 1,8 mM-os glükózkoncentráció alatt az SH-SY5Y sejtek metabolizmusa megváltozik: az EC elérhető glükóz mennyiségének csökkenését a glikolízis/oxidatív foszforiláció arányának változásával kompenzálják; az ECAR csökken, ezáltal az oxigénfogyasztással (OCR) alkotott hányados (OCR/ECAR) exponenciálisan nő. Az osztódási sebességük fokozatosan csökken, azonban az életképességük egészen alacsony glükóz koncentráción; 0,5 mM-on kezd hanyatlani. Az eddig alkalmazott sejtes modellek teljes glükózmegvonást alkalmazva akut stresszreakciót okozva a sejtekben az O-Glikoziláció fokozódását tapasztalták, míg jelenlegi modellünkben a fokozatosan kialakított hypoglikémia során ennek csökkenését tudtuk kiváltani. Véleményünk szerint a mérsékelt glükóz megvonás az AD metabolikus elváltozásainak jobb modelljeként szolgál, ezáltal magyarázatot adhat a patológiás szövetekben tapasztalt csökkent O-Glikozilációra, és ennek következtében kialakuló hyperfoszforilált Tau fehérjékre, valamint az amyloid-béta (A β) felhalmozódásra.

A tézis második felében a diabétesz diagnosztikájában és kezelésében jelenleg leggyakrabban alkalmazott hemoglobin A1c (HbA1c) kapcsolatát mutatom be az éhgyomri plazma glükózzal. Ezt elsősorban lineáris egyenletekkel jellemezték, azonban a laboratóriumunk rendszerében (GLIMS) tárolt, közel 15 évnyi adat retrospektív elemzését követően úgy gondoljuk, hogy egy Michaelis-Menten (MM) kinetika alapján történő nem-lineáris modellezés célravezetőbb és pontosabb, különös tekintettel a szélső értékekre. Ennek használatával egy egyénre jellemző Michaelis index határozható meg, míg a HbA1c változásai akár napi szinten megbecsülhetővé válnak, ezáltal segítve az egyéni terápiás terv kialakítását diabétesz esetén.

BEVEZETÉS

Az agy fő energiaforrása a glükóz. Relatív tömegéhez viszonyítva magas a cukorfelhasználási igénye, azonban bizonyos határok között képes alkalmazkodni a hypoglikémiához, hiszen a neuronok a laktátot és a ketontesteket is képesek felhasználni alternatív tápanyagként. Ehhez az asztrociták szoros közreműködésére van szükség. Hypoglikémia hatására a neuronokból glutamát szabadul fel, amit az asztrociták specifikus glutamát transzportereken keresztül felvesznek Na^+ ionokkal együtt. A glutamát glutaminná ATP-függő reakció által alakul át, ami serkenti a glükóz felvételét. Az intracelluláris Na^+ gradiens emelkedése által a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPáz aktiválódik, mely beindítja a glikolízist. A laktát termelése fokozódik, felszabadul az EC térbe, majd a neuronok az ATP-termeléshez szükséges energiaforrásként használják fel. Az agyszövetben a glükózkoncentráció 1-2 mM. Rövid távon az intracerebrális glikogén is tápanyagként szolgálhat hypoglikémia esetén. A laktátból származó metabolitok a Krebs-ciklusban, míg a glükóz felhasználásra kerülhet a pentóz-foszfát úton is. A ketontestek passzív transzporttal, diffúzióval vagy monokarboxilát transzporter 1 fehérje közreműködésével jutnak át a vér-agy-gáton. Emellett felfedezték, hogy az aquaporin csatornák is szerepet játszanak a β -hidroxi-butirát transzportjában is, mely végül acetyl-CoA-ként belép a sejtek mitokondriumában zajló citromsav-ciklusba, ezzel szolgáltatva további energiát a sejt számára. Az összes ATP termelés 88%-a aerob körülmények között zajlik, mely során a glikolízisből 2 ATP, az oxidatív-foszforilációból 28 ATP keletkezik egy glükózból, de itt glikogén, zsír vagy fehérje is lehet a kiindulási anyag. Ezzel szemben anaerob körülmények mellett 2 ATP és 2 laktát molekula jön létre glükózmolekulánként. Ez esetben még glikogént tud a szervezet felhasználni, zsírt, vagy proteint nem. Tehát az aerob energiatermelés hatékonyabb, azonban százszor lassabban megy végbe, mint anaerob esetben. Azt, hogy mikor melyik kerül túlsúlyba, a mikrocelluláris környezet határozza meg. Amennyiben az ATP szintézis károsodik, az végső

oron az ingerületátvitel romlásához vezet, magával vonva a kognitív funkciók és a memória hanyatlását, melyről a demenciák széles körben ismertek. Az AD kialakulásában többek között a mitokondriális diszfunkció is részt vesz. Ezen túlmenően a keletkező reaktív oxigén szabadgyökök a lipidek, a fehérjék és a nukleinsavak károsodásához, ezzel neuron degenerációhoz vezetnek. Az O-Glikoziláció szubsztrátjai a hexózamin bioszintézis útból származnak, melybe az összes glükóz csupán 2-5%-a lép be, ugyanakkor nélkülözhetetlen egyes fehérjék poszttranszlációs módosításaiért, amelyek felelősek a sejt túléléséért, anyagcseréjéért, jelátviteléért és a fehérje tulajdonságainak módosításáért. Kimutatásra került az is, hogy mérsékli a Ca^{2+} túltelítődés és a reaktív oxigén szabadgyök képződést, ezáltal a mitokondriális permeabilitást.

A neurofibrilláris kötegek és az amyloid plakkok jellemzőek AD-ben. A tau foszfoprotein normál esetben oldható formában van jelen, azonban hyperfoszforiláció hatására oldhatatlan kötegeket képez, lerakódik, ezzel károsítva citoplazmatikus funkciókat és az axonális transzportot. Emellett a felhalmozódott tau a mitokondriális membrán potenciálját növelheti, miáltal csökkenhet a mitofágia, így az abnormális mitokondriumok számának növekedéséhez vezethet, ezzel befolyásolva az AD előrehaladását. Ismert, hogy a foszforiláció és az O-Glikoziláció egymással reciprok kapcsolatban áll. Állatkísérletes modellekben bebizonyították, hogy az O-Glikoziláció fokozásával a patogén tau fehérjék hyperfoszforilációja gátlódik. Emellett éheztes során az idő függvényében csökken, míg etetés hatására emelkedik az O-Glikoziláció szintje hippocampalis sejtekben, egérmodellben. Fontos megemlíteni, hogy az állatkísérletes modellek nehézsége ebben az esetben az, hogy a vér és az agy glükózsztíkjének jelentős csökkenését a glükoneogenezis ellensúlyozhatja. Paradox módon hypoglikémia hatására számos in vitro kísérletben az O-Glikoziláció emelkedését tapasztalták, mely feltételezhetően egy akut stresszreakcióként hat az idegsejtekre és valószínűleg előnyös lehet a sejtek túlélésében. AD-ben szenvedő betegeknél ez az emelkedés nem fellelhető krónikus hypoglikémia esetén. Véleményünk szerint a korábbi kísérletekben nem vették figyelembe, hogy az idegsejtek alkalmazkodhatnak az alacsonyabb glükózkoncentrációkhoz, illetve annak fokozatosságát. A hypoglikémiát a glikolízis blokkolásával vagy a glükóz teljes megvonásával érték el, ezáltal növelve az O-Glikoziláció szintjét. Tekintettel arra, hogy ez a poszttranszlációs fehérjemódosulás kulcsszerepet játszik számos betegség kórfolyamatában, potenciális terápiás célpontként szerepelhet, emiatt az iránta való érdeklődés nő.

Az AD és a II-es típusú cukorbetegség közötti szoros kapcsolatot mind epidemiológiai tanulmányok, mind biokémiai folyamatok is megerősítik. A III-as típusú diabétesz elnevezést 2005-ben kezdték használni, amikor AD-s betegek post mortem vizsgálatakor az agyszövetben

az inzulin szignál zavarát fedezték fel, így egy neuroendokrin kórként azonosították. Később megerősítést nyert, hogy mindkét betegség kockázati tényezői nagyban átfedést mutatnak, emellett az inzulin adása hozzájárul a kognitív funkciók javulásához. Az inzulint maga az agyszövet is termeli, át tud jutni a vér-agy gáton és a memóriefunkciókban fontos szerepet tölt be. Az inzulinrezisztencia, a GLUT1-3 receptorok számának csökkenése az érrendszeri hypoperfúzió mellett szintén felelős az AD kialakulásáért is.

Diabéteszben az inzulinszignál károsodása jellemző, a glükóz nem jut be a sejtbe, ezáltal a szöveti sejtek nagy része éhezik. A sok esetben magas vércukorszint mellett a vörösvérsejtekben megemelkedik a glikált hemoglobin frakció, melynek leggyakrabban mért formája a hemoglobin A1c (HbA1c). A glükóz GLUT1 inzulinfüggetlen glükóz transzporterrel bejut a vörösvértestekbe, majd egy nem-enzimatis folyamat során reagál a hemoglobinA béta láncában található N-terminális valinnal. A HbA1c a vörösvérsejt egész élettartama alatt képződik és jellemzően annak végén szabadul csak meg tőle. Ezáltal kijelenthető, hogy a HbA1c mérésével az elmúlt 2-3 hónap átlagos glükózkoncentrációja monitorozható. Szintjét befolyásolja a nem, a rassz, a táplálkozás, bizonyos kórállapotok, mint az anaemia vagy a vesebetegség. Referencia értékét százalékos formában, mg/dl-ben vagy mmol/mol-ban adják meg. A normál tartománya 5,7% alatt van, 6,4%-ig prediabéteszről beszélünk, míg 6,5% fölött kimondható a cukorbetegség diagnózisa. Ismételt, napközben több alkalommal mért, vagy folyamatos glükózmonitorok adatai alapján meghatározható az átlagos glükózsztint, amiből eddig elsősorban lineáris egyenleteken alapuló számítások segítségével a HbA1c szintjére lehet következtetni és fordítva. Azonban a mért és a számított értékek gyakran eltértek egymástól; ezt hemoglobin glikációs indexnek nevezték el (HGI). Jelentősége abban rejlik, hogy mind a túl-, mind pedig az alábecsült HbA1c nem vezet megfelelő terápiához. Ha a megfigyelt HbA1c magasabb, mint a becsült, akkor a pozitív HGI-vel rendelkező betegek nagyobb valószínűséggel szenvedhetnek a szövődményektől az elégtelen terápia miatt, míg a negatív HGI-vel élő betegek szintén rossz prognózisra számíthatnak. A HGI értéke és pontossága tehát a HbA1c és az AG értékektől, vagyis a használt modell pontosságától függ. Figyelembe véve a HbA1c bonyolult képződését és a folyamat lassú, fokozatos voltát, illetve a változó plazmaglükóz-koncentrációkat, a jelenlegi lineáris modellek nem tökéletesek. Ismert, hogy a glükóz membrántranszportja MM kinetikát követ, így ez lehet főként felelős a glükóz – HbA1c görbe alakulásáért.

CÉLKITŰZÉSEK

Az MM enzimkinetikai modell időtállósága napjainkban is megmutatkozik. Tekintettel arra, hogy a diabétesz és az Alzheimer betegség népbetegségnek számít, egymással szoros kapcsolatban áll, célunk az volt, hogy a mind az alapkutatás területén, mind a gyakorlatban már jelenleg is használható összefüggésekre tárjunk fényt.

A dolgozat első felében neuroblasztóma sejt vonal hypoglikémia-tűrését vizsgáltuk, melyre hat különböző glükózkoncentrációjú médiumot használtunk föl, amikben az SH SY5Y sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk. Pontos céljaink a következők voltak:

- *A sejtek metabolizmus-változásának vizsgálata, a hosszabb idejű hypoglikémiás környezethez történő alkalmazkodás során.*
- *A sejtek energiaháztartásának monitorozása.*
- *A morfológia, az életképesség és a proliferációs ráta követése.*
- *Az O-Glikoziláció dinamikájának feltérképezése, egy kritikus glükózkoncentráció meghatározása, ahol a sejtek az alkalmazkodó képességük maximumát elérik.*

A tézis második felében a plazma glükóz és a HbA1c kapcsolatát kívántuk megvizsgálni, mert feltételezésünk szerint az eddigi lineáris modellezés helyett a nem-lineáris modell használata pontosabb eredményeket szolgáltathat. Tehát céljaink a következők voltak:

- *A Michaelis-Menten kinetikán alapuló HbA1c képződés bizonyítása klinikai laboratóriumi adatok elemzésével.*
- *A vércukor és HbA1c konverziós egyenlet pontosítása és a diabetes miatti fehérje károsodás becslésének javítása.*

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. Sejtkultúra, kezelési mód

SH-SY5Y neuroblastoma sejtvonalat (ATCC CRL-2266 emberi neuroblasztóma) használtunk. EMEM-Ham's F12 1:1 arányú médiumban tenyésztettük, kiegészítve 10% főtális marha szérummal, antibiotikummal és 1% esszenciális aminosavakkal, majd ezt követően azonos mennyiségű sejtet 6 különböző, egyenként 25 cm² alapterületű flaskába, vagy 6-, 24-, 96-lyukú sejtenyészítő lemezre osztottuk szét. A 65%-os konfluencia elérésekor, illetve a mért glükózfogyás alapján a Lineweaver-Burk diagram segítségével meghatározva az alkalmas időpontot, a sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk RPMI 1640 médiumban kiegészítve 10% főtális marha szérummal, 1% esszenciális aminosavval és 5 mM glükózzal. Az idő leteltét követően a médiumot RPMI 1640-re cseréltük 0,5-; 0,8-; 1,3-; 1,8-; 3- vagy 5 mM glükózkoncentráció beállítása mellett, 24 órára. (Korábbi kísérletsorozatokban az inkubációs idő eltérő volt, lásd. a teljes disszertációban.)

2. Sejtmorfológia és proliferáció

A sejtmorfológia és a proliferációs ráta követésére fáziskontraszt mikroszkópot (JuLi Stage Real Time Cell History Recorder (NanoEnTek) élőkép technológiával) 10x-es objektívnagyítással használtunk a 24 órás, különböző glükózkoncentrációjú (0,5-; 0,8-; 1,3-; 1,8-; 3- vagy 5 mM) médiumokban történő inkubáció alatt. A sejteket egy 24-lyukú sejtenyészítő lemezen inkubáltuk. Az eszköz az előzetesen beállított területekről 30 percenként fényképeket készített 24 órán keresztül. A hozzá tartozó szoftver a háttér és a sejtek denzitása alapján automatikusan kiszámította a proliferáció mértékét, ezt számszerűsítette, mely alapján a grafikon készítés a becsült sejtszódási rátáról Excel program használatával megtörténhetett.

3. Glükóz-, laktát-, és ATP mérés

Az EC glükóz- és laktát szinteket a kezelés előtt és után a médiumból mértük meg Cobas Integra® 400 plusz analizátorral (Roche, Németország) a gyártó utasításainak megfelelően. Az intracelluláris glükóz- és ATP szinteket Csepregi által bevezetett, minimálisan módosított protokollal vizsgáltuk. Egy 96-lyukú lemezre lyukanként átlagosan 400 000 sejtet helyeztünk el a kezelést megelőző napon. A detektáláshoz egy multimód lemezolvasót használtunk (Perkin Elmer EnSpire Multimode reader, Waltham, MA, USA).

Elméletileg 1 glükóz molekulából 2 laktát keletkezik, ezáltal a laktát konverziós rátáját kiszámíthatjuk az alábbi egyenlet segítségével:

$$\text{Laktát konverzió \%} = \frac{\text{laktát produkció}}{\text{átlagos glükóz fogyasztás} \times 2} \times 100$$

Teoretikusan az összes maximális ATP-termelés kiszámítható a glükóz- és a laktát koncentrációja alapján az alábbi egyenlettel:

$$\text{A glikolízisből származó ATP} = \frac{\text{laktát produkció}}{2} \times 2$$

$$\text{OxPhos-ból származó ATP} = \left(\text{glükóz fogyasztás} - \frac{\text{laktát produkció}}{2} \right) \times 28$$

$$\text{Totál ATP} = \text{Glikolízisből származó ATP} + \text{OxPhos-ból származó ATP}$$

Feltételeztük, hogy 2 ATP képződik a glikolízis során, 28 ATP az oxidatív foszforilációban (OxPhos) és azt, hogy a glükózt a sejtek kizárólag glikolízisre fordították. A glükózfelhasználás alapján Lineweaver-Burk diagramot készítettünk a K_m és V_{max} kiszámításához, amelyek 3,68 és 2,4552 értékekkel rendelkeztek. A kiszámított teoretikus glükózfelvételi sebességet összehasonlítottuk a mért sebességgel a MM kinetika alapján:

$$V_{act} = (V_{max} \times S) / (K_m + S)$$

(V_{act} : aktuális sebesség, V_{max} : a reakció maximális sebessége, S: szubsztrát koncentráció, K_m : az a szubsztrát koncentráció, amikor a reakció sebessége a V_{max} felére csökken)

4. Sejtviabilitás

Apoptózis vizsgálathoz a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid (MTT) tesztet (Millipore Sigma, Cikkszám: M2128) használtuk. A kezelést követően a sejteket háromszor mostuk egyszeres PBS oldattal, majd 150 μ l MTT oldatot pipettáztunk lyukanként a 96-lyukú sejtenyészítő lemezre. Négy órás inkubációt követően a keletkezett formazán kristályokat 100 μ l dimetil-szulfoxid (DMSO) oldatban oldottuk fel. Az abszorbancia értékeket 450 nm-en mértük multimód lemezolvasóval (Perkin Elmer EnSpire Multimode reader, Waltham, MA, USA).

5. Oxigénfogyasztás és extracelluláris savasodás mérése

A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk a fent ismertetett glükóztartalmú médiumban 6-lyukú lemezen, és a kezelés utolsó 3 órájában az oxigénfogyasztási rátát (OCR) és az EC acidifikációs rátát (ECAR) Agilent Seahorse Extracellular Flux (XF HS Mini Analyzer) Analizátorral (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) detektáltuk. Az eredményeket az adott proteinkoncentrációra normalizáltuk, melyet DCTM Protein Assay Kit II (Bio-Rad, Cikkszám: 5000112) segítségével határoztunk meg.

6. Az O-Glikoziláció dinamikájának követése, Western blot analízis

Az előkezelt sejteket felkapartuk a flaskák aljáról, majd háromszori PBS-ben történő mosást követően -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. Felolvasztást követően módosított RIPA pufferben tártuk fel, majd 10 perces 4 °C-on 3500 rpm-en történt centrifugálást követően a felülúszóból meghatároztuk a fehérje tartalmat DCTM Protein Assay Kit II (Bio-Rad, Cikkszám: 5000112) segítségével. Az egyszeri futtatásra szánt mintákat a legkisebb mért koncentrációra állítottuk be. Hagyományos Western blot esetében a lizátumokat Laemmli-pufferrel forraltuk fel 5 percre, míg a hagyományos módszerrel koherens, kapilláris alapú automatizált western blot rendszer esetében egy módosított puffert használtunk. A mintákat 8%-os SDS-PAGE gélen futtattuk meg, majd PVDF membránra blottoltuk. Antitestként az O-Glikozilációra specifikus RL2 antitestet, belső kontrollként anti-aktin IgG antitestet alkalmaztunk. Az inkubáció egész éjszakán át tartott 4 °C-on. Ezt követően a membránokat a megfelelő, tormagyökér peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 2 órán keresztül. Mosási lépéseket követően a kemilumineszcens detektálást Syngene G:boxxal, SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Fisher Scientific) szubsztráttal végeztük el. A 24 órás protokoll után WesTM-el (Bio-Techne, ProteinSimple, Cikkszám: 004-600), a gyártó utasításai szerint egy 12-230 kDa elválasztási modullal (ProteinSimple, Cikkszám: SM-W004) végeztük a futtatást és RL2, valamint GAPDH elsődleges antitestet használtunk, a gyári Anti-Mouse Detection Module (ProteinSimple, Cikkszám: DM-002) mellé. Az eszköz az előhívási lépéseket automatikusan elvégezte. A kapott képeket ImageJ szoftver segítségével elemeztük ki.

7. A vizsgált populáció

A laboratóriumunk információs rendszeréből (GLIMS) gyűjtöttük ki retrospektív módon a 2007. április 18. és 2021. április 6. között keletkezett mérési eredményeket. A beválasztási kritérium szerint egy rendelésnek egyszerre kellett tartalmaznia a hemoglobin-, a

plazmaglükóz- és a HbA1c értékeit. Ennek összesen 175,437 rendelés felelt meg, amelyek 46,646 alanyról tartalmaztak információt.

8. Vérminták gyűjtése

Perifériás vénás vérminták gyűjtéséhez kálium-etiléndiamintetraacetátot (K-EDTA) tartalmazó csöveket használtunk, melyből a CBC (komplett vérkép) mérését, ideértve a hemoglobint, illetve a HbA1c-analízist kiviteleztük. A plazmaglükóz méréséhez nátrium-fluoridot (NaF) tartalmazó csöveket használtunk. A CBC-t és a hemoglobint többparaméteres automatikus hematológiai analizátorokkal mérte a Cell-Dyn 3700 rendszer (Abbott Diagnostics, IL, USA), az ADVIA 120 és 2120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) és a SYSMEX XN-sorozat (Sysmex Corporation, Kobe, Japán). A plazmaglükózt különféle Cobas készülékeken detektáltuk: az Integra 400Plus, Cobas C502 és Cobas C702 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) a hexokináz módszert alkalmazza. A HbA1c-t először Modular P800 analizátoron mértük (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) immunoassay segítségével, majd egy Arkray ADAMS A1c (Arkray Inc, MN, USA) ioncserélő magas teljesítményű folyadékkromatográf (HPLC) analizátoron, illetve az utóbbi időben egy Tosoh G11 (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japán) ioncserélő HPLC analizátoron (interassay variabilitás 0,6% HbA1c esetén 31 mmol/mol, 0,5% HbA1c esetén 84 mmol/mol).

9. A kinetikus modell

A HbA1c képződését a vörösvérsejtekben három folyamat határozza meg: a glükóz bejutása a sejtekbe, a béta-lánc N-terminális valinjának nem-enzimatis glikációja, és a vörösvérsejt eliminációja. Ezek közül a glükóz membrántranszportja az egyetlen, amelyet a MM kinetika szabályoz. A nem-enzimatis glikáció pszeudoelsőrendű kinetikát követ, míg a vörösvérsejt eliminációja állandó sebességgel jár. Ezáltal a plazmaglükóz - HbA1c görbe alakja a MM egyenlettel modellezhető, míg a nem-enzimatis glikáció és az elimináció leginkább oldalirányban tolhatja el a görbét. A modell a következő egyenlettel írható le:

$$\text{HbA1c} = \frac{V_{\max} \times \text{pGlc}}{K_m + \text{pGlc}}$$

ahol a pGlc a plazmaglükóz, a V_{\max} a HgbA1c maximális aránya, és azt a tanulmányban résztvevő populáció számára a Lineweaver-Burk diagram segítségével határoztuk meg. Ha a V_{\max} -ot fix értékre állítjuk be, és a plazmaglükóz- és HbA1c-szinteket egyidejűleg mérik, akkor

kiszámíthatjuk a Michaelis-állandót (K_m). A HbA1c-termelés kinetikájának inter- vagy intraindividuális különbségeit a K_m jellemzi. Összehasonlításképpen, a HbA1c lineáris előrejelzéséhez az ADAG által közölt egyenletet használtuk:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{pGlc (mM)} - 0,8317}{0,14545}$$

Itt a pGlc a három hónap alatt mért plazma glükóz szintek átlagát jelöli. Tanulmányunk retrospektív volta miatt az átlagos glükózt az aktuális plazmaglükóz szintekkel helyettesítettük. A vizsgált populációban az általános gyakorlat az éhgyomri, 10-12 órás éhezést követő mintavétel (az inzulin terápiában részesülő betegeket kivéve). Az eredetileg alkalmazott ADAG által közölt egyenlet nem veszi figyelembe a korábbi adatokat az MM egyenlettel ellentétben, ezért a HGI értékeket kiszámítottuk az ADAG által előrejelzett HbA1c-ből kivonva a mért HbA1c-t. Ezután az aktuális ADAG előrejelzést korrigáltuk az előző HGI átlagával. Amikor a HbA1c-t az MM egyenlettel becsültük meg, az előző mérésből számított átlagos K_m értéket helyettesítettük az aktuális számításba.

10. Statisztikai elemzés

A sejtes modell esetében az adatok elemzéséhez az SPSS20 programot használtuk, az eredményeket átlagok és \pm szabványos deviációk (SD) értékek formájában adtuk meg. Az összehasonlításokat egyutas ANOVA-val végeztük és szignifikáns különbségek esetén ($p < 0.05$) Bonferroni, illetve Dunnett T3 post hoc tesztek alkalmaztunk.

A nem-lineáris kinetikus modell esetén korrelációs-, regressziós- és ROC-görbe elemzéseket végeztünk az SPSS20 szoftver segítségével. Az egyéni ROC-görbék összehasonlításakor a MedCalc Statisztikai Szoftvert használtuk a DeLong teszt elvégzésére. Az eredményeket átlag és \pm SD értékek formájában mutatjuk be.

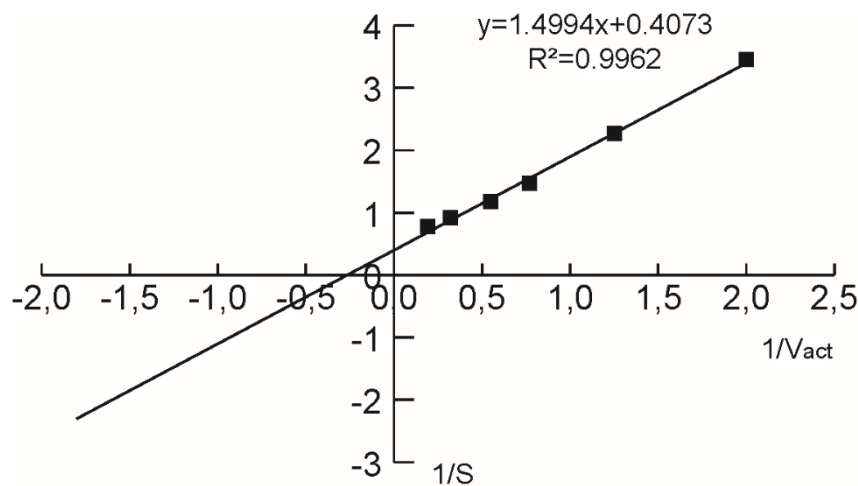
EREDMÉNYEK

Hypoglikémia hatásának vizsgálata sejtes modellen

1. Alkalmazkodás a MM kinetikához

Célunk egy viszonylag hosszabb ideig tartó, a hypoglikémiás környezethez történő alkalmazkodást lehetővé tevő kísérletsorozat felállítása volt, mely által az AD-hez hasonlóan

követhetőek a lassú progresszió által kiváltott válaszok. Az SH SY5Y sejtek duplikációs idejét figyelembe véve ezt az időintervallumot 24 órában határoztuk meg. Kezdetben a médiumban hat glükózkonzentrációt állítottunk be, melyet ismételten kontrolláltunk. Ezt követően a 24 óra letelte után ismét megmértük a glükóz és a laktát szinteket, melyekből kiszámíthatóvá vált a glükóz fogyás és a laktát termelés mértéke. Azt találtuk, hogy a glükózfogyasztás jelentősen alacsonyabb volt a 0,5 és a 0,8 mM glükózzal kiegészített médiumban tenyésztett sejtek esetében az 5 mM glükózzal kezeltékhez képest (0,29; 0,44 vs. 1,29 mM). Továbbá, a glükóz kimerülése, mint az EC glükóz koncentrációjának függvénye, nem-lineáris kapcsolatot követett. Mivel a glükóz transzporterek és minden glikolitikus lépés MM kinetikát követ, adatainkat Lineweaver-Burk diagramon ábrázoltuk. (*1. ábra*)

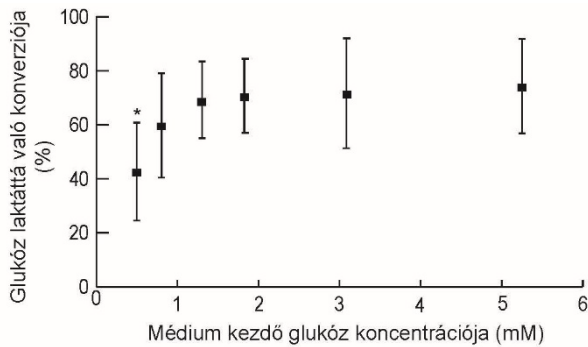


1. ábra: A glükóz felhasználás alapján felvett Lineweaver-Burk diagram. A MM kinetikát követve a V_{max} és a K_m kiszámítható.

Kísérletes eredményeink szorosan illeszkedtek az MM kinetikus görbéhez. A görbétől való átlagos eltérés 0.65% ($\pm 5.91\%$) volt. Megállapítottuk, hogy kísérleti körülményeink mellett a K_m 3.68 mM (95% CI, 3.089 – 4.554 mM) és a V_{max} 2.4552 mM (95% CI, 2.0755 – 3.005 mM) értéket vett fel, mely az SH SY5Y sejtvonalra jellemző. A MM kinetika alapján a glükózfogyasztás alacsony EC glükózszinteken gyorsan csökken. Normoglikémiás körülmények között az SH-SY5Y sejtek a glükózt laktáttá majdnem sztöchiometriás arányban alakítják át (~70-80%). Megállapítottuk, hogy ez az arány csökkenni kezd ~1,8 mM EC glükózkonzentráció alatt, míg felette viszonylag változatlan marad. Azaz a laktát-konverziós arány 73.8% ($\pm 17.4\%$), 70.3% ($\pm 13.7\%$) és 42.35% ($\pm 18\%$) volt 5-, 1,8- illetve 0,5 mM glükóz tartalmú médiumban inkubált sejtekben.

Az anyagcserében a glikolízis és az oxidatív foszforiláció metabolikus hozzájárulását is értékeltük az Oxigénfogyasztási ráta (OCR) és az EC savasodási ráta (ECAR) mérésével.

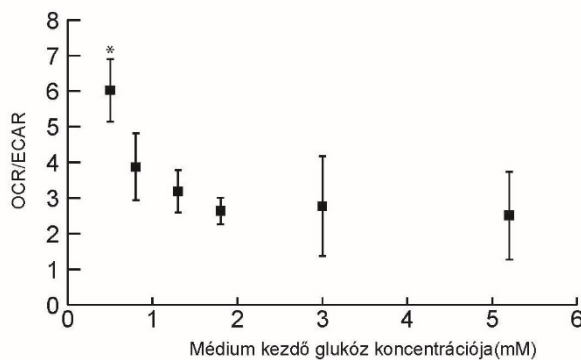
Hasonlóan a laktát-konverziós arányokhoz, az OCR/ECAR arány nem változott 5 mM – 1,8 mM között, de 1,8 mM EC glükózsztint alatt fokozatosan nőtt. A 0,5 mM glükóz tartalmú médiumban kezelt sejtek esetében lényegesen emelkedett, 3-szorosan magasabb OCR/ECAR aránya volt, az 5 mM glükózzal kezelt sejtekhez képest. (2. ábra) Tehát a glikolízis az EC glükóz koncentráció csökkenésével töredékére redukálódott.



2.ábra:

Felül: Glükóz konverzió laktáttá 24 órás inkubációt követően. n=7

Alul: Normalizált OCR/ECAR arányok. A normalizáció a lyukanként mért proteinkoncentrációra történt a kísérlet befejeztével. *p<0.05 a kontroll 5 mM-os glükózkoncentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA és Bonferroni post hoc teszt alkalmazásával. n=3



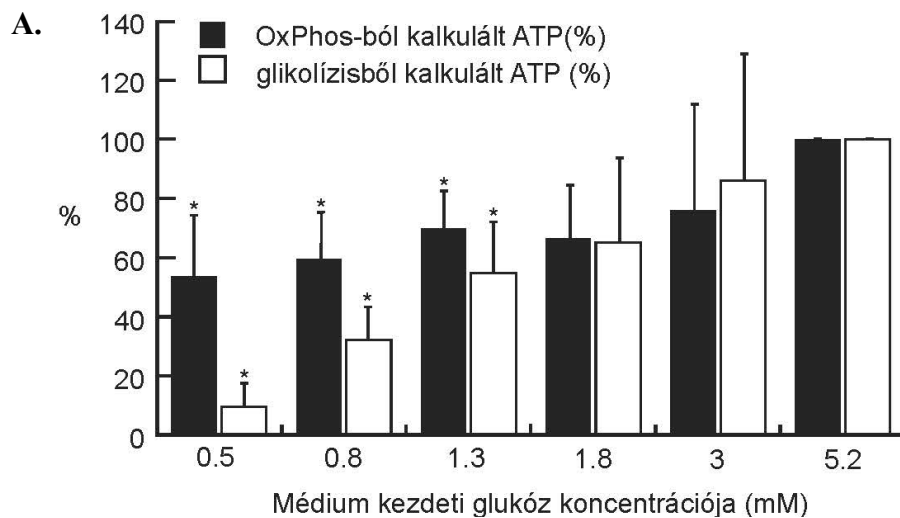
2. Intracelluláris glükózsztint mérése

Az intracelluláris (IC) glükózsztint jelzi a glükóz bejutása és az IC glükóz-felhasználó folyamatok összessége közötti nettó egyensúlyt. Eredményeink szerint nem volt jelentős különbség az EC glükózfeltételek között - azaz a sejtek konstansan tartották az IC glükózsztintjeiket. Úgy tűnt, hogy van egy alap IC glükózsztint ~10 µM körül, amely egyik esetben sem csökkent ez alá, míg az "extra" mennyiségű EC glükóz (~3 mM és felette) növelte az IC glükózsztintet is.

3. ATP szintek meghatározása

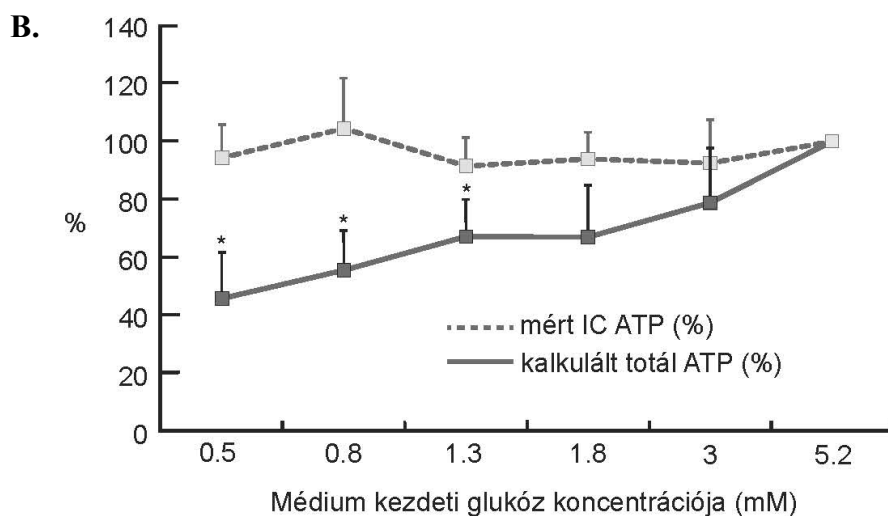
A glükózfogyasztás és a laktát termelés adatainak felhasználásával kiszámoltuk a maximálisan elérhető ATP szintet, feltételezve, hogy mind a glikolízis, mind az oxidatív foszforiláció a teoretikus maximális hatékonyságot éri el (3. A. ábra). Megállapítottuk, hogy a sejteknek

jelentős tartalékaik vannak az ATP szint fenntartásához az oxidatív foszforilációs ráta növelésével. Tehát, elméletileg az 1,8 mM-nál alacsonyabb EC glükózsztintnek kitett sejt jelentősen növelheti az ATP szintjét a laktát felhasználásával és az oxidatív foszforiláció növelésével. Hogy teszteljük ezt az elméletet, megmértük az effektív ATP szintet a sejtekben (**3. B. ábra**). Meglepő módon az anyagcsereadaptáció nemcsak csökkentette a fogyó energiaforrások hatását, hanem az ATP szintek állandóak maradtak, illetve a mért ATP szintek nem különböztek jelentősen egyik esetben sem. Ez arra utalhat, hogy más adaptációs mechanizmusok is jelen lehetnek az OCR/ECAR-n kívül.



3. A. ábra: Az OxPhos-ból és a glikolízisből kiszámított teoretikus ATP szintek arányai.

* $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkonzentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA és Dunnett T3 post hoc teszt alkalmazásával. $n=5$



3. B. ábra: A mért és a számított totál ATP szintek aránya. * $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkonzentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA, Dunnett T3 post hoc test alkalmazásával. $n=5$

4. Sejtviabilitás vizsgálata

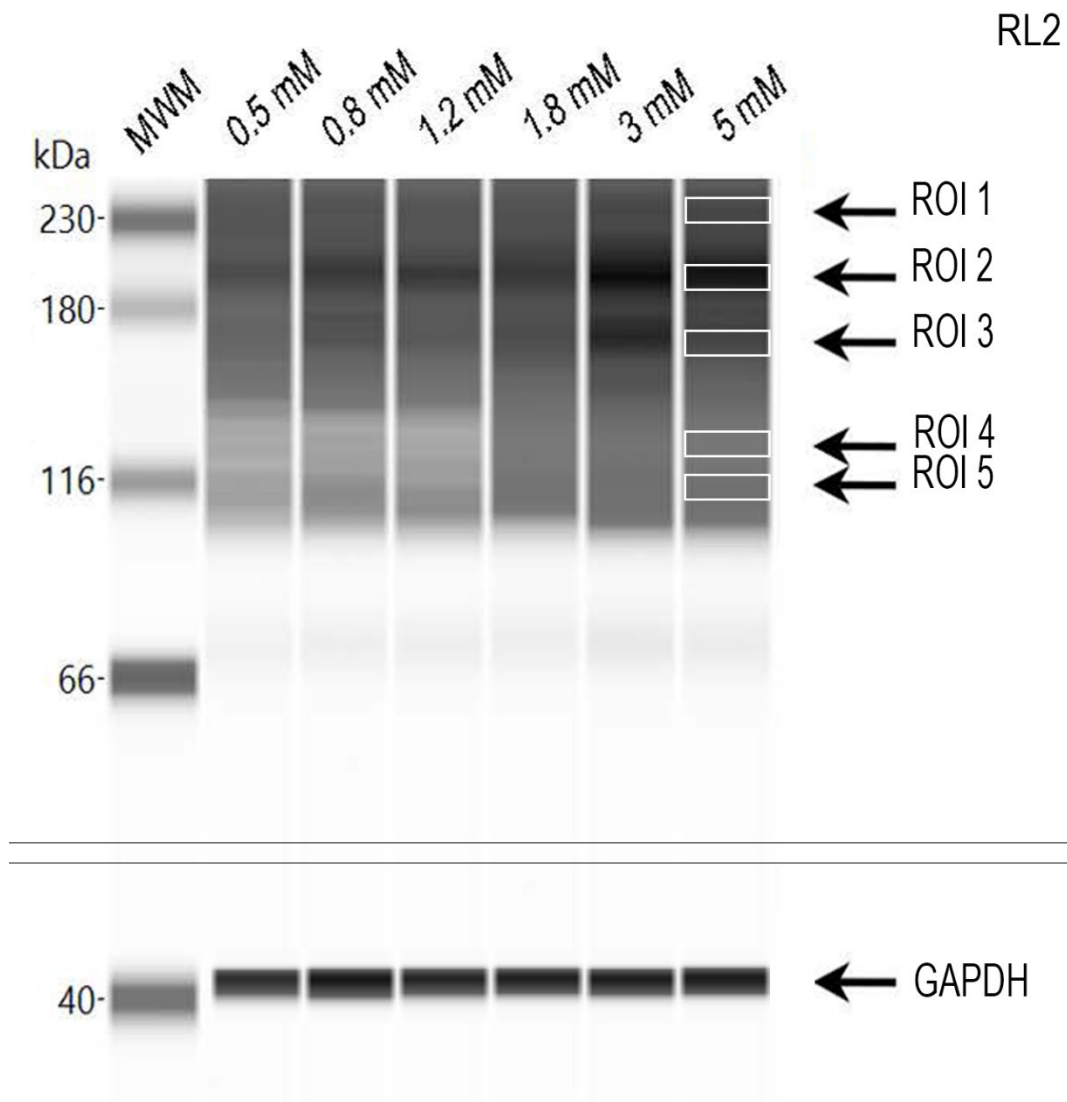
A sejtek életképességét MTT reakcióval mértük meg. Jelentős különbségek csak a 0,5 mM és a 3 mM vagy 5 mM glükóz tartalmú médiumban tartott sejtek esetében mutatkoztak, míg a többinél nem detektáltunk változást. Az átlagos csökkenés 17.8% ($\pm 9.5\%$) volt a 0,5 mM-os esetben.

5. A sejtproliferáció és morfológia vizsgálata

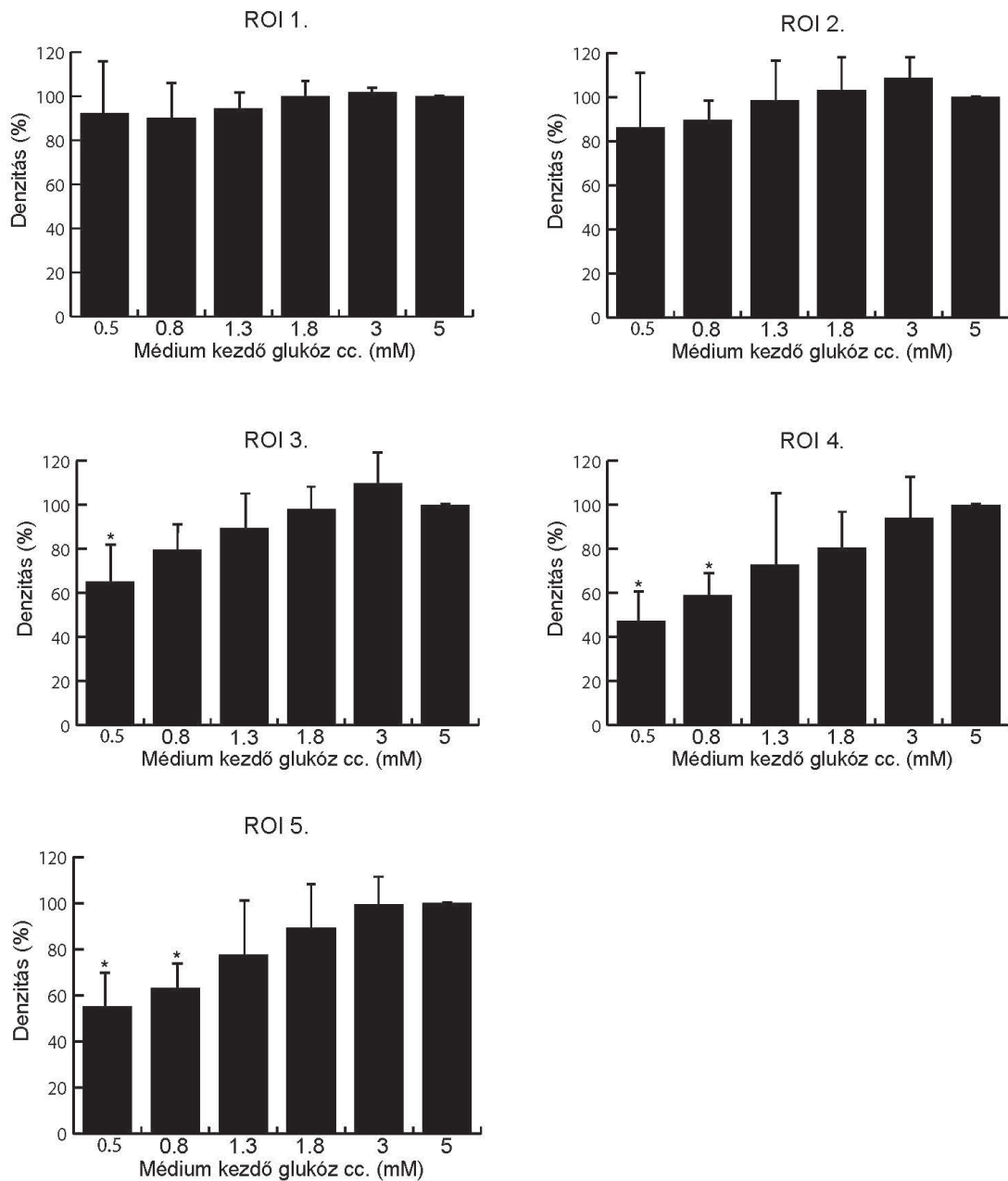
Ellentétben egy primer idegszövettel, az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek rendelkeznek mitotikus aktivitással, amelyet a glükóz elérhetősége befolyásolhat. Ezért értékeltük a sejtosztódási arányt JuLi mikroszkóppal. 24 óra elteltével a 0,5 mM és a 0,8 mM glükózzal kezelt sejtek becsült osztódási aránya jelentősen lassabb volt az 5 mM glükóz tartalmú médiumban inkubált sejtekhez képest ($p=0,007$, illetve $p=0,027$). A közvetlen mikroszkópos megfigyelés szintén egyértelműen kimutatta a sejtek lassabb mitotikus aktivitását hypoglikémiás körülmények között, azonban morfológiai változásokat nem találtunk a különböző kezelések között, noha ez utóbbi nem tekinthető teljesen objektívnek.

6. Az O-Glikoziláció vizsgálata

Az O-GlcNAc szinteket Western blotokkal igazoltuk. (5. *ábra*) Öt régiót (ROI 1-5) választottunk ki az RL2 antitest által jelölt fehérjék közül, amelyek kb. $\sim 100 - 230$ kDa közötti molekulásúly tartományban találhatóak, hogy elemezzük a különböző hypoglikémiás (0,5 – 3 mM) körülmények hatását 24 órás időtartamon belül a normoglikémiás (5 mM) körülményekhez viszonyítva. (6. *ábra*) Az O-GlcNAc szintek szignifikánsan csökkentek a 0,5 mM EC glükózzal kezelt sejtekben a ROI 3 -5 területen ($65\% \pm 17,68$). A ROI 4-5 területen az O-GlcNAc szintje a 0,8 mM EC glükózzal kezelt sejtekben is szignifikánsan csökkent (ROI 4, 0,5 mM: $47,34\% \pm 12,94$; 0,8 mM: $59,02\% \pm 9,28$; ROI 5, 0,5 mM: $55,23\% \pm 14,73$ és 0,8 mM: $63,1\% \pm 10,84$) a kontrollkörülményekhez viszonyítva.



5. ábra: Reprezentatív Western blot a totál SH SY5Y sejtlizátumból a 24 órás kezelést követően *WesTM* segítségével. Az O-Glikoziláció mértékét RL2 antitest használatával határoztuk meg, míg a GAPDH-t szintén antitesttel detektáltuk.

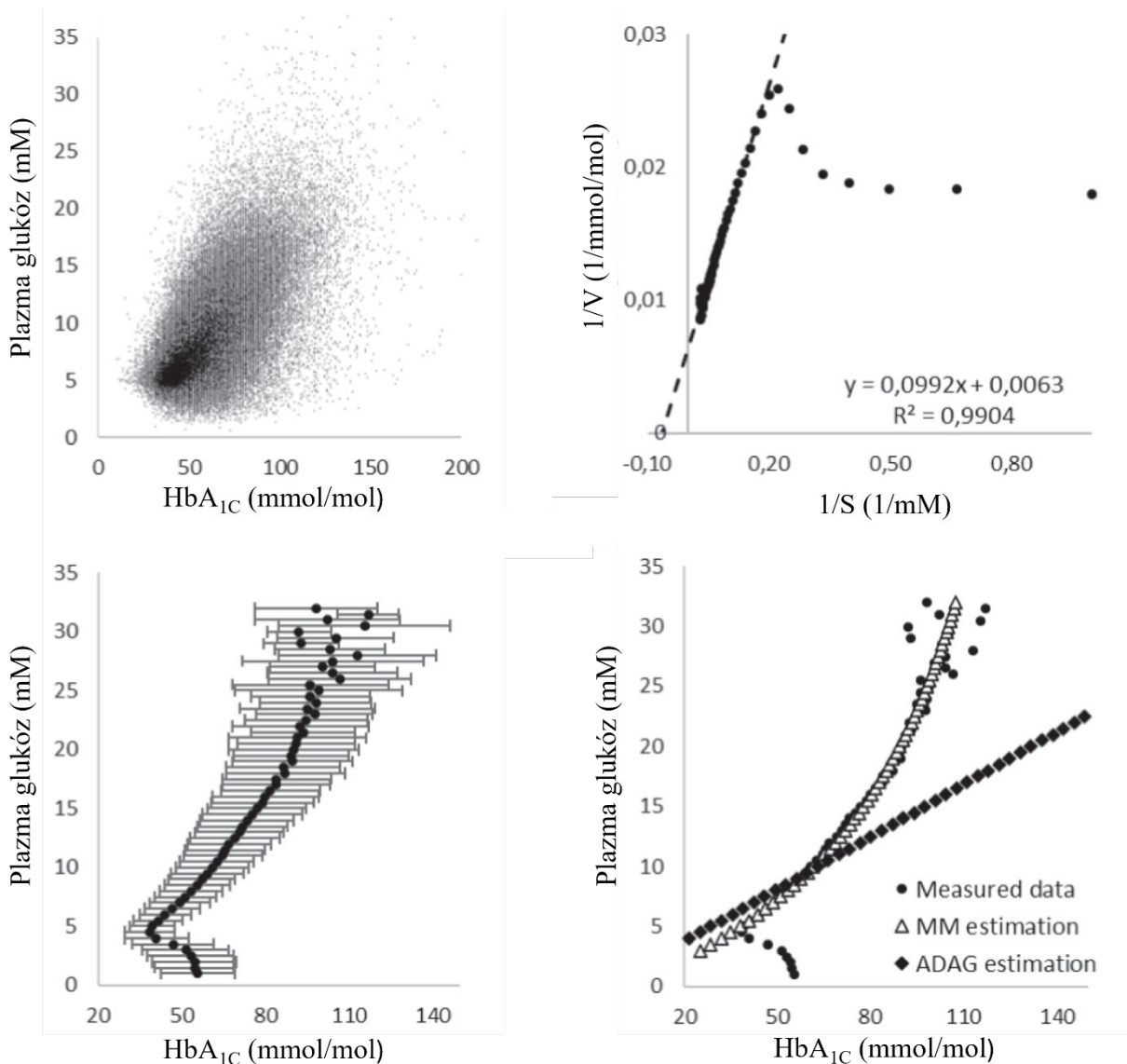


6. ábra:

A Western blot régiók elemzése. Az O-glikozilációt RL2 antitest segítségével határoztuk meg, kontrollként a GAPDH antitest szolgált. Az adatokat ImageJ szoftverrel analizáltuk. Az ábrákon a régiók denzitását %-ban határoztuk meg a kontrollhoz viszonyítva (5 mM) és SD értékekkel együtt ábrázoltuk a médium kezdeti glukóz koncentrációinak (cc.) függvényében. Statisztikai tesztként egyutas ANOVA-t használtunk, Bonferroni post hoc tesztel kiegészítve. * $p < 0.05$ $n=6$

A plazma glükóz és a HbA1c kapcsolatának modellezése

Retrospektív módon elemeztünk 15 év alatt összegyűlt 175437 rögzített laboratóriumi eredményt, amelyek egyszerre tartalmaztak plazma glükóz és HbA1c adatokat. Az összes beteg száma 46646 volt, az egy személyre eső átlagos vizsgálatok száma 3,76 volt. A látogatások között eltelt átlagos idő kb. 10 hónap volt. 4686 beteg 10 vagy több bejegyzéssel rendelkezett, a bejegyzések között eltelt átlagos idő 6,2 hónap volt (a magyar egészségbiztosítás évente legfeljebb 4 db HbA1c tesztet finanszíroz). A 7. A ábra mutatja a mért plazma glükóz és HbA1c eredmények eloszlását.



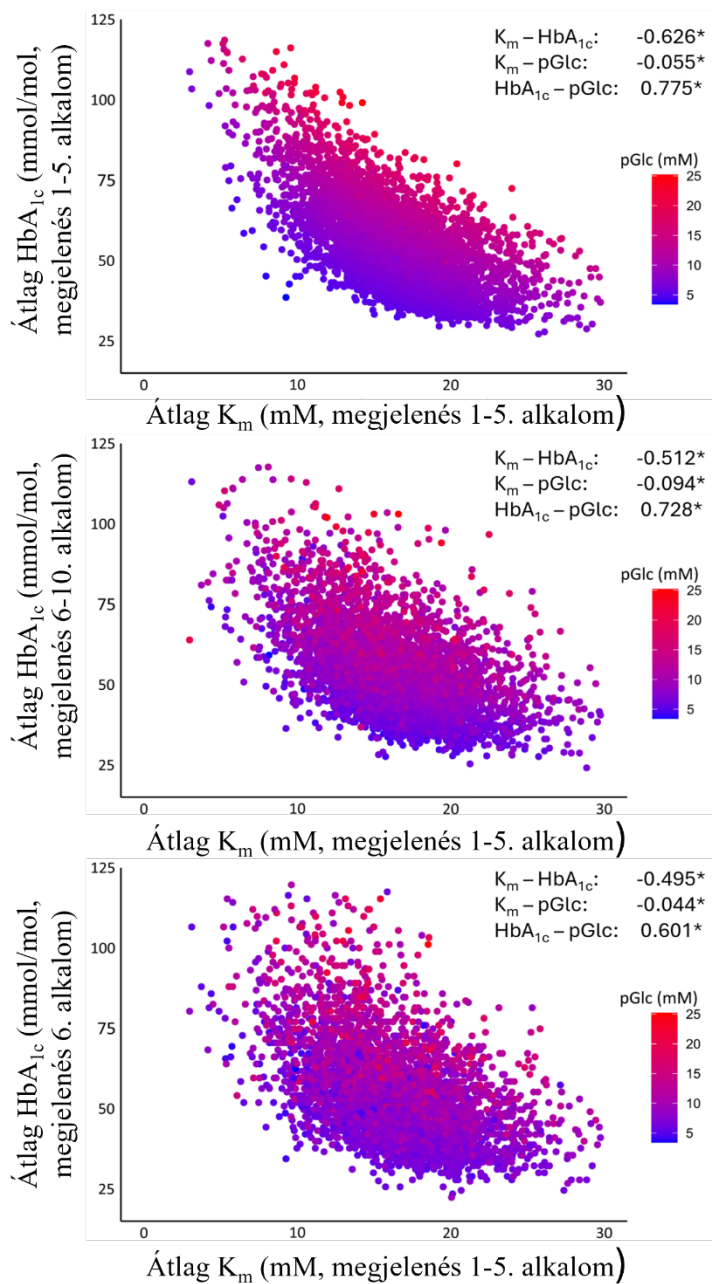
7. ábra: A HbA_{1c} és a vele egyidejűleg mért plazmaglükóz-szintek közötti kapcsolat. (A) Nyers adatok, 175 437 esemény ábrázolva. (B) Átlagos (\pm SD) HbA_{1c} értékek bemutatása. Minden adatpont egy 0.5 mM plazmaglükóz-koncentrációs tartományt képvisel. (C) Lineweaver-Burk ábra az HbA_{1c} kinetikájáról. Az átlagos HbA_{1c} szintek reciprok értékei ($1/v$) vannak kijelölve a

megfelelő plazmaglükóz-szintek reciprok értékeivel szemben (1/S). (D) Az átlagos HbA_{1c} értékek előrejelzése a MM ($V_{max} = 158,7$ mmol/mol és $K_m = 15,7$ mM) és a lineáris (ADAG) egyenlet által az észlelt átlagos HbA_{1c} értékekkel összehasonlítva.

A HbA_{1c} eredményeket a megfelelő plazmaglükóz-értékekkel vetettük össze; minden kategóriát egy 0,5 mM-os plazmaglükóz-tartománnyal határoztunk meg. Ahogy a **7. B. ábrán** látható, az átlagos HbA_{1c} értékeknek látszólag van egy maximális határértéke. Az átlagos HbA_{1c}- és plazmaglükóz értékek Lineweaver–Burk ábrán történő ábrázolásakor (**7. C. ábra**) az adatok lineáris mintázatot mutattak 5–32 mM glükózértékek között, ami arra utal, hogy a HbA_{1c} képződése a Michaelis-Menten (MM) kinetikát követi. A lineáris trendvonal interpolálásával a V_{max} értéke 158.7 mmol/mol (95% CI, 112.5–269.5 mmol/mol), míg a K_m értéke 15.7 mM volt (95% CI, 15,2–16.3 mM). Ezt a K_m értéket a teljes populáció átlagának tekintve megállapítottuk, hogy az MM által előrejelzett HbA_{1c} szintek szorosan illeszkedtek a ténylegesen mért átlagos szintekhez (**7. D. ábra**). Teszteltük az MM egyenlet prognosztikai potenciálját az egyén szintjén. Az első öt adatpár felhasználásával kiszámítottuk az átlagos K_m paramétert. Ezután az elvárt HbA_{1c} szinteket a 6. látogatás glükózkoncentrációja alapján számoltuk ki, vagy az MM egyenlet vagy az ADAG egyenlet segítségével. Az MM egyenletnek jobb prognosztikai ereje van, azonban mindkét egyenlet prognosztikai ereje az idő előrehaladtával csökken, ami arra utal, hogy az egyedi K_m érték folyamatosan változhat. Ez ellensúlyozható, ha az egyes látogatások alkalmával frissítésre kerül. A K_m viszonylagos stabilitásának további bizonyítása végett, ábrázoltuk a K_m értékeket (az első 5 látogatás átlaga) az első 5 látogatás átlagos HbA_{1c} értékével, a 6. látogatással és a második 5 látogatás átlagával. Az adatpontokat színekkel kódoltuk a megfelelő, átlagos plazmaglükózszerint (**8. ábra**). Ahogy azt vártuk, a magasabb plazmaglükóz koncentrációval rendelkező betegek általában magasabb HbA_{1c} szintekkel rendelkeztek. Érdekesség, hogy a K_m -nek látszólag fokozatos, fordított kapcsolata van a HbA_{1c}-vel. Az MM egyenlet prediktív potenciálját az egyéni K_m értékek alapján ROC elemzéssel értékeltük (**9. A. ábra**), a pozitív osztályozás cutoff értéke 37.7 mmol/mol volt. Ebben a összehasonlításban az MM jelentősen különbözött ($p < 0.0001$) és jobban teljesített, mint az ADAG.

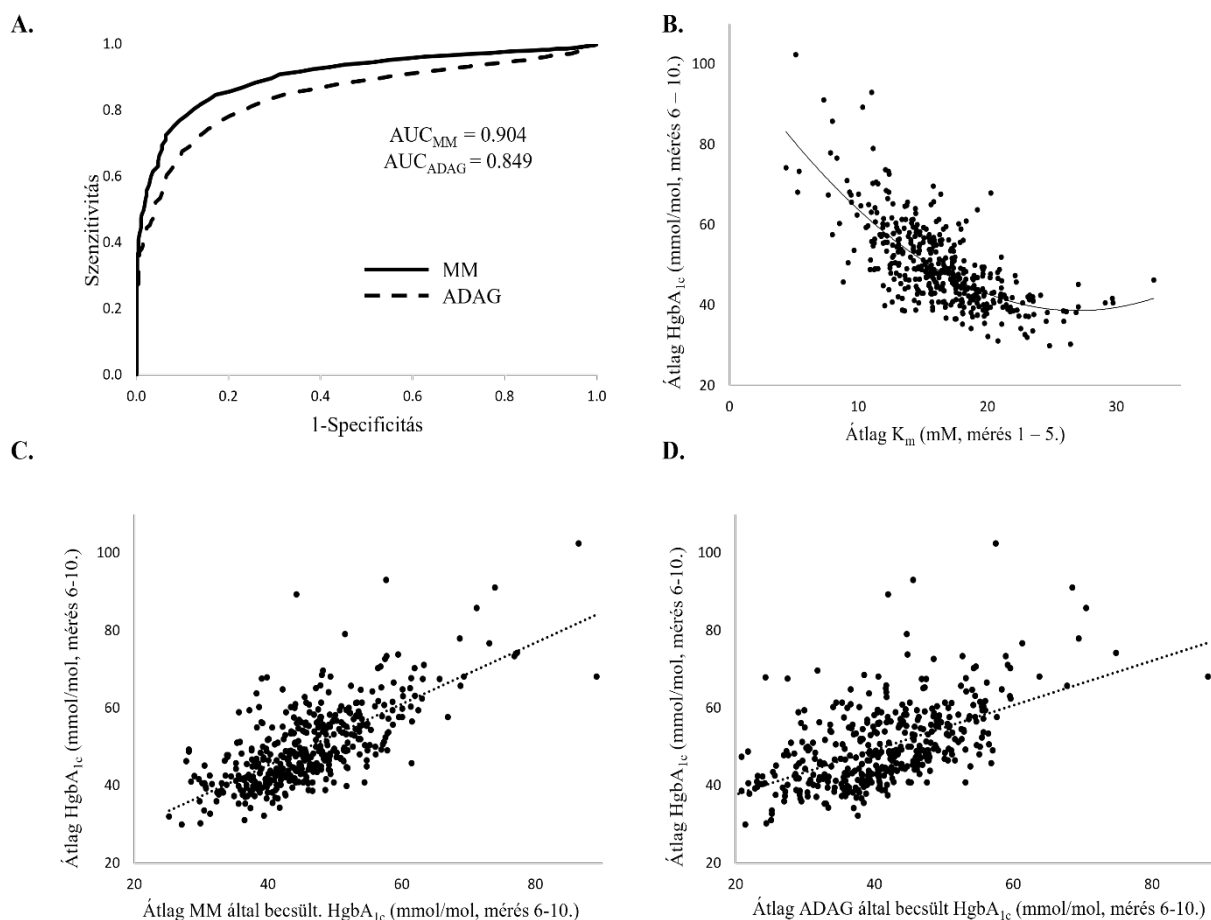
Az MM prognosztikai értéke akkor tűnik ki igazán, amikor a betegeknél az idő múlásával nagy változások történnek a plazmaglükóz szintekben. A **9. B. ábrán** látható azon betegek első 5 mérésének átlagos K_m értéke a második 5 mérésnek az átlagos HbA_{1c} szintjeinek a függvényében, akiknél az 1–5 látogatások során a glükózszerint 7 mM fölött volt, majd a továbbiakban átlagosan 7 mM alatti értéket vett föl. Annak ellenére, hogy jelentős csökkenés

történt a glükózsztintekben, a K_m érték továbbra is negatív korrelációt mutatott a mért HbA_{1c} -vel. Amikor ezeket a K_m értékeket (az 1-5. látogatás átlaga) a tényleges glükózkoncentrációkkal (6-10. látogatás) együtt beillesztettük az MM egyenletbe, hogy kiszámítsuk a 6-10. látogatásra vonatkozó becsült átlagos HbA_{1c} -értéket, az szignifikáns összefüggést mutatott a mért HbA_{1c} -szintekkel ($r^2 = 0,52$) (9. C. ábra). Ugyanazokat a kiválasztási kritériumokat alkalmazva az ADAG-előrejelzésnek az átlagos HGI-vel (az 1-5. látogatásból) korrigált értéke alacsonyabb determinációs együtthatóval rendelkezett. ($r^2 = 0.312$) (9. D. ábra)



8. ábra:

Korreláció a HbA_{1c} , a K_m és a plazmaglükóz szintek között. $N = 4686$, illetve legalább 10 látogatással rendelkező egyének lettek kiválasztva. Az adatpontokat szinkódoltuk a 6. látogatás plazmaglükóz (pGlc) szintje szerint. Az egyes adatpárokhoz a Spearman's rho korrelációs együtthatókat tüntettük fel, a szignifikanciát csillagokkal jelöltük. (A) Az első 5 látogatás átlagos HbA_{1c} és K_m értékeinek ábrázolása. (B) A második 5 látogatás átlagos HbA_{1c} értékei az első 5 látogatás átlagos K_m értékeivel vannak összevetve. (C) A 6. látogatás HbA_{1c} értékét az első 5 látogatás átlagos K_m értékeivel hasonlítottuk össze.



9. ábra: Az MM és ADAG becslések prediktív ereje. (A) A 4686 egyed egymást követő rekordjai alapján készült előrejelző Receiver-operating curve (ROC-görbe) elemzése. Az MM-számításhoz a személyre szabott K_m -értékeket úgy választottuk, hogy az első 5 látogatás K_m -értékeinek átlagát vettük alapul. Ezeket a K_m -értékeket és a 6. látogatás mért plazma glükózszintjeit helyettesítettük be az MM egyenletbe. Az ADAG-számításhoz a 6. látogatás plazma glükózszintjeit beillesztettük a lineáris egyenletbe, és a számítást korrigáltuk az első 5 látogatás HGI-értékének átlagával. A függő változó a 6. látogatás mért HbA_{1C} -szintje volt. (B) Azokat az egyéneket választottuk ki, akiknek átlagos glükózszintje az első 5 vizit során 7 mM-nál magasabb volt, de a második 5 vizit során 7 mM-nál alacsonyabb ($N = 427$). A K_m -értékeket az első 5 vizit során mért HbA_{1C} - és plazma glükózértékek felhasználásával számítottuk ki, és ábrázoltuk a második 5 vizit során mért HbA_{1C} -értékek átlagának függvényében. (C&D) A B. pontban szereplő adathalmazzal megegyezően az MM és ADAG (HGI-vel korrigált) számításokkal előre jelzett HbA_{1C} -szinteket hasonlítottuk össze a mért HbA_{1C} -szintekkel (MM: $R^2 = 0,517$, $P < 0,001$, ADAG: $R^2 = 0,312$, $P < 0,001$, lineáris regressziós modell).

MEGBESZÉLÉS

Az AD és a diabetes népbetegségnek számít, ezért a kialakulásukhoz vezető út pontos feltérképezése ugyanúgy a felelősségünk, mint a terápia kivitelezése. Amennyiben sikerül a betegséghez vezető folyamatot jobban megértenünk, talán a magyarázatok mellett könnyebben találunk eszközöket a megelőzésükre is.

Dolgozatom első felében az ismertett sejtes modell segítségével kívántunk pontosabb ismereteket gyűjteni az idegi eredetű sejtek metabolikus viselkedéséről, amennyiben a hypoglikémiás környezet lassan, fokozatosan alakul ki és viszonylag hosszú ideig fennáll. Ezáltal alapot szolgáltatathatunk az AD progressziójának pontosabb megértéséhez. Az irodalomban már találunk ezirányú kutatásokat. Az állatkísérletes modellek nehézsége, hogy a szervezet kompenzáló mechanizmusai az agyi glükózháztartás felborulása ellen hatnak. Ebből a szempontból a sejtes modellek kedvezőbbnek bizonyulnak, ha a háttérben húzódo biokémiai folyamatokat kívánjuk vizsgálni. Hyper-és hypoglikémia hatásának már több sejtsoportot kitétek és többek között az O-glikoziláció változásait is vizsgálták. Az eredmények azonban ellentmondásosak, mind hyper-, mind hypoglikémia esetén elsősorban az O-glikoziláció emelkedését tapasztalták. Ennek úgy gondoljuk, az lehetett az oka, hogy akut stresszreakciót indítottak el a sejtekben a gyors, illetve teljes glükózmegvonással. Jelen kísérletsorozatunkban az SH SY5Y sejtek 24 órás inkubációja során a fokozatosan csökkenő glükózkoncentráció hatására metabolizmusuk átrendeződésével válaszoltak. Az alkalmazkodásuk során az oxidatív foszforiláció és a glikoziláció aránya megváltozott; a glikoziláció erőteljesebben csökkent, mely magával vonta az OCR/ECAR hányados növekedését. Detektáltuk, hogy a glikolízisből származó ATP mennyisége jelentősebben csökken, mint az oxidatív foszforilációból származó ATP, mindamelllett, hogy ezek összesített szintje nem tért el jelentősen egymástól. Tekintettel arra, hogy a hexózamin útvonal egyik szubsztrátja, a fruktóz-6-foszfát szintén a glikolízisből származik, annak csökkenése magával vonhatja az O-Glikoziláció csökkenését is. Emellett a glükózfelhasználás alapján felvett Lineweaver-Burk diagramra a kísérletes eredményeink szorosán illeszkedtek ($R^2=0,9962$), az MM kinetikát követve a V_{max} és a K_m kiszámíthatóvá vált. Ezen értékek az adott sejtvonagra jellemzőek az ismertett kísérletsorozatban. A proliferáció követése során sejtek osztódási aránya csökkent, mely megfelel az irodalomban tapasztaltakkal, miszerint a sejtek mitotikus aktivitásának csökkenése a rendelkezésre álló glükóz fogyásával magyarázható. A neuroblasztóma sejtek a végsőig próbálnak alkalmazkodni a kedvezőtlen környezeti feltételekhez, így mind az ATP szintjüket, mind az intracelluláris glükóz szintjüket igyekeztek egy állandó szinten tartani, bár egyfajta tendencia

megfigyelhető volt: 3 mM glükózkoncentráció felett magasabb értékeket kaptunk, mely szerint az IC glükóz szintje ez alatt csökken, azonban még 0,5 mM esetén sem esik egy minimál szint alá (~10 μ M). Életképesség tekintetében a 0,5 mM-os glükózkoncentrációjú médiumban tartott sejtek esetén detektáltunk szignifikáns csökkenést. A kutatás korlátai közé tartozik, hogy a neuroblasztóma sejtvonal valószínűleg nagyobb adaptációs potenciállal rendelkezik, mint a primer neuronális sejtek, ugyanis ez utóbbiak főleg aerob módon az oxidatív foszforiláció által jutnak ATP-hez. Amennyiben a glükóz elérhetősége csökken, a neuronok az asztrociták segítségére szorulnak, amik glikogén tartalmukat képesek lebontani, azaz glikogén foszforilázzal glükóz-1-foszfáttá, majd foszfofoglukomutáz által glükóz-6-foszfáttá izomerizálni, ami a glikolízis során piruváttá oxidálódik és laktát dehidrogenáz (LDH) laktáttá alakítja. Az asztrociták nem expresszálnak glükóz-6-foszfátázt, ezért szabad glükózt nem tudnak az idegsejteknek szállítani, viszont a neuronok a laktátot már fel tudják használni, hogy energiaszükségletüket biztosítsa. Ugyan mindkét sejtípus tartalmaz laktát dehidrogenázt, de míg az asztrociták LDH5 izoformát, addig a neuronok LDH1-t, ami elsősorban a laktát piruváttá történő átalakítását végzi, ezzel is utalva az oxidatív metabolizmus túlsúlyára. Ezen enzimek izoformáinak expresszási aránya az agyi területtől függően szintén változik. A laktátot az asztrocitákból az MCT-1 exportálja és az idegsejtek MCT2-n keresztül veszik fel. A laktát transzportja erősen függ az EC pH-tól, ami magyarázhatja, miért emelkedik meg az agy laktát felvétele annak vérben történő felszaporodása során. E. Lezi és munkatársa, Swerdlow SH SY5Y sejteket kezeltek magas koncentrációjú laktáttal, és azt találták, hogy a sejtlegzés megnőtt, a bioenergetikai folyamatok az aerob irányba tolódtak, tehát a glikolízis mértéke csökkent az inzulinszignállal és az e folyamatokban szerepet játszó számos fehérje, illetve poszttranszlációs módosulások változásával együtt. Az általunk elvégzett kutatás során hasonló változást tapasztaltunk a metabolizmusban, azonban a laktát koncentrációja meg sem közelítette a fenti kezelésben alkalmazottat.

A jövőben tervezzük a fenti kísérletsorozatot elvégezni primer neuronális sejteken és asztrocitákon is. Emellett alternatív tápanyagok alkalmazását is megpróbáljuk, mint amilyen a β -hidroxi-butirát.

A disszertáció második részében szereplő tanulmányban megerősítettük, hogy a HbA_{1c}-szintek az MM kinetikával nagyobb pontossággal jósolhatók meg, mint a lineáris modellekkel. A kutatásban retrospektív módon elemeztünk nagyszámú plazmavércukor- és HbA_{1c}-felvételt az elmúlt 15 évből, amelyeket több mint 46 ezer egyéni betegről gyűjtöttünk össze és ~10%-uk több mint 10 egymást követő mérésel rendelkezett. A Michaelis-konstans, a K_m a modellből

az egyéni különbségek értékelésére szolgáló hasznos biomarkerként emelkedett ki. A K_m -et egy új metabolikus paraméterként lehetne bevezetni, amely felülmúlhatja a korábbi markerek, például a hemoglobin glikációs index, a glikációs rés vagy a glükózkezelési mutató prediktív értékeit. A K_m időbeli viszonylagos stabilitása azt is biztosítja, hogy a plazma glükózsintjének HbA1c-re történő átváltása hosszabb időszakokon keresztül is megbízható lehet. A HbA1c a vörösvérsejtek teljes élettartama alatt képződik és azok pusztulásával eliminálódik a keringésből. A glükóz membrán transzportja köztudottan az MM kinetikát követi, és ez a fő folyamat felelős a glükóz - HbA1c görbe alakjáért. Jelen tanulmányunkban megállapítottuk, hogy a HbA1c kiszámításához használt MM egyenlet jobban reprezentálja a háttérben húzódó mechanizmusokat, jobban leírja a glükóz - HbA1c kapcsolatot, és így jobb prediktív képességgel rendelkezik. Emellett, az MM kinetika akkor is hatékonyan használható, ha kevesebb adat áll rendelkezésre - azaz csak éhgyomri glükózmérés rögzíthető. Vizsgálatunk korlátai közé tartozik, hogy a vizsgálati populációnk túlnyomórészt magyar, kaukázusi emberekből áll, ezért a V_{max} szükség esetén történő kiigazítása érdekében meg kell ismételni más rasszok esetében is. A GLUT1-aktivitás, valamint az életkor, a nem, a faj, a kiindulási és a posztprandiális glükóz arányának hatását is figyelembe kell venni. Meg kell jegyezni, hogy a ritka hemoglobinvariánsok zavarhatják az analízist. A HPLC-analizátorok frakciója elkülöníti a labilis glikált hemoglobint a stabil HbA1c-től, de a glikémiás státusz hirtelen változása növelheti a labilis frakció mennyiségét, amely átfedésben lehet a stabil frakcióval is. A glikáció és az RBC eliminációs sebességének változékonysága továbbra is probléma. Összefoglalva, úgy gondoljuk, hogy a jelenlegi lineáris modelleket és számításokat fel lehetne váltani az MM-egyenlettel. A már létező webalapú számológépek és mobiltelefonos alkalmazások könnyen frissíthetők lennének. Így a betegek és az orvosok a kötelező laboratóriumi HbA1c-ellenőrzések között bármikor nyomon követhetnék terápiájuk/diétájuk alakulását. A K_m mennyiségi paraméterként való bevezetése lehetővé tenné továbbá a "kevésbé reagálók" megkülönböztetését, akik esetében nehéz a HbA1c-értéket csökkenteni anélkül, hogy a hypoglikémia kockázatát vállalnák. E betegek esetében alternatív terápiás megközelítések megfontolása lenne javasolt. A standardizált K_m , mint biomarker segíthet a társbetegségek metabolikus hatásának értékelésében és jobb megértésében is.

ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA

1. *Hypoglikémia hatásának vizsgálata sejtes modellen*

A krónikus hypoglikémia hatását kívántuk vizsgálni neuroblasztóma (SH SY5Y) sejtvonalon. Ebből a célból hat különböző glükózkoncentrációjú médiumban inkubáltuk a sejteket 24 órán keresztül. A következőket találtuk:

- Az SH-SY5Y sejtek 1,8 mM-os glükóz koncentráció alatt a glükóz hiányát a glikolízis/oxidatív foszforiláció arányának változtatásával kompenzálják.
- Az ECAR csökken, ezáltal az oxigénfogyasztással (OCR) alkotott hányados (OCR/ECAR) exponenciálisan nő, a teljes ATP szint változása nélkül.
- A neuroblasztóma sejtek viabilitása számottevően a 0,5 mM glükózkoncentrációjú médiumban csökken, míg a sejtproliferáció lassulása már 1,3 mM glükózsint alatt megfigyelhető a kontrollhoz képest (5 mM).

Modellünkben a fokozatosan kialakuló hypoglikémiával O-Glikoziláció csökkenést tudtunk kiváltani. Úgy gondoljuk, a mérsékelt glükóz megvonás az Alzheimer betegség metabolikus elváltozásainak jobb modelljéül szolgálhat.

2. *A plazma glükóz és a HbA1c kapcsolatának modellezése*

Tanulmányunkban a laboratóriumunk informatikai rendszerében tárolt, a HbA1c- és plazma glükóz értékeket tartalmazó, közel 15 évnyi adatot retrospektív módon elemeztük.

- Az összetartozó adatpárok grafikus ábrázolását követően arra a következtetésre jutottunk, hogy az eddig használt lineáris egyenletekhez képest a Michaelis-Menten kinetika alapján való nem-lineáris modellezés célravezetőbb és pontosabb, különös tekintettel a szélső értékekre.
- Az új számítások alkalmazásával csökkenthető a terápiás bizonytalanság és az egyénre jellemző Michaelis index segítségével pontosabb kezelés alakítható ki.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Nagy Zsófia; Poór Viktor S; Fülöp Norbert; Chauhan Deepanjali ; Miseta Attila; Nagy Tamás: *Michaelis-Menten kinetic modeling of Hemoglobin A1c status facilitates personalized glycemic control*. CLINICA CHIMICA ACTA (0009-8981 1873-3492): 548 Paper 117526. 8 p. (2023) IF: **5.0**

Zsófia Nagy; Rita Csepregi; Emese Kátai; Attila Miseta; Katalin Ördög; Róbert Halmosi; Tamás Nagy: *Metabolic shift may influence protein O-GlcNac modification in SH-SY5Y cells in a hypoglycemic AD model* – közlés alatt

Összesített impakt faktor a dolgozat alapjául szolgáló közleményekből jelenleg: 5.0

EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Nagy Zsófia; Papp Ábel; Kristály Christopher; Horváth L. Levente; Béri Laura; Nagy Tamás; Vámos Zoltán: *Induktív keringésmegállás során felszabaduló neuronspecifikus enoláz és S100b neurobiomarker preanalitikai mérési hibalehetőségei*. Ideggyógyászati Szemle, Proceedings/ Clinical Neuroscience Proceedings szakfolyóirat, ISSN 2498- Megjelenés: (2023), előadás

Papp Ábel; Kristály Christopher; Horváth L. Levente; Béri Laura; Kittka Bálint; Nagy Tamás; **Nagy Zsófia**; Vámos Zoltán: *Hemodinamikai instabilitás okozta S100b neurobiomarker szérumkoncentráció-változása*. Ideggyógyászati Szemle, Proceedings/ Clinical Neuroscience, Proceedings szakfolyóirat, ISSN 2498-6240 Megjelenés: (2023)

Kristály Christopher; Papp Ábel; Horváth L. Levente; Béri Laura; Kittka Bálint; Nagy Tamás; **Nagy Zsófia**; Vámos Zoltán: *Neuronspecifikus enoláz-szérumkoncentráció változása pacemakerrel indukált periarrest állapotban*. Ideggyógyászati Szemle, Proceedings/ Clinical Neuroscience Proceedings szakfolyóirat, ISSN 2498-6240 Megjelenés: (2023)

Karsai István; **Nagy Zsófia** ✉; Nagy Tamás; Kocsor Ferenc; Láng András; Kátai Emese; Miseta Attila; Fazekas Gábor; Kállai János: *Physical exercise induces mental flow related to catecholamine levels in noncompetitive, but not competitive conditions in men*. SCIENTIFIC REPORTS (2045-2322 2045-2322): 13 Paper 14238. 10 p. (2023) IF: **4.6**

Nagy Zsófia ✉; Karsai István; Nagy Tamás; Kátai Emese; Miseta Attila; Fazekas Gábor; Láng András; Kocsor Ferenc; Kállai János: *Reward Dependence-Moderated Noradrenergic and Hormonal Responses During Noncompetitive and Competitive*

Physical Activities. FRONTIERS IN BEHAVIORAL NEUROSCIENCE (1662-5153): 16 Paper 763220. 11 p. (2022) IF: **3.0**

Nagy Tamás; Fisi Viktória; Frank Dorottya; Kátai Emese; **Nagy Zsófia**; Miseta Attila: *Hyperglycemia-Induced Aberrant Cell Proliferation; A Metabolic Challenge Mediated by Protein O-GlcNAc Modification*. CELLS (2073-4409): 8 9 Paper 999. 29 p. (2019) IF: **4.366**

Nagy Zsófia; Kátai Emese; Miseta Attila; Nagy Tamás: *Stress Tolerance and Protein O-GlcNAc Regulation in Neuroblastoma Cells under Hypoglycemic Condition*. Experimental Biology 2019 2019-04-06 [Orlando (FL), Amerikai Egyesült Államok] Megjelenés: (2019), poszter

Darnai G; Szolcsányi T; Hegedüs G; Kincses P; Kállai J; Kovács M; Simon E; **Nagy Zs**; Janszky J: *Hearing Visuo-tactile Synchrony - Sound-Induced Proprioceptive Drift in the Invisible Hand Illusion*. BRITISH JOURNAL OF PSYCHOLOGY (0007-1269 2044-8295): 108 1 pp 91-106 (2017) IF: **2.507**

Összesített impakt faktor az egyéb eredeti közleményekből: 14.473

Összesített impakt faktor: 19.473

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Nagy Tamásnak az elmúlt években nyújtott támogatásáért és türelméért. Hálás vagyok, hogy befogadott, szakmailag és emberileg is mellettem állt, hasznos tanácsai mind a kutatói munkában, mind az oktatásban értékesnek bizonyultak.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Miseta Attilának, hogy a kezdetektől fogva hitt bennem és támogatott minden ötletem megvalósításában.

Szintén köszönöm Dr. Karsai Istvánnak, hogy már kutatómunkám kezdetén mellém állt és támogatott.

Hálás vagyok Dr. Bock-Marquette Ildikónak a kutatómunkámban nyújtott segítségéért, a hasznos tapasztalatok átadásáért, a barátságáért és a kezdetektől való támogatásáért minden téren.

Szívből köszönöm Dr. Kátai Emese, Dr. Jakabfi-Csepregi Rita, Halász Heléna, Dr. Réger Barbara kolléganőimnek, Német Istvánnak és Dr. Vámos Zoltánnak értékes szakmai tanácsait és javaslatait. Ugyanakkor köszönöm, hogy barátként is mindig számíthattam rájuk.

Köszönetemet fejezem ki közvetlen munkatársaimnak, akikkel a Laboratóriumi Medicina Intézetben, illetve a Szentágotthai János Kutatóközpontban együtt dolgozhattam.

Végezetül, nagyon köszönöm édesanyámnak, páromnak és az egész családomnak a támogatást, hogy lehetővé tették tanulmányaimat. Hálás vagyok a megértésükért, segítségükért és türelmükért, mely nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el.