

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

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

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

TARTALOMJEGYZÉK

| | | |
|----|--|----|
| 28 | | |
| 29 | | |
| 30 | RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 4 |
| 31 | ÖSSZEFOGLALÁS | 7 |
| 32 | BEVEZETÉS | 9 |
| 33 | I.1 A GLÜKÓZ HOMEOSZTÁZISA | 9 |
| 34 | I.1.1 Az étkezést követő állapot | 9 |
| 35 | I.1.2. Éhezés alatti állapot | 11 |
| 36 | I.2 AZ AGYI METABOLIZMUS VÁLTOZÁSA HYPOGLIKÉMIA SORÁN | 11 |
| 37 | I.2.1 A hypoglikémia és az Alzheimer kór kapcsolata | 13 |
| 38 | I.3 AZ O-GLIKOZILÁCIÓ SZEREPE AZ ALZHEIMER KÓR KIALAKULÁSÁBAN | 14 |
| 39 | I.4 A VÉRCUKORSZINT MÉRÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI | 17 |
| 40 | I.4.1 A plazma glükóz mérése | 17 |
| 41 | I.4.2 A hemoglobin A1c mérése | 18 |
| 42 | I.5 A GLÜKÓZ – HbA1C KAPCSOLATÁNAK MODELLEZÉSE | 20 |
| 43 | I.5.1. Lineáris egyenletek | 20 |
| 44 | I.5.2 A nem-lineáris modell | 21 |
| 45 | I.5.3 A Lineweaver-Burk diagram | 22 |
| 46 | II. CÉLKITŰZÉSEK | 23 |
| 47 | III. ANYAG ÉS MÓDSZER | 24 |
| 48 | III.1 HYPOGLIKÉMIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SEJTES MODELLEN | 24 |
| 49 | III.1.1 A sejt kultúra beállításai | 24 |
| 50 | III. 1.2 Sejtmorfológia- és proliferáció | 24 |
| 51 | III.1. 3 Glükóz-, laktát- és ATP mérés | 25 |
| 52 | III. 1. 4 A sejtviabilitás vizsgálata | 26 |
| 53 | III. 1. 5 Az oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mérése | 26 |
| 54 | III. 1. 6 Az O-Glikoziláció dinamikájának követése, Western blot analízis | 27 |
| 55 | III. 2 A NEM-LINEÁRIS GLÜKÓZKINETIKAI MODELL | 29 |
| 56 | III. 2. 1 A vizsgált populáció | 29 |
| 57 | III. 2. 2 A vérminta gyűjtése | 29 |
| 58 | III. 2. 3 A kinetikus modell | 30 |
| 59 | III. 3 STATISZTIKAI ELEMZÉS | 32 |
| 60 | III. 3. 1 A sejttes modell statisztikai elemzése | 32 |
| 61 | III. 3. 2 A nem-lineáris kinetikus modell statisztikai elemzése | 32 |

| | | |
|----|--|----|
| 62 | IV. EREDMÉNYEK | 33 |
| 63 | IV. 1. A HYPOGLIKÉMIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SEJTES MODELLEN | 33 |
| 64 | IV. 1. 1. AZ ELSŐ KÍSÉRLETEK ÖSSZEFOGLALÁSA - KEZDETI | |
| 65 | PRÓBÁLKOZÁSOK | 33 |
| 66 | IV. 1. 2. A JELENLEGI MODELL BEMUTATÁSA | 39 |
| 67 | IV. 2. A PLAZMA GLÜKÓZ ÉS A HbA1c KAPCSOLATÁNAK MODELLEZÉSE | 49 |
| 68 | V. DISZKUSSZIÓ | 57 |
| 69 | V. 1. A HYPOGLIKÉMIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SEJTES MODELLEN | 57 |
| 70 | V. 2. A PLAZMA GLÜKÓZ ÉS A HbA1C KAPCSOLATÁNAK MODELLEZÉSE | 60 |
| 71 | VI. ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA | 63 |
| 72 | REFERENCIÁK | 64 |
| 73 | PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK | 71 |
| 74 | DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK | 71 |
| 75 | EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK | 71 |
| 76 | KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 73 |
| 77 | A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LENYOMATA | 75 |

78

79 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

80

| | |
|------------|---|
| Acetil-CoA | Acetil-KoenzimA |
| AD | Alzheimer's disease = Alzheimer betegség |
| ADA | American Diabetes Association = Amerikai Diabétesz Szövetség |
| ADAG | A1C-derived Average Glucose = Hemoglobin A _{1C} alapján számított átlagos glükóz |
| AG | Average gucose = Átlagos glükózérték |
| ATP | Adenozin-trifoszfát |
| AUC | Area under the curve = Görbe alatti terület |
| A β | Amyloid-béta |
| BBB | Blood-Brain-Barrier = Vér-agy-gát |
| BSA | Bovine serum albumin = Szarvasmarha szérum albumin |
| CGM | Continuous glucose monitoring = Folyamatos glükóz monitorizálás |
| DCCT | Diabetes Control and Complications Trial = Diabétesz Kontroll és Szövődmények Vizsgálata |
| DMSO | Dimetil-szulfoxid |
| DNS | Dezoxiribonukleinsav |
| dUTP | Deoxi-uridin-trifoszfát |
| EAAT | glia-specifikus glutamát transzporter |
| EC | Extracelluláris |
| ECAR | Extracelluláris acidifikációs/ savasodási ráta |
| EDTA | Etiléndiamin-tetraecetsav |
| EGTA | Etilénglikol-tetraecetsav |
| FADH | Flavin-adenin-dinukleotid redukált formája |
| FBS | Fetal bovine serum = Fötális szarvasmarha szérum |
| FDG-PET CT | Fluorodezoxiglükóz-pozitron emissziós komputertomográf |
| GAPDH | Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz |
| Glc-6-P DH | Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz |
| GLP | Glucagon-like peptid = Glukagon-szerű peptid |

| | |
|----------|--|
| GLUT | Glükóz transzporter |
| HbA1c | Hemoglobin A1C |
| HBP | Hexoseamine biosynthetic pathway = Hexózamin bioszintézis út |
| HEPES | 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav |
| HGI | Hemoglobin glikációs index |
| HPLC | High pressure liquid chromatograph = Magasnyomású folyadékkromatográf |
| HRP | Horseradish peroxidase = Tormagyökér peroxidáz |
| IFCC | International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine = Klinikai Kémia és Laboratóriumi Medicina Nemzetközi Szövetsége |
| IGF | Insulin Like Growth Factor = Inzulinszerű növekedési faktor |
| ISO | International Organization for Standardization = Nemzetközi Szabványügyi Szervezet |
| K_m | Michaelis konstans |
| LADA | Latent Autoimmune Diabetes in Adults = Látens Autoimmun Diabétesz Felnőttekben |
| LDH | Laktát dehidrogenáz |
| MCT | Monokarboxilát transzporter |
| miRNS | Mikro-Ribonukleinsav |
| MM | Michaelis-Menten kinetika |
| MODY | Maturity Onset Diabetes of the Young = F fiatalok Érettségi Cukorbetegsége |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid |
| NADH | Nikotinamid-dinukleotid redukált formája |
| NADPH | Nikotinamid-dinukleotid foszfát redukált formája |
| NFT | Neurofibrillary tangles = Neurofibrilláris kötegek |
| NGSP | National Glucohaemoglobin Standardization Program = Nemzetközi Glikohemoglobin Standardizációs Program |
| OCR | Oxygen consumption rate = Oxigénfogyasztási ráta |
| OGA | β -N-acetilglükózaminidáz |
| O-GlcNAc | O- β -N-acetilglükózamin |
| OGT | β -N-acetilglükózamin transzferáz |

| | |
|------------|---|
| OxPhos | Oxydative phosphorylation = Oxidatív foszforiláció |
| PBS | Foszfát pufferes sóoldat |
| pGlc | Plazma Gukóz |
| POC | Point-of-care = Betegágy melletti diagnosztikai vizsgálat |
| PPP | Pentóz-foszfát út |
| PVDF | Polivinil-difluorid |
| RBC | Vörösvérsejtszám |
| ROC | Receiver operating curve |
| ROI | Region of interest = A vizsgált régió |
| S | Szubsztrát |
| SD | Standard deviáció |
| SDS | Nátrium-dodecil-szulfát |
| SDS-PAGE | Nátrium-dodecil-szulfát Poliakrilamid gélelektroforézis |
| SGLT | Nátrium-glükóz tanszport protein |
| SLC16A1 | Solute Carrier Family 16 Member 1 |
| TBS | Tris pufferes sóoldat |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP Nick End Labeling |
| UDP | Uridil-difoszfát |
| v | A reakció sebessége |
| V_{\max} | A reakció maximális sebessége |
| WHO | World Health Organization = Egészségügyi Világszervezet |

82 ÖSSZEFOGLALÁS

83

84 A dolgozatom alapját képező munka első felében a hypoglikémia kinetikáját és annak hatását
85 vizsgáltuk egy sejtes modellen; célunk az Alzheimer betegség (AD) feltételezett metabolikus
86 hátterének pontosabb megismerése volt. A kísérletsorozatban neuroblasztóma (SH-SY5Y)
87 sejtvonallal dolgoztunk és a krónikus hypoglikémia hatását kívántuk modellezni. Összesen hat
88 glükóz koncentrációt állítottunk be: 0,5; 0,8; 1,3; 1,8; 3 és 5 mM-t. Ezt követően a sejteket 24
89 órán keresztül az adott glükózkoncentrációjú médiumban tartottuk, majd lemértük a glükóz és
90 laktát szintek mellett az oxigén felhasználást és a médium savasodását (ECAR), meghatároztuk
91 az ATP- és az intracelluláris glükóz szinteket. Nyomon követtük a sejtek morfológiáját,
92 életképességét és sejtosztódási rátáját, valamint egy bizonyos fehérje módosulás, az O-
93 Glikoziláció mértékét. Eredményeink szerint az SH-SY5Y sejtek egészen az 1,8 mM-os glükóz
94 koncentrációig jól alkalmazkodnak a hypoglikémiás környezethez, azonban ezen érték alatt a
95 metabolizmusuk megváltozik. A felhasznált glükóz mennyisége a Michaelis-Menten kinetikát
96 követi, ezt a sejtek a glikolízis/oxidatív foszforiláció arányának változásával kompenzálják; az
97 ECAR csökken, ezáltal az oxigénfogyasztással (OCR) alkotott hányados (OCR/ECAR)
98 exponenciálisan nő. A sejtek osztódási sebessége csökkent, az életképességük csak a 0,5 mM
99 glükóz kondícióban csökkent szignifikánsan. A legfontosabb új eredményünk a fehérjék
100 glikozilációjához kapcsolódik. Az eddigi hypoglikémiás sejtes modellekkel ellentétben –
101 melyek a sejtektől a teljes glükózt teljes mértékben megvonták, ezáltal akut stresszreakciót és
102 O-Glikoziláció fokozódást tapasztaltak – modellünkben a fokozatosan kialakuló
103 hypoglikémiával O-Glikoziláció csökkenést tudtunk kiváltani. Úgy gondoljuk, a mérsékelt
104 glükóz megvonás az AD metabolikus elváltozásainak jobb modellje, így magyarázatot adhat a
105 patológiás szövetekben tapasztalt csökkent O-Glikozilációra, és a következtében kialakuló
106 hyperfoszforilált Tau fehérjékre, valamint az amyloid-béta (A β) felhalmozódásra.

107 A tézis második felében bemutatom a vércukorszint meghatározására használt plazma glükóz-
108 , illetve a jelenleg leggyakrabban alkalmazott, hosszú távú követésére használt hemoglobin A1c
109 (HbA1c) kapcsolatát leíró lineáris egyenletek lényegét és azok módosított, nem-lineáris
110 változatát, melynek alkalmazásával jobb prognosztikai becslés adható. A laboratóriumunk
111 informatikai rendszerében (GLIMS) tárolt, a HbA1c- és plazma glükóz értékeket tartalmazó,
112 közel 15 évnyi adatot retrospektív módon elemeztük. Az összetartozó adatpárok grafikus
113 ábrázolását követően arra a következtetésre jutottunk, hogy az eddig használt Átlagos Glükóz
114 Tanulmányi Csoport (ADAG) által alkalmazott lineáris egyenlethez képest a Michaelis-Menten

115 kinetika alapján való nem-lineáris modellezés célravezetőbb és pontosabb, különös tekintettel
116 a szélső értékekre. Ezáltal csökkenthető az ún. glikémiás index okozta terápiás bizonytalanság
117 és az egyénre jellemző Michaelis index segítségével pontosabb kezelés alakítható ki. A
118 Michaelis-Menten egyenlettel a HbA1c változásai akár napi szinten becsülhetőek, ezáltal egy
119 könnyen használható monitort/applikációt adhatunk mind a betegek, mind a diabetológusok
120 kezébe.

121

122 **BEVEZETÉS**

123

124 A WHO (Egészségügyi Világszervezet) általános becslése szerint világszerte mintegy 422
125 millió embert érint a cukorbetegség, mely növekvő tendenciát mutat. Ez az egyik leggyakoribb
126 krónikus betegség a világon. A diabetesnek több típusa ismert, melyek közül a leggyakoribbak
127 az 1-es típusú- vagy inzulinfüggő diabetes, illetve az esetek több, mint 90%-át a 2-es típus vagy
128 inzulin rezisztens diabetes teszi ki. A gesztációs-, a LADA (Latent Autoimmune Diabetes in
129 Adults), a MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) illetve egyéb formái a
130 cukorbetegségnek jóval ritkábbak. Kivételt képez ez alól az AD melyet 2005 óta egyes szerzők
131 „3-as típusú diabetesnek” is neveznek, miután kapcsolatot találtak mind epidemiológiailag,
132 mind biokémiai folyamatok terén az inzulinrezisztencia, az agyi inzulin jelátviteli utak és a
133 neurodegeneráció között. [1; 2; 3; 4] A vércukorszint alakulásának követése elengedhetetlen
134 mind a szűrés, mind a monitorozás során, ezért a módszerek tökéletesítésére kell törekednünk.
135 Ez magában foglalja a háttérben húzódó folyamatok pontosabb megértését és a jelenlegi
136 lehetőségek fejlesztését is.

137

138 **I.1 A GLÜKÓZ HOMEOSZTÁZISA**

139

140 A normál plazma vércukorszint viszonylag szűk határok között mozog (4-9 mM) [5]. Gyakran
141 előfordul magasabb értékek esetében a prediabetes illetve diabetes kérdése felmerül annak
142 minden lehetséges szövődményével együtt, amilyen a nephropátia, retinopátia, neuropátia és a
143 kardiovaszkuláris betegségek rizikónövekedése. Természetesen más kórállapotok is járhatnak
144 emelkedett vércukorszinttel, mint a Cushing-kór, a hyperthyreosis vagy az acromegalia.
145 Alacsonyabb értékek az agyi funkciók károsodását vonhatják maguk után, lévén, a neuronok
146 sem raktározni, sem szintetizálni nem tudnak megfelelő mennyiségben glükózt. Azonban
147 hosszabb éhezés során megfigyelték, hogy más, alternatív energiaforrásokból is biztosítható az
148 idegsejtek ellátása. [6]

149

150 **I.1.1 Az étkezést követő állapot**

151

152 Normál esetben a felszívódott glükóz közel 35%-a eloxidálódik, 65%-a pedig raktározásra
153 kerül a zsigeri szervek (45%), az izomszövet (30%), a zsírszövet (5%) és más szövetek által.
154 [7] A szervezet energiaigényének nagy részét a szabad zsírsavak oxidációjával fedezi, amely a

155 glükózzal bizonyos szervekben kompetícióban áll (például a vázizomzatban, szívben és a
156 vesében). [8] A GLUT (Glucose Transporter) transzporterek olyan fehérjék, melyek felelősek
157 a glükóz szállításáért a sejtmembránon keresztül, lehetővé téve a sejtek számára, hogy azt a
158 környezetükből felvegyék. Jelenleg tizennégy izoformájuk ismert, melyek különböző
159 szövetekben és körülmények között aktívak. A legjelentősebbek ezek közül a GLUT1-5. A
160 GLUT1 és GLUT3 inzulinfüggetlen, főként a vér-agy gáton, a neuronokon és a
161 vörösvérsejteken fejeződik ki, de más szövetekben is fellelhető. A GLUT2 a májban, a
162 hasnyálmirigy béta-sejtjeiben és a vesékben található, ezzel szemben a GLUT4-re a
163 myocardialis-, a máj-, a placentaris-, a hasnyálmirigy-, a vázizom- és a zsírszöveti megjelenés
164 a jellemző. A GLUT5 specifikusan a fruktóz szállításáért felelős, jelentős mértékben az
165 intestinális sejtekben és a herecsatornáknak van jelen. A másik glükózz szállító molekula-család
166 a nátrium-glükóz kapcsolt transzporterek (SGLT), szimporterek, melyeknek eddig hat
167 izoformája került azonosításra [9] és az első kettő gátlója ígéretes gyógyszerek hatóanyaga. A
168 fenti transzporterek kulcsszerepet játszanak az anyagcserében és az energiaháztartásban.
169 Étkezést követően a glükózfelvétel 70-80%-a az inzulinérzékeny szövetekben történik, melyek
170 GLUT4 receptorokkal rendelkeznek, így az inzulin ebben a folyamatban a glükóz transzport
171 növelésével játszik szerepet. Emellett ennek a peptidhormonnak a szerepe igen sokrétű: a
172 glükóz szöveti felhasználásának emelésén és az ATP termelés fokozásán kívül enzimek
173 aktiválásán vagy gátlásán keresztül fokozza a fehérjék és zsírok felépítését, gátolja a
174 mobilizálásukat, gátolja a májban és a vesében a glukoneogenezist, csökkenti a vércukorszintet,
175 és a ketontestek képződését, fokozza az aminosavak és a kálium sejtbe történő felvételét. [10]
176 Érdekes megfigyelés, hogy miután az elfogyasztott cukor mintegy 15 percen belül megjelenik
177 a keringésben, a vesében a glukoneogenezis kevésbé gátlódik, holott a máj és a vese szövete
178 közel azonos mértékben képes erre a folyamatra, aminek háttérében az állhat, hogy a glukagon
179 a vese sejtjein nem hat. [5] Ezáltal a májban a gátlása erőteljesebben fokozódik és a glikogén
180 szintézise jelentősebben emelkedhet. [11]

181 Általánosságban a glükóz, miután bejutott a sejtbe a glikolízis során piruvátként beléphet a
182 Citromsav-ciklusba, melynek során Acetil-CoenzimA (Acetil-CoA) oxidációja során NADH és
183 FADH képződik, melyek később a sejt energiaelőállítását szolgálják. Emellett a pentóz-foszfát
184 útvonalon (shunt) (PPP) keresztül ribóz-5-foszfát és NADPH termelésén keresztül hozzájárul
185 a nukleotidok és lipidek képződéséhez, valamint az antioxidáns védelemhez. A hexózamin-út
186 a glükóz felhasználásának egyik alternatív módja, azonban elengedhetetlen a sejtek
187 szabályozási folyamatainak megfelelő működéséhez. A glükózaminoglikánok és szénhidrát-
188 polimerek képződése a sejtmembránok felépítése és a sejtek közötti mátrixok kialakításában

189 játszik fontos szerepet. Az éppen fölösleges glükózt glikogén formájában tárolhatja a szervezet
190 szintézist követően, míg, ha nem áll elegendő rendelkezésre, akkor glikogenolízis és
191 glukoneogenesis útján glükózt állít elő a szövetek, sejtek számára. Az anyagcsere összetett
192 hálózata biztosítja, hogy a sejtek megfelelő energia- és építőanyagellátást kapjanak az optimális
193 működéshez. Azt, hogy a glükóz melyik anyagcsere-útvonalba lép be, döntően a sejtípus,
194 illetve a sejtek környezete befolyásolja.

195

196 **I.1.2. Éhezés alatti állapot**

197

198 A plazma vércukorkoncentrációja egészséges egyéneknél átlagosan 5 mM még egy éjszakai
199 éhezést követően is. Külső forrásból történő pótlás nélkül 24 óra múlva ez a szint 15%-kal
200 csökken, 72 órát követően a szervezet normál esetben 2,8 mM felett igyekszik tartani a glükóz
201 szintjét. [12] A szérum inzulinszint csökkenése már viszonylag gyorsan elkezdődik, azonban a
202 glukagon és az adrenalin kibocsátás csak 4 mM alatt figyelhető meg. Éhezés során a glükóz
203 80%-a a máj működése révén jut a keringésbe, illetve kisebb mértékben a vese által. Ennek fele
204 glikogenolízisből származik, a másik fele a glukoneogenesisből; glicerolból, laktáttól és
205 aminosavakból glükóz-6-foszfát segítségével. Az idő előrehaladtával a glikogénraktárak
206 kiürülésével párhuzamosan, az arány az utóbbi felé dől el; 24 óra múlva 70%, majd 48 óra
207 múlva szinte az összes, keringésbe bocsátott glükózért ez a folyamat felelős. [13] Emellett a
208 zsírsav oxidációból származó Acetil-CoA ketontestekké (pl. acetoacetát, β -hidroxi-vajsav)
209 alakulva alternatív energiaforrást jelenthet az agy és más szövetek számára, különösen
210 hosszabb éhezési időszakokban.

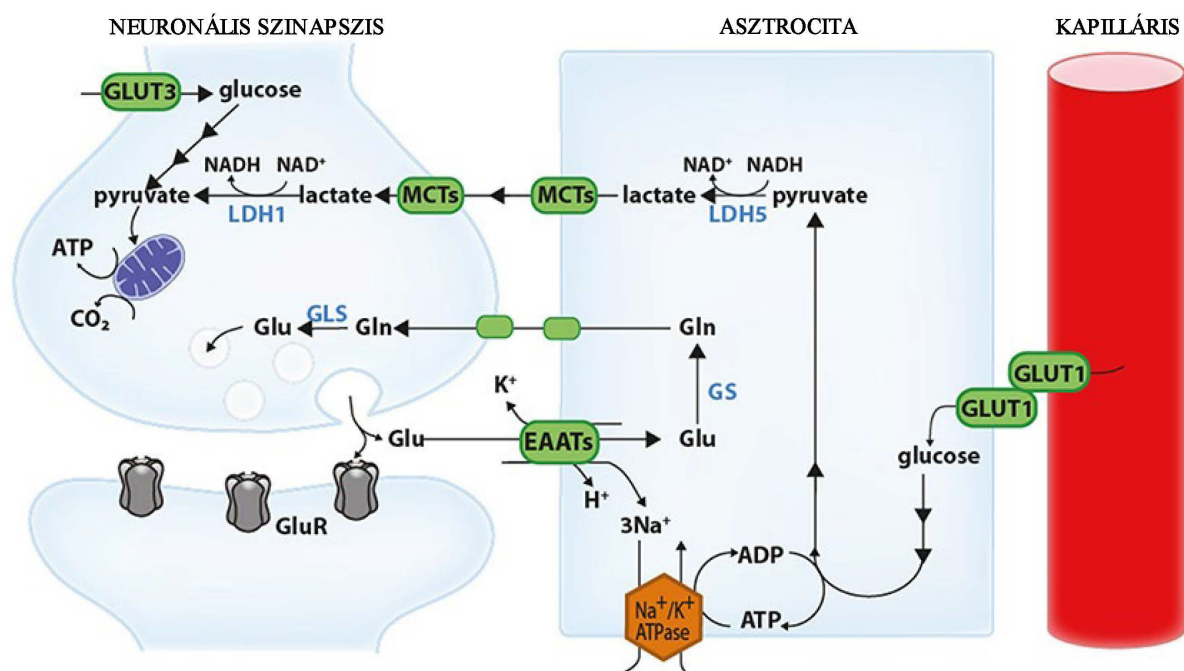
211

212 **I.2 AZ AGYI METABOLIZMUS VÁLTOZÁSA HYPOGLIKÉMIA** 213 **SORÁN**

214

215 Az agy a szervezet teljes glükózfogyasztásából 25%-ban részesül, ugyanakkor a testtömeg
216 mindössze 2%-át teszi ki. [14] A felnőtt agy fő energiaforrása a glükóz. [15] Az agy – határok
217 között – képes alkalmazkodni a hypoglikémiához abban az esetben, ha az lassan, fokozatosan
218 alakul ki. Azonban, ha a hiányállapot nagy mértékű és akutan következik be, akkor az ehhez
219 való idomulás már nehezebb. Kimutatták, hogy a neuronok mind a laktátot, mind a
220 ketontesteket képesek fölhasználni alternatív tápanyagként. [14] Az elmélet szerint a laktát
221 alternatív útvonal a neuronok és asztróciták között glutamát felszabadulására indul meg, amit a
222 neuronok választanak ki hypoglikémia hatására. [16] (*I. ábra*) Ezt az asztróciták a glia-

223 specifikus glutamát transzportereken keresztül veszik fel (EAAT1, EAAT2), melyek ezzel
 224 párhuzamosan Na^+ ionokat is bejuttatnak a sejtekbe. [17] A glutamát glutaminná ATP-függő
 225 reakció által alakul át, ez serkenti a glükóz felvételét. Az intracelluláris Na^+ ion gradiens
 226 emelkedése aktiválja a Na^+ - K^+ ATPáz-t, ami végül beindítja a glikolízist. [14; 17] A laktát
 227 termelése megnő, és felszabadul az extracelluláris (EC) térbe, ahol a neuronok által
 228 felhasználásra kerül az ATP-termeléshez szükséges energiaforrásként. [18] Az éhgyomri
 229 glükózsztint a vérben általában 4 és 6 mmol/l között van, míg az agyszövetben körülbelül 1-2
 230 mmol/l. [14; 19] Hypoglikémiás állapotban az intracerebrális glikogén is tápanyagként
 231 szolgálhat a neuronok számára a visszanyert laktát révén – néhány másodpercig. A laktátból
 232 származó metabolitok beléphetnek a Krebs-ciklusba és a glükóz felhasználásra kerülhet más
 233 metabolikus útvonalakon is, mint amilyen a PPP.



234

235 **1. ábra:**

236 *Az astrocyta-neuron laktát csatorna elmélet sematikus rajza. (Módosított ábra, kép forrása: I.*
 237 *Allaman, M. Belanger, and P.J. Magistretti, Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. Front*
 238 *Neurosci 9 (2015) 23.)*

239 *Rövidítések: MCT: monokarboxilát transzporter; EAAT: excitatorikus aminosav transzporter; LDH5:*
 240 *laktát-dehidrogenáz 5; Gln: glutamin; Glu: glükóz; GluR: glükóz receptor; GLUT: glükóz tarszporter*

241

242 A ketontestek a vér-agy gáton (BBB) keresztül passzív transzporttal, diffúzióval is képesek
 243 átjutni (különösen, ha magas koncentrációban vannak jelen), azonban a fő szállító molekula a
 244 monocarboxylate transporter 1 (MCT1), ami a Solute Carrier Family 16 Member 1 (SLC16A1)
 245 család tagja. Nem specifikus, hiszen más monokarboxilátokat is szállít, mint a laktát, a piruvát,

246 elágazó láncú oxosavak, amik valinból, leucinből vagy izoleucinből származnak. [20] Az
247 aquaporin csatornák elsősorban a víz molekulák szállításáról ismertek, azonban felfedezték,
248 hogy szerepet játszhatnak a β -hidroxi-butirát transzportjában is. [21] A β -hidroxi-butirát
249 dehidrogenáz által katalizált reakcióban acetoacetáttá alakul, majd acetoacetyl-CoA tioláz
250 segítségével acetyl-CoA keletkezik, ami belép a neuronok mitokondriumában zajló citromsav-
251 ciklusba, aminek során ATP, NADH és FADH₂ jön létre később további energiát szolgáltatva
252 a sejt számára.

253

254 **I.2.1 A hypoglikémia és az Alzheimer kór kapcsolata**

255

256 Az AD – amely világszerte több, mint 400 millió embert érint – és a cukorbetegség közötti
257 kapcsolatra számos bizonyítékot találtak. Epidemiológiai tanulmányok alapján a 2-es típusú
258 diabetes és AD kockázati tényezői között szerepel a magas testtömegindex, az adipozitás, a
259 gyulladás és a zavart éhomi glükóz. [22; 23] A „3-as típusú diabetes” kifejezést először 2005-
260 ben Suzanne de la Monte és mtsai használták, akik AD-s betegek agyszövetének vizsgálatakor
261 az inzulin szignál zavarát fedezték fel, ezért, mint neuroendokrin betegséget azonosították. [2]
262 A központi idegrendszerben az inzulin, az inzulinhoz hasonló növekedési faktor (IGF1)
263 termelése és az inzulinreceptorok iránti rezisztencia csökken, valamint a glükóz felhasználása
264 is csökken. [24] Az FDG-PET CT mérések szintén arra utalnak, hogy csökken a cerebrális
265 glükóz metabolizmus. [4] Az inzulin át tud jutni a vér-agy gáton, emellett maga, az agyszövet
266 is termeli. Fontos a memóriafeldolgozás szempontjából, és a receptorok a hipotalamuszban, az
267 agykéregben, a szaglómező területén, az agyban és a kisagyban található meg. Kimutatták,
268 hogy az inzulin adása segíti a kognitív funkciók javulását. [1] Az inzulinrezisztencia, a GLUT
269 receptorok - különösen a GLUT 1 és GLUT 3 - csökkenése, az érrendszeri hypoperfúzió és a
270 mitokondriális diszfunkció szintén részt vesz az AD kialakulásában. [3] Az elégséges ATP-
271 szint kritikus a normál neuronális működéshez; a szinaptikus átviteleknek, az axonális vagy
272 dendritikus transzportnak és az ioncsatorna-aktivitásnak magas az energiakövetelménye. [25;
273 26] Ez alapján például véve a károsodott kalciumfüggő exocitózis az ingerületátvitel
274 romlásához vezet, befolyásolva a kognitív funkciók és a memória hanyatlását. [25; 27]
275 Továbbá, normál körülmények között a PPP-ből származó antioxidánsok védik a
276 mitokondriumokat a reaktív oxigénfajtáktól (ROS), azonban az AD esetén ez a funkció is sérül,
277 ami kevésbé hatékony ATP-termeléshez vezet, míg a ROS károsítja a lipideket, fehérjéket és
278 nukleinsavakat, hozzájárulva ezzel a neurodegenerációhoz. [25; 28] ATP aerob vagy anaerob
279 módon keletkezhet. Az összes termelésnek a 88%-a aerob körülmények között történik. [29] A

280 mitokondrium mátrixában zajló Krebs-ciklus köztes anyagainak biztosításához aerob
281 körülmények között glükóz, glikogén, zsír és fehérje is felhasználható, míg elegendő oxigén
282 hiányában glükóz és glikogén tölti be ezt a szerepet. Az összes energiaforrás közül a glükózt
283 tudja a sejt a leghatékonyabban felhasználni, ami közvetlenül befolyásolhatja a sejt
284 anyagcseréjét és proliferációját. [30] Az oxidatív foszforiláció (OxPhos) a mitokondrium belső
285 membránjában zajlik, ahol a glikolízisből 2 ATP, az OxPhos-ból 28 ATP keletkezik
286 glükózmolekulánként aerob körülmények között. [31] Anaerob esetben egy glükózból csak 2
287 ATP keletkezik, miközben 2 laktátmolekulát termel [32], azonban az anaerob folyamat százszor
288 gyorsabban tud ATP-t termelni, mint az OxPhos. [33] A mikrocelluláris környezeti feltételek a
289 legfontosabb befolyásoló tényezői az aerob és anaerob folyamatok dominanciájának.

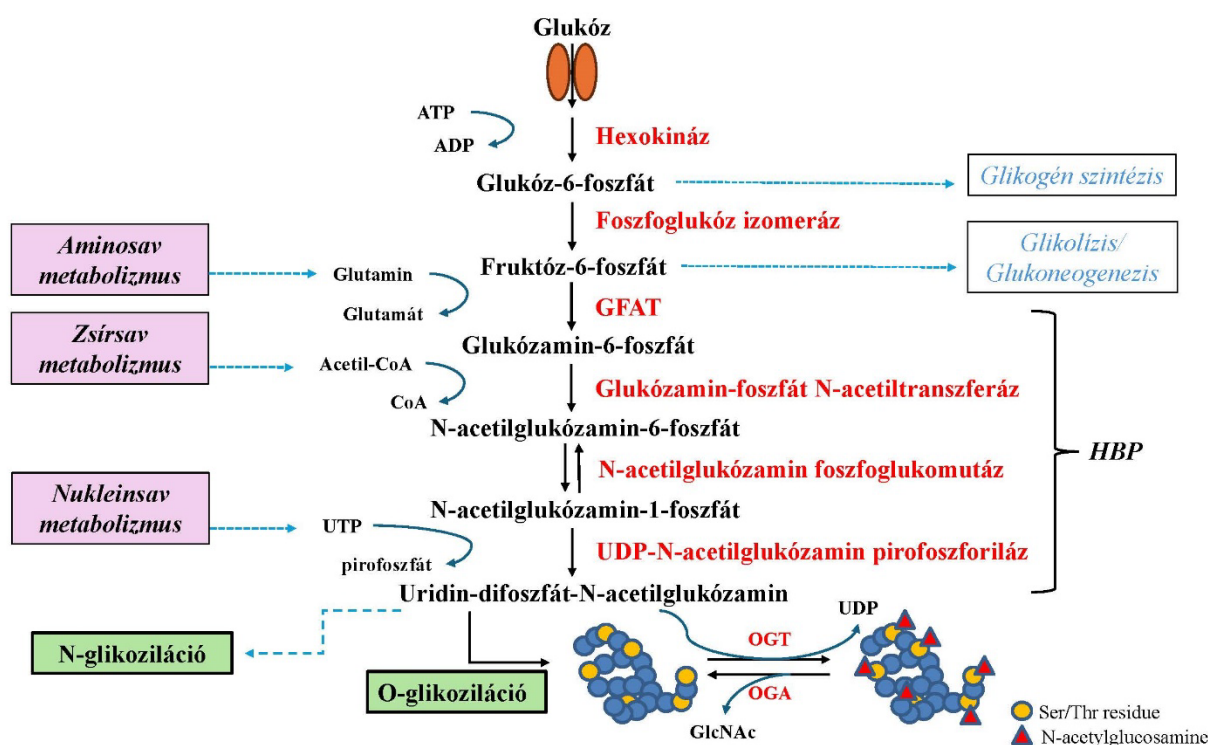
290

291 **I.3 AZ O-GLIKOZILÁCIÓ SZEREPE AZ ALZHEIMER KÓR** 292 **KIALAKULÁSÁBAN**

293

294 A glükóz nem csak energiatermelésre használandó fel. A glükózaminoglikánok, mint a
295 hialuronsav és a kondroitin-szulfát, szerepet játszanak a sejtmátrix felépítésében és fontos
296 porcszerkezeti alkotóelemek. A sejt felületi felismerésben és a sejt-sejt közötti
297 kommunikációban a glikoproteinek és glikolipidek kulcsfontosságú szerepet töltenek be,
298 melyek glikoziláció, illetve glikokonjugáció révén jönnek létre. A glikogén szintézise szintén
299 nem energiatermelő folyamat, míg a glükóz konvertálódhat pentóz foszfátra, belépve a PPP-be,
300 ezáltal részt vesz a nukleotid szintézisben és a sejtosztódásban is. A hexózamin bioszintézis
301 útvonal (HBP) is a glikolízisből ered, és nem termel ATP-t. Befolyásolja a poszttranszlációs
302 módosításokat [30], melyben a glikoziláció a leggyakoribb típus. Ennek egyik formája az O-
303 Glikoziláció, ami egy reverzibilis poszttranszlációs módosítás, mely elsősorban a szerin
304 és/vagy treonin oldalláncokon történik. A folyamatot az O-kötött- β -N-acetilglükózamin
305 transzferáz (OGT) és a β -N-acetilglükózaminidáz (OGA) katalizálja. Az előbbi felelős az O-
306 GlcNAc csoport hozzáadásáért egy fehérje Ser vagy Thr maradékának hidroxil csoportjához,
307 míg az utóbbi a regenerálásért. Az UDP-GlcNAc a HBP-ből származik, mint a reakció
308 szubsztrátja. Miután a glükóz belép a sejtbe, hexokináz által foszforilálódik glükóz-6-foszfáttá.
309 Ezután fruktóz-6-foszfáttá metabolizálódik, miközben aktiválja a glikolízist és a
310 glukoneogenezist. [34] A HBP első lépéseként a glükózamin-6-foszfát fruktóz-6-foszfátból
311 alakul át glutaminnal a glutamin-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) segítségével. A
312 glükózamin-6-foszfát acetiltranszferáz az acetyl-CoA-val N-acetilglükózamin-6-foszfáttá

313 alakítja a terméket, amely utána N-acetilglükózamin-1-foszfáttá alakul foszfo-glukomutáz
 314 segítségével, majd az UDP-N-acetilglükózamin pirofoszforiláz UDP-GlcNAc-t állít elő, ami
 315 szabályozza az OGT funkcióját. [35] (2. ábra) Az összes glükóz 2-5%-a lép be a HBP-be,
 316 azonban létfontosságú funkciókat lát el, mint például a fehérjék poszttranszlációs módosításait,
 317 amelyek felelősek a sejt túléléseért, anyagcseréjéért, jelátvitelért és a fehérje tulajdonságainak
 318 módosításáért.[36]



319

320 **2. ábra:**

321 *A hexózamin útvonal és az O-Glikoziláció folyamata. (Saját ábra)*

322 *Rövidítések: HBP: hexózamin út; GFAT: glutamin-fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz; UTP: uridil-*
 323 *trifoszfát; UDP: uridil-difoszfát; OGT: O-kötött-β-N-acetilglükózamin transzferáz; OGA: β-N-*
 324 *acetilglükózaminidáz; GlcNAc: N-acetilglükózamin.*

325

326 Az AD legismertebb jellemzői a neurofibrillaris kötegek (NFT-k) és az Aβ peptid lerakódások,
 327 mint amyloid plakkok. A tau fehérjék az emberi központi idegrendszerben főként az axonok
 328 disztális helyein találhatóak meg, és a tubulin molekulákkal együtt szabályozzák a
 329 mikrotubulusok stabilitását, elsősorban foszforilált állapotban. [37] A tau, mely egy
 330 foszforprotein, potenciális szerin (Ser) és treonin (Thr) foszforilációs helyekkel rendelkezik.
 331 [38] Normál esetben oldható formában van, és a foszforiláció és defoszforiláció egyensúlyban
 332 áll, míg a hyperfoszforilált tau NFT-eket és aggregátumokat képezhet, ezáltal károsítva a
 333 citoplazmatikus funkciókat és akadályozva az axonális transzportot. [39] Ismert, hogy az O-

334 Glikoziláció és foszforiláció egymással reciprok kapcsolatban áll [40] [41], ráadásul az előbbi
335 helyspecifikus módon képes a szabályozásra. [42] Állatkísérletek segítségével bizonyították,
336 hogy az OGA gátlásának hatására fokozódik az O-Glikoziláció a tau fehérjéken, ezáltal
337 megakadályozva azok hyperfoszforilációját mindamelllett, hogy a nem patogén tau proteinek
338 foszforilációja változna. [43] A tau felhalmozódása növelheti a mitokondriális membrán
339 potenciálját, ami csökkenti a mitofágiát a PINK/Parkin útvonalon keresztül, ezzel hozzájárul az
340 abnormális mitokondriumok számának növekedéséhez, befolyásolva az AD patogenezisét. [44;
341 45] Az A β peptid az amyloid- β prekursor fehérjéből (APP) képződik a β - és γ -szekretázok által,
342 az α - és γ -szekretázok helyett. Az APP sejt felszíni receptorként szolgál, és részt vesz a neurális
343 plaszticitásban, a szinapszisképzésben, a vasexportban és az antimikrobiális aktivitásban is.
344 [46; 47; 48; 49] Az APP hasítási folyamatát részben az O-kötött béta-N-acetilglükózaminilálás
345 (O-GlcNAcilálás) szabályozza. [50]

346 Li és mtsai. egy egérmodell segítségével kimutatták, hogy az idő függvényében az éhezés
347 csökkenti, míg az etetés növeli az O-GlcNAc szintjét a hippocampális sejtekben [51], azonban
348 a szélsőséges glükózhány is növelheti az O-GlcNAc szintjét [52; 53; 54], akárcsak más
349 celluláris stresszorok, mint az oxidatív stressz vagy a hypoxia.[54; 55; 56] Az O-Glikoziláció
350 ezeken túl, csökkentheti a mitokondriális permeabilitást a Ca²⁺ túltelítődés és a reaktív oxigén
351 szabadgyök képződés mérséklésével. [57] Fontos megemlíteni, hogy az agyi hypoglikémiát
352 utánzó állatkísérletek végrehajtása nehézkes, mivel a glükoneogenesis (a májban)
353 ellensúlyozhatja az erőfeszítéseket a vér (és az agy) glükózsintjének jelentős csökkentésére.
354 Paradox módon számos in vitro kísérlet emelkedést mutatott az O-GlcNAc szintjében
355 glükózhány következtében [54; 58], valószínűleg az idegsejtek végső stresszreakciója révén
356 [52; 53; 59]. Az akut stressz során az emelkedett O-GlcNAc valószínűleg előnyös lehet és
357 segíthet a sejtek túlélésében [54]. Azonban az emelkedése nem feltétlenül releváns, mivel nem
358 jön létre mérsékelt, fokozatosan progrediáló, krónikus hypoglikémia esetén az AD-s betegeknél
359 [60]. Úgy gondoljuk, hogy a korábbi kísérleti hypoglikémiás modellek nem vették figyelembe
360 az AD fokozatos kifejlődését, illetve azt, hogy az idegsejtek alkalmazkodhatnak az alacsonyabb
361 glükózkoncentrációkhoz. A hypoglikémiát úgy érték el, hogy vagy kémiaiilag blokkolták a
362 glikolízist, vagy a glükózt teljesen eltávolították, ezáltal növelve az O-GlcNAc szintjét. [58; 59;
363 61; 62; 63]

364 A fentiek alapján belátható, hogy ez a fehérje poszttranszlációs módosulás fontos szerepet tölt
365 be a különféle stresszre reagáló faktorok és elemek befolyásolásával, kulcsszerepet játszva
366 számos betegség kórfolyamatában; a kardiomiopátiától a tumorképződésen, szépszisen,
367 diabetészen át a neurodegenerációig. [60; 64; 65; 66] Az O-GlcNAc iránti érdeklődés,

368 széleskörű hatásai és potenciális terápiás célpontként való szerepe miatt, az utóbbi időben
369 növekedést mutat. [67].

370

371 **I.4 A VÉRCUKORSZINT MÉRÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI**

372

373 Már 2016-ban a diabéteszre és annak szövődményeire fordított egészségügyi kiadás
374 világviszonylatban több, mint 827 milliárd USD volt, mely azóta folyamatosan nő a betegek
375 számával együtt, így kijelenthető, hogy a cukorbetegség jelentős globális terhet ró az
376 egészségügyi rendszerekre. [68] Ezért a kialakulásának megelőzése és a kezelésének javítása
377 elengedhetetlen feladat, beleértve az egészséges életmódra ösztönzést és a szükséges
378 egészségügyi ellátás fejlesztését. A vércukorszint követése és megfelelő szabályozása
379 kulcsfontosságú ebben, hiszen megelőzi, vagy legalább késlelteti a szövődmények kialakulását,
380 csökkenti a gyulladást és az oxidatív stresszt, javítja az életminőséget, csökkenti a szükséges
381 gyógyszerek mennyiségét és a halálozási rátát. Ha a glikémiás kontrollt személyre szabottá
382 tudjuk alakítani, az kevesebb mellékhatással, jobb toleranciával és beteggyüttműködéssel
383 járhat, korábbi felismerést és hatékonyabb beavatkozást tehet lehetővé, ezáltal javulhatnak
384 mind a rövid-, mind a hosszú távú eredmények.

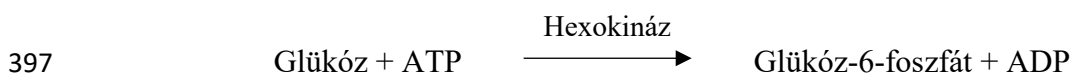
385

386 **I.4.1 A plazma glükóz mérése**

387

388 A diabetes diagnosztizálásának története több évszázadon ível át, míg a vizelet megkóstolásától
389 eljutottunk a mai modern, fejlett technológiákig. Fotometrián alapuló-, elektrokémiai-, és
390 kromatográfiás detektálásra is lehetőség nyílik. A laboratóriumokban történő analízis
391 elfogadott és leggyakrabban használt módszere enzimek felhasználásával történik, mint a
392 glükóz oxidáz, a hexokináz vagy a glükóz dehidrogenáz, amik specifikusan reagálnak a
393 glükózzal és ennek során mérhető jelet adnak. Az általunk is használt reakció során első
394 lépésben hexokináz foszforilálja a glükózt ATP felhasználásával és glükóz-6-foszfát
395 keletkezik.

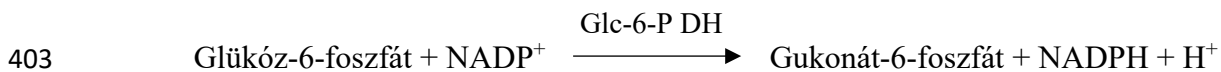
396



398 A második lépésben a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (Glc-6-P DH) oxidálja a glükóz-6-
399 foszfátot NADP⁺ jelenlétében, ezáltal glukonát-6-foszfát és NADPH keletkezik hidrogén ion

400 mellett, melyeknek mennyisége arányos a kiindulási glükóz szintjével és fotometriával UV fény
401 segítségével detektálható 340 nm-es hullámhosszon.

402



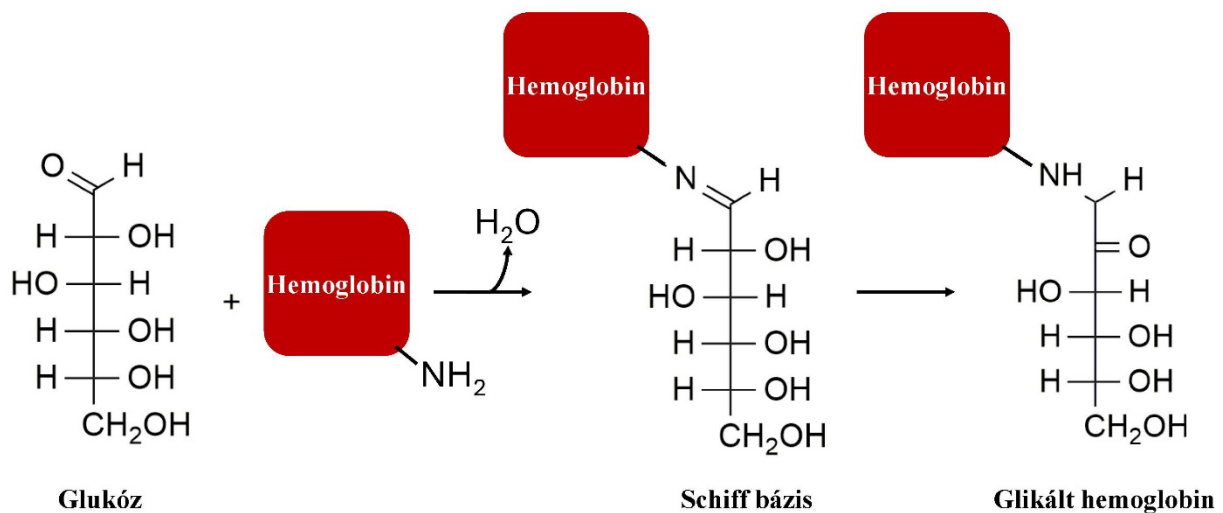
404 A meghatározása szérumból vagy plazmából történik a minta lecentrifugálását követően.
405 Legalkalmasabb erre a célra az oxalátot tartalmazó kémcső, amely anyag segítségével a
406 glikolízis gátolható, ezáltal a minta hosszabb ideig tárolható az analízist megelőzően. Az
407 eredményeket mg/dl-ben vagy mmol/l-ben adják meg. A hordozható vércukormérők elve
408 hasonló azzal a különbséggel, hogy a detektálás nem fotometriásan, hanem elektrokémiai úton
409 történik egy tesztcsik segítségével mindössze egyetlen csepp vérből. A keletkező elektromos
410 áram erőssége egyenesen arányos a mintában található glükóz mennyiségével. Ma már
411 elérhetőek folyamatos vércukor monitorozásra (CGM) alkalmas, bőr alá ültethető készülékek
412 is.

413 **I.4.2 A hemoglobin A1c mérése**

414

415 A cukorbetegség vörösvérsejtjeiben megnő a glikált hemoglobin frakció mennyisége. A
416 leggyakrabban mért forma, melyet először 1968-ban fedeztek fel, a hemoglobin A1c (HbA1c).
417 Képződése sok összekapcsolt biokémiai folyamat eredménye. Röviden, az EC glükóz a GLUT1
418 inzulinfüggetlen glükóz transzporter segítségével jut be a vörösvérsejtbe, majd nem-
419 enzimatikusan reagál az N-terminális valinon a hemoglobinA béta láncában a két lépéses
420 Maillard reakció során (**3. ábra**). [69] A HbA1c-től a vörösvértestek leginkább az élettartamuk
421 végén szabadulnak meg, leszámítva némi kisebb mennyiségű HbA1c-t, melytől fruktózamin-
422 3-kináz deglikációval is meg lehet válni. A HbA1c a vörösvérsejt egész élettartama alatt
423 képződik, beleértve a hematopoiesist is, hiszen a retikulocitákban már kb. 0,7%-ban jelen van.
424 Létrejöttét elsősorban az EC glükózkoncentráció, a GLUT1 transzporter szállítókapacitása és a
425 vörösvértest felezési ideje befolyásolja. Ezáltal elmondható, hogy a HbA1c az elmúlt 2-3 hónap
426 átlagos glükózkoncentrációjáról adhat felvilágosítást. Szintjére azonban még több tényező hat,
427 beleértve a nemet, a rasszt, a táplálkozást, bizonyos kórállapotokat, mint a vesebetegséget vagy
428 az anaemiákat. A klinikai gyakorlatban történő alkalmazása az 1970-es években kezdődött, de
429 standardizálása és elfogadása csak az 1980-as években történt meg. Meghatározását
430 alvadásgátolt teljes vérből végzik és immunkémiai, illetve kromatográfiai módszert
431 alkalmaznak.

432 Az Amerikai Diabetes Társaság (American Diabetes Association, ADA) és más egészségügyi
 433 szervezetek ajánlása szerint a HbA1c szintjét a cukorbetegség diagnózisának és kezelésének
 434 fontos mutatójaként használják fel, aminek segítségével annak folyamatát és a terápia
 435 hatékonyságát monitorozhatják. A szabványosításnak két fő lépését, a módszerek kidolgozását
 436 és validálását, illetve a referenciaértékek megállapítását követően lehetővé vált a
 437 laboratóriumok közötti összehasonlítás és a klinikai alkalmazás. [70; 71] A referenciaértékeket
 438 például az NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program), a DCCT (Diabetes
 439 Control and Complications Trial), az ADA és az International Federation of Clinical Chemistry
 440 and Laboratory Medicine (IFCC) százalékos formában, mg/dl-ben vagy mmol/mol-ban adják
 441 meg.



442 **3. ábra:**
 443 *A hemoglobina glikációjának lépései. (Módosított ábra.) Kép forrása: M. Pohanka, Glycated*
 444 *Hemoglobin and Methods for Its Point of Care Testing. Biosensors (Basel) 11 (2021)*

445

446 Egészséges személyeknél a HbA1c szint általában 5,7% alatt van. Az 5,7% és 6,4% közötti
 447 értékek prediabetészre utalnak, míg a 6,5% vagy afölötti értékek a cukorbetegség diagnózisát
 448 jelzik. A HbA1c teszt "maximális" értéke elméletileg nincs korlátozva, és nagyon magas
 449 szinteket érhet el azoknál, akiknek a vércukorszintje extrém módon és tartósan magas.
 450 Ugyanakkor az optimális HbA1c értékek egyénenként változhatnak, függően az egészségi
 451 állapottól, kortól, és egyéb tényezőktől. Az orvosok gyakran a 7% alatti HbA1c szintet tűzik ki
 452 célul a cukorbetegéknél. [72]

453

454 I.5 A GLÜKÓZ – HbA1c KAPCSOLATÁNAK MODELLEZÉSE

455

456 I.5.1. Lineáris egyenletek

457

458 Az átlagos glükózsztintből (AG) – amit ismételt, napközi glükózsztint-mérések vagy folyamatos
459 glükózmonitorok (CGM) adatai alapján [73] lehet kiszámítani – a HbA1c szintre való
460 következtetéshez számos matematikai modellt használnak. [74; 75] Az elvart HbA1c-szintet az
461 AG-ből lineáris egyenletek segítségével lehet kiszámítani, amelyeket különféle tanulmányok
462 javasoltak. [71; 73; 76] Az 1993-ban a Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) által
463 kidolgozott képlet a következő összefüggést használja az AG és a HbA1c szint között [75]:

$$464 \text{HbA1c (\%)} = (\text{AG} + 46,7) / 28,7$$

465 Az IFCC által kifejlesztett módszer az alábbi átalakító tényezőt alkalmazza:

$$466 \text{HbA1c (mmol/mol)} = (10,93 * \text{HbA1c (\%)} - 23,5)$$

467 Az ugyanazon egyenletek megfordításával az AG-szinteket szintén kiszámíthatjuk a mért
468 HbA1c-eredményekből. Az Átlagos Glükóz Tanulmányi Csoport (ADAG) azért alakult, hogy
469 kidolgozza az AG fogalmát és kiszámítását a HbA1c értékek alapján, melyre az alábbi, szintén
470 lineáris egyenletet használják:

$$471 \text{AG} = (28,7 * \text{HbA1c}) - 46,7$$

472 AG: átlagos glükóz szint (mg/dl)

473 HbA1c: Hemoglobin A1c szint (%)

474 Azonban gyakran eltérés mutatkozott a mért és a számított HbA1c között, amit hemoglobin
475 glikációs indexnek (HGI) neveztek el. [77] Ennek a kérdésnek jelentős klinikai következményei
476 vannak; mind a túl- mind az alábecsült HbA1c nem megfelelő terápiához vezethet. A pozitív
477 HGI-vel rendelkező betegek (azaz, a megfigyelt HbA1c magasabb, mint a becsült HbA1c)
478 nagyobb valószínűséggel szenvedhetnek diabéteszes szövődményekben és hypoglikémiás
479 epizódokban az elégtelen terápia miatt. [78; 79; 80] A negatív HGI-vel rendelkező betegeknél
480 szintén magasabb kockázatot mutattak rossz kimenetelre. [81] A HGI egyéni különbségekből
481 eredhet, amelyek genetikai változásokat és egyéb kofaktorokat is magukban foglalnak, mint
482 például a vörösvértestek életkorát. Értéke így, egy bizonyos időtartamon belül, informatív
483 paraméter lehet az egyénre vonatkozóan. [80; 82] Azonban, a HGI hasznossága csak annyira

484 jó, amennyire pontosak az AG - HbA1c konverziós modellek. A HbA1c képződésének
485 bonyolult, lassú és fokozatos folyamata és a változó plazmaglükóz-koncentrációk miatt a
486 jelenlegi lineáris modellek messze nem tökéletesek.

487 Az átlagos glükóz eredmények beszerzésének gyakorlati nehézségeit több tanulmány is
488 figyelembe vette, és más lineáris modelleket javasoltak, amelyek az éhomi glükózértékeken
489 alapultak. [74; 75; 80; 83] Ezenkívül Hempe és munkatársai arra a következtetésre jutottak,
490 hogy a HGI-t nem az éhomi / étkezés utáni glükózarány egyéni változásai okozzák [80]. A
491 lineáris regressziós modellek abban az esetben rendelkeznek megfelelő pontossággal, ha a
492 plazmaglükóz normális vagy közel normális, azonban a magasabb glükózszinteknél, így a
493 diabéteszes betegeknél a magasabb HGI-t a modellek elégtelen dinamikus tartományának
494 tulajdonítják. Ezenkívül vitatják, hogy a HGI független változó lenne, és nem pozitív
495 korrelációban áll a HbA1c-vel. [84] Másrészt a lineáris egyenlet meredekségének és
496 tengelymetszetének módosítása mindig hibákat hordoz magában a HbA1c szintek alul- vagy
497 túlbecslése miatt. Bergenstal és munkatársai új változóként a „Glükóz Kezelési
498 Mutatót”(Glucose Management Indicator, GMI) vezették be, hogy kihangsúlyozzák a becsült
499 HbA1c esetleges eltéréseit a mért HbA1c-től, de továbbra is lineáris közelítésen alapul, ezáltal
500 ugyanazokkal a hátrányokkal jár. [85] Felismerve a HbA1c változatosságát és az AG becslés
501 pontatlanságát, Malka és munkatársai bevezettek egy korrekciós faktort, amit átlagos
502 vörösvérsejt életkornak neveztek (MRBC). A beteg-specifikus MRBC-t az előzőleg rögzített
503 AG (CGM által mérve) és HbA1c adatok felhasználásával számolták ki. Az aktuális AG-t
504 azután becsülték meg, hogy az aktuális HbA1c-t és a személyre szabott MRBC adatokat
505 beillesztették a matematikai modelljükbe. [86]

506

507 **I.5.2 A nem-lineáris modell**

508

509 A Michaelis-Menten (MM) kinetika története az 1900-as évek elejére nyúlik vissza. Az alapjait
510 Leonor Michaelis és Maud Menten dolgozták ki, akik 1913-ban publikálták forradalmi
511 munkájukat. [87] Kutatásuk során az invertáz enzim által katalizált szacharóz hidrolízisét
512 vizsgálták. Eredetileg egy matematikai modellt javasoltak, amely képes volt leírni, hogy
513 hogyan függ az enzimkatalizált reakciók sebessége a szubsztrát koncentrációjától. Ez volt az
514 első, ami sikeresen modellezte az enzimek telítési kinetikáját, bemutatva, hogy a
515 reakciósebesség egy ponton eléri a maximális értéket (V_{max}), amikor minden enzim molekula
516 szubsztráthoz kötődik. A modell matematikai leírását a következő alapegyenlet adja meg:

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

518

519 v: a reakció sebessége egy adott szubsztrát koncentrációnál

520 V_{\max} : a maximális reakciósebesség

521 K_m : a Michaelis-konstans, amely azt a szubsztrát [S] koncentrációt jelöli, amelyen a sebesség
522 a V_{\max} feléhez ér. Az enzim szubsztráthoz való affinitását jellemzi.

523 A munkájuk áttörést jelentett, mert először nyújtott kvantitatív eszközt az enzimkatalizált
524 reakciók tanulmányozására. Mindemellett a glükóz membrántranszportja ismert, hogy MM
525 kinetikát követ [88], és ez a fő folyamat, amely felelős a glükóz - HbA1c görbe alakulásáért.
526 [73]

527

528 **I.5.3 A Lineweaver-Burk diagram**

529

530 A Lineweaver-Burk diagram egy grafikus módszer az enzimkinetika vizsgálatára, amely a
531 Michaelis-Menten egyenletet lineáris formává alakítva egyszerűbbé teszi a V_{\max} és a K_m
532 meghatározását. A diagramot Hans Lineweaver és Dean Burk vezette be 1934-ben. Az egyenlet
533 a következő:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

535

536

537

538 Ez alapján az y-tengely metszete az $1/V_{\max}$ értékét adja meg, míg az x-tengely metszete a $-1/K_m$
539 értékét. A meredekség a K_m / V_{\max} arányt képviseli. Az enzimkinetikai paraméterek lineáris
540 regresszióval ezáltal megbecsülhetőek. [89]

541

542 II. CÉLKITŰZÉSEK

543

544 A Michaelis-Menten enzimkinetikai modell még napjainkban is megállja a helyét. Tekintettel
545 arra, hogy a glükóz membrántranszportja is ezt a kinetikát követi, a diabetes és az Alzheimer
546 betegség vonatkozásában a glükóz metabolizmusának sejtszintű vizsgálata, pontosítása mind
547 az alapkutatás, mind pedig a gyakorlati használhatóság szempontjából fontos tényeket tárhat
548 föl. Dolgozatom első felének alapjául szolgáló kísérletes munkát SH-SY5Y neuroblasztóma
549 sejtvonallal végeztem, melynek során a sejtek hypoglikémia tűrését monitoroztuk. Ennek
550 céljából különböző glükózkoncentrációjú médiumokat használtunk, amikben a sejteket 24 órán
551 keresztül inkubáltuk. Céljaink a következők voltak:

552

553 • *A sejtek metabolizmus-változásának vizsgálata, a hosszabb idejű hypoglikémiás*
554 *környezethez történő alkalmazkodás során.*

555

556 • *A sejtek energiaháztartásának monitorozása.*

557

558 • *A morfológia, az életképesség és a proliferációs ráta követése.*

559

560 • *Az O-Glikoziláció dinamikájának feltérképezése, egy kritikus glükózkoncentráció*
561 *meghatározása, ahol a sejtek az alkalmazkodó képességük maximumát elérik.*

562

563 A munka második felében a lineáris egyenleteken alapuló modellt vizsgáltunk meg, melynek
564 már jelenleg is használható gyakorlati jelentősége van. A vércukorszint monitorozására
565 használt éhomi glükóz és HbA1c értékek kapcsolatát elemeztük nagy elemszámú mintán.

566

567 • *Célunk a Michaelis-Menten kinetikán alapuló HbA1c képződés bizonyítása klinikai*
568 *laboratóriumi adatok elemzésével*

569

570 • *A vércukor és HbA1c konverziós egyenlet pontosítása és a diabetes miatti fehérje*
571 *károsodás becslésének javítása.*

571

572 **III. ANYAG ÉS MÓDSZER**

573

574 **III.1 HYPOGLIKÉMIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SEJTES** 575 **MODELLEN**

576

577 **III.1.1 A sejtkultúra beállításai**

578

579 SH-SY5Y neuroblastoma sejtvonulat (ATCC CRL-2266 emberi neuroblasztóma), melyet
580 EMEM-Ham's F12 1:1 arányú keverékében tenyésztettünk, kiegészítve 10% főtális
581 szarvasmarha szérummal (FBS), 1% nem esszenciális aminosav oldattal (Sigma-Aldrich, MEM
582 Nem Esszenciális Aminosav Oldat (100x), Cikkszám: M7145), streptomocinnel (100 µg/ml) és
583 penicillinnel (100 U/ml). A sejteket 95% levegő – 5% CO₂ légkörben, 37 °C-on, páramentes
584 inkubátorban inkubáltuk. A kísérlet elkezdése előtt hat egyenlő részre osztottuk a sejtkultúrát:
585 az adott kísérletsorozatnak megfelelően hat 25 cm²-es alapfelületű sejttenyésztő flaskába a
586 Western blot analízisekhez, illetve a laktát- és glükózmérésekhez, vagy hat 6-, 24-, illetve 96-
587 lyukú lemezre az egyéb mérések kívánalmai szerint. Miután a sejtek letapadtak és elérték a 60-
588 65%-os konfluenciát, a közeget RPMI 1640 médiumra (Millipore Sigma, Cikkszám: R1383)
589 cseréltük 5 mM glükózzal és 10% FBS-sel, valamint penicillinnel (100 U/ml) és
590 streptomocinnel (100 µg/ml) kiegészítve, 24 órára. Az EMEM-Ham's F12 médium eredetileg
591 átlagosan 7,5 mM glükóz koncentrációjú, azonban az előzetes eredményeink alapján az 5 mM-
592 os glükózkoncentráció nem változtatta meg a neuroblasztóma sejtek glikolizációs szintjét. Az
593 idő leteltével a médiumot RPMI 1640-re cseréltük 0,5-; 0,8-; 1,3-; 1,8-; 3- vagy 5 mM
594 glükózkoncentráció beállítása mellett, 24 órára. (Kezdeti kísérletsorozatokban különböző
595 inkubációs ideig alkalmaztuk a fenti beállításokat.)

596

597 **III. 1.2 Sejtmorfológia- és proliferáció**

598

599 A sejtmorfológia és a proliferációs ráta követésére fáziskontraszt mikroszkópot (JuLi Stage
600 Real Time Cell History Recorder (NanoEnTek) élőkép technológiával) 10x-es
601 objektívnagyítással használtunk, amelyet egy inkubátorba helyeztünk annak eredeti beállításai
602 mellett (95% levegő – 5% CO₂ 1, 37 °C). A sejteket RPMI közegben inkubáltuk a fent említett
603 hat különböző glükózkoncentrációban 24 órán keresztül egy 24-lyukú sejttenyésztő lemezen.

604 Az eszköz fényképeket készített lyukanként az előzetesen beállított területről 30 percenként 24
605 órán keresztül, miközben a sejtproliferációs görbe automatikusan kiszámításra került a képek
606 alapján. A készülék programja a háttér- és a sejtek denzitásának különbségét veszi alapul,
607 ezáltal a kiinduláskor mért háttér területéből kivonja a sejtek által elfoglalt területek nagyságát,
608 ebből számítva ki a proliferáció mértékét. Tehát minél nagyobb területet foglalnak el a sejtek,
609 annál magasabb a sejtosztódás intenzitása. Természetesen ez nem feltétlenül pontos számítás,
610 hiszen amellett, hogy nem tartja tökéletesen a sejthatárokat, nem veszi figyelembe a sejtek
611 alakjának változásait sem, emellett nem megítélhető a sejtosztódás mértéke, ha azok éppen
612 egymással fedésbe kerülnek. Mindazonáltal egy becslést lehetővé tesz, ahogyan arra számos
613 korábbi tanulmányban példákat találhatunk. [90; 91; 92]

614

615 **III.1. 3 Glükóz-, laktát- és ATP mérés**

616

617 Az EC glükóz- és laktát szinteket a kezelés előtt és után a médiumból mértük meg Cobas
618 Integra® 400 plusz analizátorral (Roche, Németország) a gyártó utasításainak megfelelően. Az
619 intracelluláris glükóz- és ATP szinteket Csepregi által bevezetett, minimálisan módosított
620 protokollal [93] vizsgáltuk. Egy 96-lyukú lemezre lyukanként átlagosan 400 000 sejtet
621 helyeztünk el a kezelést megelőző napon. A detektáláshoz egy multimód lemezolvasót
622 használtunk (Perkin Elmer EnSpire Multimode reader, Waltham, MA, USA).

623 Elméletileg 1 glükóz molekulából 2 laktát keletkezik, ezáltal a laktát konverziós rátáját
624 kiszámíthatjuk az alábbi egyenlet segítségével [94]:

625

$$626 \text{ Laktát konverzió \%} = \frac{\text{laktát produkció}}{\text{átlagos glükóz fogyasztás} \times 2} \times 100$$

627

628

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

631

$$632 \text{ A glikolízisből származó ATP} = \frac{\text{laktát produkció}}{2} \times 2$$

633

$$634 \text{ OxPhos-ból származó ATP} = \left(\text{glükóz fogyasztás} - \frac{\text{laktát produkció}}{2} \right) \times 28$$

635

$$636 \text{ Totál ATP} = \text{Glikolízisből származó ATP} + \text{OxPhos-ból származó ATP}$$

637

638

639 Feltételeztük, hogy 2 ATP képződik a glikolízis során, 28 ATP az oxidatív foszforilációban
640 (OxPhos) [31] és azt, hogy a glükózt a sejtek kizárólag glikolízisre fordították. A
641 glükózfelhasználás alapján Lineweaver-Burk diagramot készítettünk a K_m és V_{max}
642 kiszámításához, amelyek 3,68 és 2,4552 értékekkel rendelkeztek. A kiszámított teoretikus
643 glükózfelvételi sebességet összehasonlítottuk a mért sebességgel a Michaelis-Menten-kinetika
644 alapján:

$$645 \quad V_{act} = (V_{max} \times S) / (K_m + S)$$

646

647 (V_{act} : aktuális sebesség, V_{max} : a reakció maximális sebessége, S: szubsztrát koncentráció, K_m :
648 az a szubsztrát koncentráció, amikor a reakció sebessége a V_{max} felére csökken) [95]

649

650 **III. 1. 4 A sejtvitalitás vizsgálata**

651

652 A sejtek apoptózisának vizsgálatához a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-
653 bromid (MTT) tesztet (Millipore Sigma, Cikkszám: M2128) használtuk. A sejteket 96-lyukú
654 lemezen inkubáltuk RPMI médiumban, amelyet az említett hat glükózkoncentrációval
655 egészítettünk ki. A 24 órás kezelést követően a médiumot eltávolítottuk és a sejteket 3-szor
656 mostuk PBS-sel. Lyukanként 150 μ l MTT oldatot (0,5 mg/ml) pipettáztunk fel, majd 4 órán át
657 inkubáltuk 37 °C-on páramentes légkörben, ami 5% CO₂ – 95% levegőt tartalmazott. A kísérlet
658 lényege, hogy a sejtekben található NAD(P)H dependens oxidoreduktáz enzimek (NADH-
659 dehidrogenáz és a NADPH-dehidrogenáz) redukálják az eredetileg sárga színű tetrazólium
660 festéket annak vízben oldhatatlan formájára; formazán kristályok keletkeznek, melyek
661 megfelelő ágensben feloldva lila színreakciót adnak. Az inkubáció után az MTT oldatot
662 eltávolítottuk, és a formazán kristályokat 100 μ l dimetil-szulfoxid (DMSO) oldatban oldottuk
663 fel. Az abszorbancia értékeket 450 nm-en mértük multimód lemezolvasóval (Perkin Elmer
664 EnSpire Multimode reader, Waltham, MA, USA). A szín erőssége egyenesen arányos az élő
665 sejtek mennyiségével, azok metabolikus aktivitásával. [96]

666

667 **III. 1. 5 Az oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mérése**

668

669 A sejteket hat különböző glükózkoncentrációt tartalmazó RPMI médiumban inkubáltuk (0,5-;
670 0,8-; 1,3-; 1,8-; 3- vagy 5 mM) egy 6-lyukú lemezen, és a kezelés utolsó 3 órájában az
671 oxigénfogyasztási rátát (OCR) és az EC acidifikációs rátát (ECAR) Agilent Seahorse

672 Extracellular Flux (XF HS Mini Analyzer) Analizátorral (Agilent Technologies, Santa Clara,
673 CA, USA) detektáltuk. A sejtenyészítő lemezre lyukanként 30000 sejtet helyeztünk ki, majd 21
674 órán keresztül inkubáltuk külön a fenti glükóztartalmú médiumokban. A kísérlet előtti napon a
675 szenzor kártyákat hidratáltuk XFp kalibrációs oldatban, majd egy éjszakán át 37°C-on tartottuk
676 CO₂ nélkül. A kezelés után az RPMI médiumot Agilent Seahorse XF RPMI Medium-ra
677 cseréltük 1mM HEPES-sel (Agilent Technologies, USA, Cikkszám: 103576-100), amelyet 1
678 mM piruváttal, 2 mM L-glutaminnal és a fenti koncentrációk beállításához szükséges glükózzal
679 egészítettünk ki. Az eszköz 6 percenként mérte a médiumban oldott oxigén- és pH szinteket,
680 mely alapján meghatározta az OCR (pmol/min) és ECAR (mpH/min) értékeket optikai
681 fluoreszcens bioszenzorok segítségével, alkalmanként 2 µl médium felhasználásával. A 3 órás
682 protokoll után a végleges OCR és ECAR szintek detektálását követően, az eredményeket a
683 fehérje koncentrációkhoz normalizáltuk, amelyeket a DCTM Protein Assay Kit II (Bio-Rad,
684 Cikkszám: 5000112) segítségével határoztunk meg a gyártó utasításai alapján azzal a
685 változtatással, hogy tekintettel a viszonylag kis mennyiségű feltárható sejtre, a pellethez 20 µl
686 feltáró oldatot (módosított RIPA puffer, lásd. Western blot analízis) használtunk fel mintánként,
687 majd a 30 perces inkubáció ideje alatt 4 °C-on tartva 10 percenként, összesen háromszori
688 felkeverés után szonikáltuk, 10 percig 3500 rpm-en centrifugáltuk 4 °C-on és a nyert
689 felülúszóból 15 µl-hez adtunk 125 µl „A” -oldatot, majd 1 ml „B” oldat hozzáadása után
690 detektáltuk a fehérjekoncentrációt spektrofotométerrel.

691

692 **III. 1. 6 Az O-Glikoziláció dinamikájának követése, Western blot analízis**

693

694 Az előkezelt sejteket miután felkapartuk a sejtenyészítő flaskák aljáról, háromszor mostuk 4 °C
695 hőmérsékletű PBS pufferben, majd a pelletet -80 °C-on tároltuk a további felhasználásig. A
696 felolvasztást követően a pelletet módosított, 300 µl RIPA pufferben tártuk föl [100 mM NaCl,
697 10 mM Tris (pH=7,2), 1 mM etilén-glikol-bisz(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
698 (EGTA), 1 mM etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA), 10% glicerin, 1% Triton X-100, 0,5%
699 deoxikolát, 0,1% SDS és 1 tableta/10 ml proteáz inhibitor koktél (Roche Applied Science,
700 Penzberg, Németország)]. A 30 perces inkubáció ideje alatt a mintákat végig jégen tartottunk.
701 Minden 10. percben felkevertük (vortexeltük), majd a 20. perc után szonikáltuk és végül 10
702 percig 3500 rpm-en centrifugáltunk le 4 °C-on. 25 µl szupernatánsból a DCTM Protein Assay
703 Kit II (Bio-Rad, Cikkszám: 5000112) szerint határoztuk meg a fehérjekoncentrációkat
704 spektrofotométer segítségével. Az egyazon kísérletből származó minták fehérjekoncentrációját
705 a legkisebb mérthez képest egységesítettük mintapuffer [a hagyományos Western blothoz: 4x

706 törzsoldat: 0,25M Tris-HCl, pH 6,8, 40v/v% glicerin, 27,74 mM SDS, 8v/v% β -merkaptó-
707 etanol, 0,01v/v% brómfenolkék, illetve a Wes kapilláris módszerhez: 4X törzsoldat: 25 ml
708 Milli-Q Víz, 25 ml 1 M Tris (pH=6,8), 40 ml Glicerin, 8 g SDS, 8 ml β -merkaptó-etanol)
709 használatával, végül 5 percig forraltuk. A hagyományos Western blot elemzések esetében
710 elektroforetikus elválasztásra általunk öntött 8% SDS-PAGE gélt használtunk, majd a mintákat
711 PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA, USA) blottoltuk. Ezt követően a membránokat
712 egy órán át blokkoltuk PBS-ben oldott 5%-os borjúsérum albuminnal (BSA, Sigma-Aldrich)
713 vagy 5%-os zsírmentes tejporthoz tartalmazó Tris-sóoldatban és 0,1%-os Tween 20 keverékében
714 szobahőn. Ez után elsődleges antitestként RL-2-t (monoklonális egér, IgG, Thermo Fisher
715 Scientific, Waltham, MA, USA, Cikkszám: MA1-072) a fenti tejporthoz tartalmazó oldattal 1:1000
716 hígításban, belső kontrollnak az ismertett BSA tartalmú oldattal 1:1500 hígításban
717 poliklonális anti-aktin IgG-t (Sigma-Aldrich, Cikkszám: A2103) használtunk. Az inkubáció
718 egész éjszakán át tartott 4 °C-on, ezért az oldatba 1:100 hígításban 5%-os azidot tettünk, ezáltal
719 kiküszöbölve az esetleges felülfertőződést. Másnap TBS-Tween20 0.1%-os oldattal történő
720 háromszori mosást követően tormagyökér peroxidázzal konjugált anti-mouse IgG (Thermo
721 Fisher Scientific) vagy anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) antitesttel 1:2500 hígításban
722 inkubáltuk a membránokat, majd ismételt mosási lépések után a kemilumineszcens detektálást
723 Syngene G:boxxal, SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Fisher
724 Scientific) szubsztráttal végeztük el. A jelenlegi, 24 órás kezelésen átesett sejtek proteinjeinek
725 elemzéséhez már egy újabb, azonban eredményeiben a hagyományos módszerrel koherens,
726 kapilláris alapú automatizált western blot rendszert használtunk, a Wes™-t a Bio-Techne-től
727 (ProteinSimple, Cikkszám: 004-600), a gyártó utasításai szerint egy 12-230 kDa elválasztási
728 modullal (ProteinSimple, Cikkszám: SM-W004) és az Anti-Mouse Detection Module-lal
729 (ProteinSimple, Cikkszám: DM-002). Elsődleges antitestként az eredetileg is használt RL-2-t
730 1:50 hígításban használtuk, kontrollként GAPDH-t 1:1000 hígításban (Cell Signalling,
731 Cikkszám: 2118). Az összes mintát Fluorescent Master Mix-szel kevertük és 95 °C-on 5 percig
732 melegítettük, majd pipettáztuk a gyári lemezre az antitest hígítókkal, HRP-konjugált
733 másodlagos antitestekkel, és kemilumineszcens szubsztráttal együtt, mindegyiket az előírásnak
734 megfelelő, saját helyére. Az eszköz beállításai a következők voltak: a felszívás és szeparálás
735 375 Volt feszültségen 25 perc; blokkoló reagens 5 perc; elsődleges- és másodlagos antitestek
736 reakciói 30-30 perc; Luminol/peroxid kemilumineszcens detektálás 14 perc. Az így kapott
737 képeket az ImageJ szoftverrel értékeltük ki.

738

739 **III. 2 A NEM-LINEÁRIS GLÜKÓZKINETIKAI MODELL**

740

741 **III. 2. 1 A vizsgált populáció**

742

743 Retrospektív tanulmányként a laboratóriumi információs rendszerünkben (GLIMS) tárolt
744 adatbázisunkban megtalálható megjelenésekből gyűjtöttük ki a mérési eredményeket, amik
745 2007. április 18. és 2021. április 6. között keletkeztek. A beválasztási kritérium szerint egy
746 rendelésnek egyszerre kellett tartalmaznia a hemoglobin-, a plazmaglükóz- és a HbA1c értékeit.
747 Ennek összesen 175,437 rendelés felelt meg, amelyek 46,646 alanyról tartalmaztak
748 információt. A populáció részletes jellemzői, beleértve a látogatások számát és az átlagos időt
749 a látogatások között, az **1. táblázat** tartalmazza. Az eljárást a Pécsi Tudományegyetem
750 Regionális Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (engedélyszám: 9267-PTE2022).

751

752 **III. 2. 2 A vérminta gyűjtése**

753

754 Az áttekintett időszak alatt laboratóriumunk, mint orvosi vizsgálólaboratórium, megfelelt a
755 15189-es ISO szabvány kritériumainak, amit a Magyar Nemzeti Akkreditációs Hatóság is
756 elismert. Perifériás vénás vérminták gyűjtéséhez kálium-etiléndiamintetraacetátot (K-EDTA)
757 tartalmazó csöveket használtunk, melyből a CBC (komplett vérkép) mérését, ideértve a
758 hemoglobint, illetve a HbA1c-analízist kiviteleztük. A plazmaglükóz méréséhez nátrium-
759 fluoridot (NaF) tartalmazó csöveket használtunk. A CBC-t és a hemoglobint többparaméteres
760 automatikus hematológiai analizátorokkal mérte a Cell-Dyn 3700 rendszer (Abbott
761 Diagnostics, IL, USA), az ADVIA 120 és 2120 (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen,
762 Németország) és a SYSMEX XN-sorozat (Sysmex Corporation, Kobe, Japán). A
763 plazmaglükózt különféle Cobas készülékeken detektáltuk: az Integra 400Plus, Cobas C502 és
764 Cobas C702 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) a hexokináz módszert
765 alkalmazza [97]. A HbA1c-t először Modular P800 analizátoron mértük (Roche Diagnostics,
766 GmbH, Mannheim, Németország) immunoassay segítségével, majd egy Arkray ADAMS A1c
767 (Arkray Inc, MN, USA) ioncserélő magas teljesítményű folyadékkromatográf (HPLC)
768 analizátoron, illetve az utóbbi időben egy Tosoh G11 (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japán)
769 ioncserélő HPLC analizátoron (interassay variabilitás 0,6% HbA1c esetén 31 mmol/mol, 0,5%
770 HbA1c esetén 84 mmol/mol). Az összes mérést DCCT/NGSP szerint szabványosították. A
771 HbA1c eredményeket százalékos formában adtuk ki 2011. februárjáig, amikor is

772 laboratóriumunk az IFCC által ajánlott mmol/mol egységekre váltott. Azonban a százalékos
773 értékek még mindig szerepelnek és elérhetőek a laboratóriumi eredmények között, mivel az
774 IFCC egységeket az $NGSP = (0,09148 \times IFCC) + 2,152$ főegyenlet segítségével lehet átalakítani
775 [70]. Ebben a tanulmányban az adatokat mmol/mol egységekben mutatjuk be.

776

777 III. 2. 3 A kinetikus modell

778

779 A HbA1c képződése a vörösvérsejtek (RBC) belsejében történik, ezáltal három folyamat
780 határozza meg: a glükóz bejutása a sejtekbe, a béta-lánc N-terminális valinjának nem-
781 enzimátikus glikációja, és a RBC öregedése és lebomlása révén történő elimináció. Ezek közül
782 a glükóz membrántranszportja az egyetlen, amelyet a Michaelis-Menten kinetika szabályoz. A
783 nem-enzimátikus glikáció pszeudoelsőrendű kinetikát követ, míg a RBC eliminációja állandó
784 sebességgel jár [73]. Ez azt jelenti, hogy a plazmaglükóz - HbA1c görbe alakja főként a
785 membrántranszport által lesz érintett, és az MM egyenlettel modellezhető, míg a nem-
786 enzimátikus glikáció és a RBC elimináció leginkább oldalirányban tolja el a görbét. Azonban
787 a görbe eltolódása közelíthető az MM egyenleten belüli változók megváltoztatásával, így
788 optimális modell érhető el más konstansok használata nélkül:

789

$$790 \text{HbA1c} = \frac{V_{\max} \times \text{pGlc}}{K_m + \text{pGlc}}$$

791

792 ahol a pGlc a plazmaglükóz, a V_{\max} a HgbA1c maximális aránya, és azt a tanulmányban
793 résztvevő populáció számára a Lineweaver-Burk diagram segítségével határoztuk meg (**4.**
794 **ábra**). Ha a V_{\max} -ot fix értékre állítjuk be, akkor a Michaelis-állandót (K_m) kiszámíthatjuk, ha
795 a plazmaglükóz- és HbA1c-szinteket egyidejűleg mérik. Ebben az egyszerűsített modellben a
796 K_m az egyetlen paraméter, amely jelentést ad a HbA1c-termelés kinetikájának inter- vagy
797 intraindividuális különbségeiről. Összehasonlításképpen, az HbA1c lineáris előrejelzéséhez az
798 ADAG Tanulmány Csoportnak a kísérleti munkájában közölt egyenletet használtuk [75]:

799

$$800 \text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{pGlc (mM)} - 0,8317}{0,14545}$$

801

802 Az ADAG tanulmányban a plazmaglükóz koncentráció az átlagos plazmaglükóz szintet
803 jelentette egy 3 hónapos időszak alatt. Mivel tanulmányunk retrospektív jellegű volt, az átlagos
804 glükózt az aktuális plazmaglükózszintekkel kellett helyettesítenünk. A vizsgált populációban
805 az általános gyakorlat a reggeli, 10-12 órás éhezést követő vérvétel, azonban az

806 inzulinterápiában részesülő betegeknél ez nem szükséges a hypoglikémia elkerülése érdekében.
807 Az MM egyenlettel ellentétben az eredeti ADAG egyenlet nem veszi figyelembe a korábbi
808 adatokat, így kiszámítottuk a HGI-t az ADAG által előrejelzett HbA1c-ből kivonva a mért
809 HbA1c-t [98]. Ezután az aktuális ADAG előrejelzést korrigáltuk az előző HGI átlagával.
810 Amikor a HbA1c-t az MM egyenlettel becsültük meg, az előző mérésből számított átlagos K_m
811 értéket helyettesítettük az aktuális számításba.
812

813 **III. 3 STATISZTIKAI ELEMZÉS**

814

815 **III. 3. 1 A sejtes modell statisztikai elemzése**

816

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

821

822 **III. 3. 2 A nem-lineáris kinetikus modell statisztikai elemzése**

823

824 Az adatokat átlag \pm SD értékek formájában mutatjuk be az egész vizsgálat során. Korrelációs-
825 , regressziós- és ROC-görbe elemzéseket végeztünk az SPSS20 szoftver segítségével. Az
826 egyéni ROC-görbék összehasonlításakor a MedCalc Statisztikai Szoftvert használtuk a DeLong
827 teszt elvégzésére.

828

829

830 **IV. EREDMÉNYEK**

831

832 **IV. 1. A HYPOGLIKÉMIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SEJTES** 833 **MODELLEN**

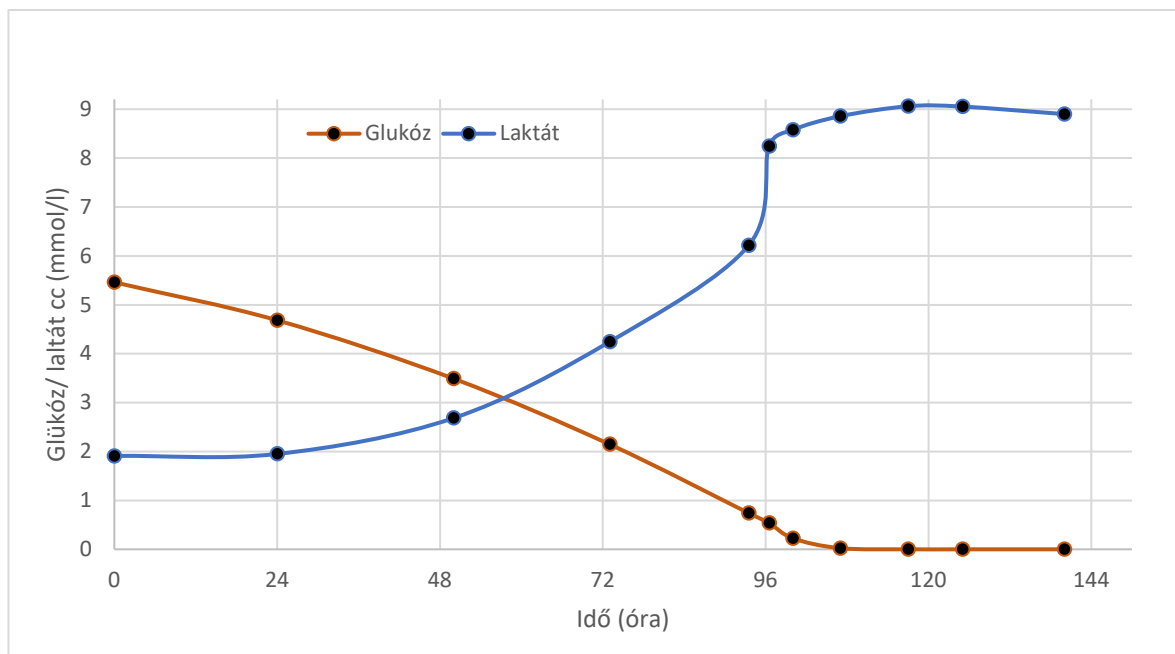
834

835 **IV. 1. 1. AZ ELSŐ KÍSÉRLETEK ÖSSZEFOGLALÁSA - KEZDETI** 836 **PRÓBÁLKOZÁSOK**

837

838 Ebben az alfejezetben szeretném bemutatni azoknak a kísérleteknek egy részét, amelyek a
839 dolgozatom egyik alapjául szolgáló cikkig vezettek, s bár nem kerülnek közlésre, fontos
840 állomásai a felvetett probléma körüljárásának.

841 Kezdetben az SH SY5Y sejteket több választott ideig kezeltük és a glükózkoncentrációkat is
842 változtattuk. A próbák között szerepelt 8, 24, 72, 96 és 140 órás vizsgálat is. A
843 glükózkoncentrációk kissé tágabb határok között változtak: 7 mM-tól a teljes cukormegvonásig
844 és annak időbeni kitolásáig terjedtek a kísérletek. Ezek közül az egyik meghatározó a 140 órán
845 át tartó megfigyelés volt, melynek során a sejteken médiumcsere (EMEM-F12) nem történt és
846 a metabolikus változásaikon kívül a morfológiájuk és az O-Glikoziláció mértéke is detektálásra
847 került hagyományos Western blottal, RL2 antitest használatával. Ez alapján egy teljes képet
848 kaphattunk arról, hogy beavatkozás nélkül hogyan alakul az EC glükóz-, és laktát koncentráció
849 mellett az O-GlcNAc szintje. A glükóz 96 óráig, körülbelül 0,5 mM glükózsztig
850 gyorsan csökkent, majd ezt követően a folyamat lelassult. A laktátszint ezzel párhuzamosan
851 növekedett és hasonlóan a glükózhoz, reciprok lassú növekedést mutatott, elért egy platót, majd
852 csökkent. (5. ábra, 1. Táblázat)



854 **5. ábra:**

855 *A glükóz- és laktátkoncentrációk változása 140 óra alatt médiumcsere nélkül.*

856

857

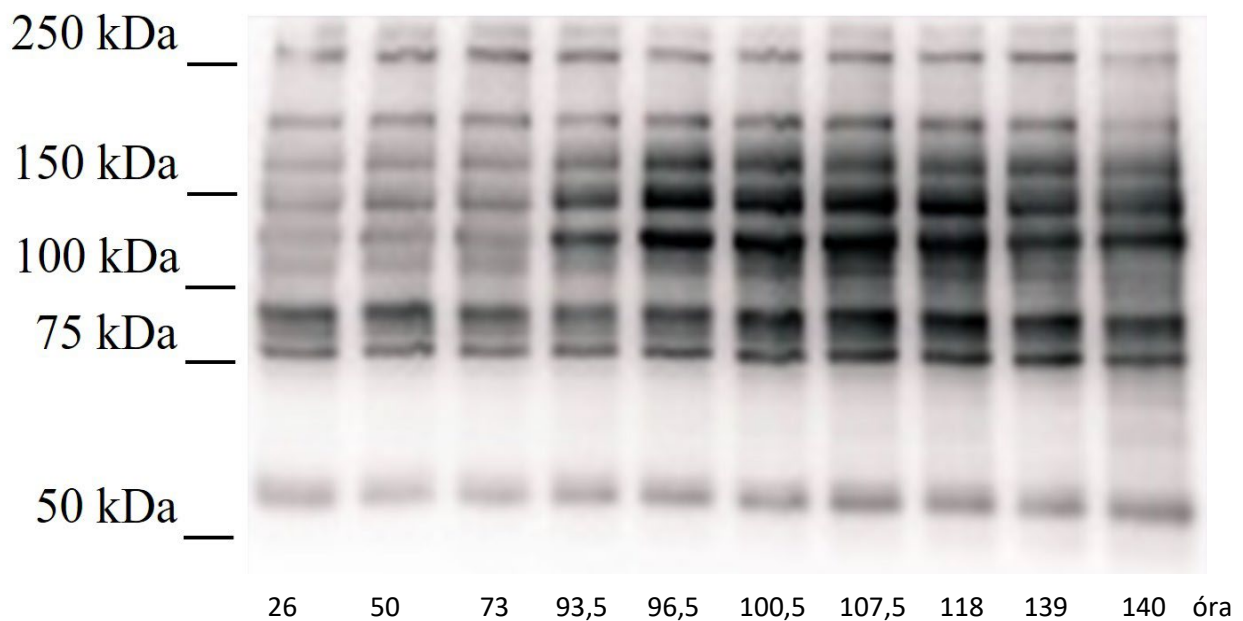
| Átlagos glükóz cc. (mM) | Átlagos laktát cc. (mM) | Kísérlet vége (óra) | Denzitás |
|----------------------------|----------------------------|------------------------|----------|
| 5,76 | 2,81 | 26 | 57,49 |
| 3,49 | 4,25 | 50 | 66,24 |
| 2,14 | 6,22 | 73 | 69,87 |
| 0,73 | 8,25 | 93,5 | 79,82 |
| 0,54 | 8,57 | 96,5 | 100,11 |
| 0,25 | 8,85 | 100,5 | 109,38 |
| 0,025 | 9,06 | 107,5 | 120,64 |
| 0 | 9,06 | 118 | 117,02 |
| 0 | 8,9 | 139 | 107,64 |
| 0 | 8,78 | 140 | 109,03 |

875

876 **1. Táblázat:** *A glükóz- és a laktátszintek átlagos változása a sejtek begyűjtésének, azaz az adott*
 877 *kísérlet végének pontos időpontjaival. A denzitás mértékét Image J szoftver*
 878 *használatának segítségével határoztuk meg azonos területek kijelölésének és*
 879 *lemérésének segítségével.*

880

881 Az O-GlcNAc szintek meghatározására látható, hogy 93,5 óránál az O-GlcNAc mértéke
882 erőteljesebben fokozódott egészen a 107,5. óráig, amikor a glükóz elfogyásával a szintje
883 csökkenni kezdett. (6. ábra)



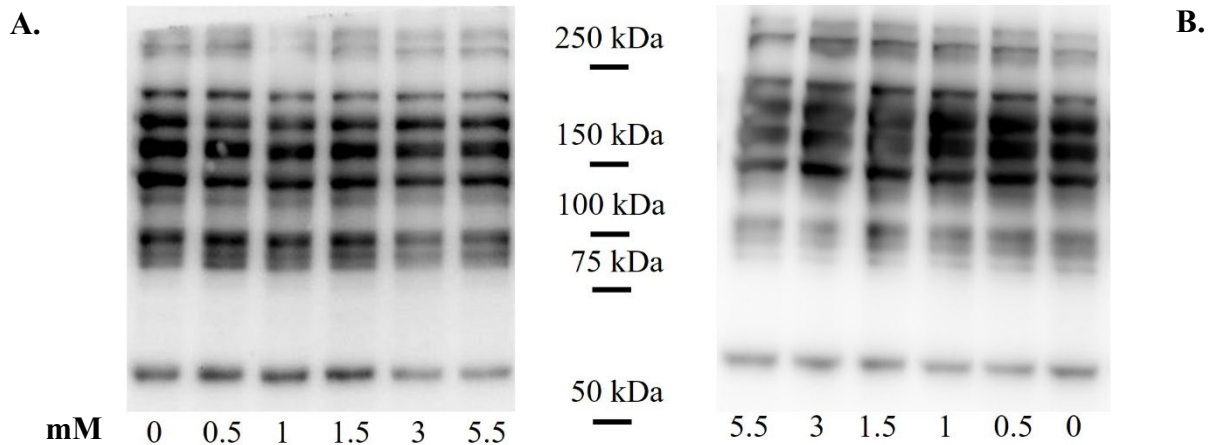
884 **6. ábra:**
885 *Western blot az O-GlcNAc szintek 140 órás nyomonkövetéséről. Bal oldalon a molekulásúlynak*
886 *megfelelő futási magasságokat jelöltem.*
887

888 Ezt követően megpróbáltuk fokozatosan csökkenteni az időt, ugyanakkor a médiumot 24
889 óránként cseréltük és 6 különböző glükózkonzentrációt állítottunk be: 5,5; 3; 1,5; 1, 0,5; 0 mM.
890 A 96 órás kísérletben a kontrollhoz képest 1,5 mM glükózkonzentrációnál emelkedést láttunk
891 az O-GlcNAc szintjében (7. A. ábra), míg a 72 órás vizsgálatban ez a változás már 3 mM-nál
892 elkezdődött. (7. B. ábra) Az adott kísérletekben a flaskák konfluenciája 100%-os volt. Itt
893 életképesség- vagy osztódási ráta vizsgálat még nem történt. Összességében azt tapasztaltuk,
894 hogy több napos inkubáció alatt, amennyiben az állandó glükózsint körülbelül 1 mM-os
895 koncentrációig biztosított, a neuroblasztóma sejtekben az O-GlcNAc szintje emelkedik, majd a
896 glükóz további fogyásával csökkenni kezd.

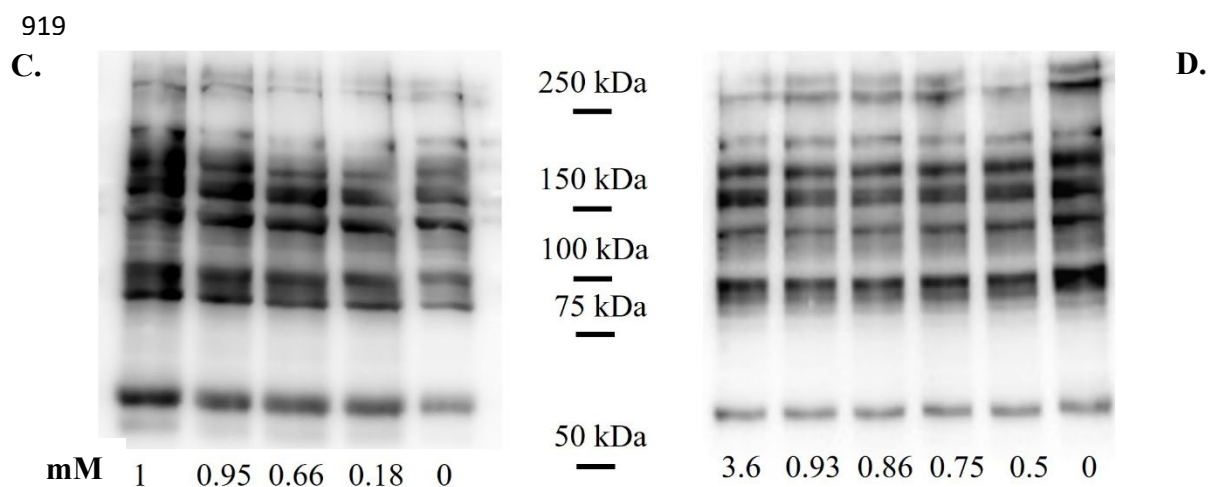
897 Teljesen glükózmentes médiumot nem tudtunk elérni az eredeti recepttel, mivel az FBS
898 cukortartalmát nem tudtuk kiküszöbölni, emiatt próbálkoztunk úgynevezett „előemésztett”
899 médiummal, vagyis extra glükóz hozzáadása nélkül elkészített RPMI médiumot hagytunk SH
900 SY5Y sejt kultúrán addig, ameddig annak glükózkonzentrációja mérhetetlenül alacsony szintre
901 csökkent és ezt követően használtuk föl. Azonban nyilvánvalóan a laktátszint magasabb maradt,
902 ami annak további növekedésével járt, emellett nem zárhattuk ki az esetlegesen a médiumba
903 került egyéb faktorok jelenlétét sem, ami az előző sejt kultúra után maradhatott benne. Így végül

904 ezt az eljárást beszüntettük a fals eredmények elkerülése végett. A változást 1,5-1 mM
 905 glükózkonzentrációnál várva megpróbáltuk, hogy 1,3 mM glükóz tartalmú médiumba
 906 helyeztük a neuroblasztómákat és médiumcsere nélkül 72 órát követően állítottuk le a kísérletet
 907 akkor, amikor már nem maradt cukor a médiumban. Így összesen 5 flaskában indítottuk el a
 908 kísérletet és 24 óránként gyűjtöttünk be a sejteket; az elsőt az 1,3 mM glükóztartalmú oldatban
 909 történt 24 órás inkubációt követően. (7. C. *ábra*) Itt az O-GlcNAc szintje fokozatosan
 910 csökkent. Ezt követő kísérletben a glükózkonzentrációt 1,5 mM-ra állítottuk be 24 órás 5,5 mM
 911 glükóz tartalmú RPMI médiumban történő inkubációt követően, majd a kritikus
 912 glükózkonzentráció meghatározása végett több időpontot jelöltünk ki a sejtek begyűjtésére: 1,
 913 2, 4, 8 és 24 órával később fejeztük be a kísérletet. A kontrollhoz képest az O-GlcNAc szintje
 914 nem változott számottevően, majd az idő előrehaladtával (és a glükóz mennyiségének
 915 csökkenésével) a legutolsó mintában – tehát miután a sejtek 24 órát töltöttek a kezdeti 1,5 mM
 916 glükózkonzentrációjú médiumban – a kontroll szintje fölé emelkedett. (7. D. *ábra*)

917



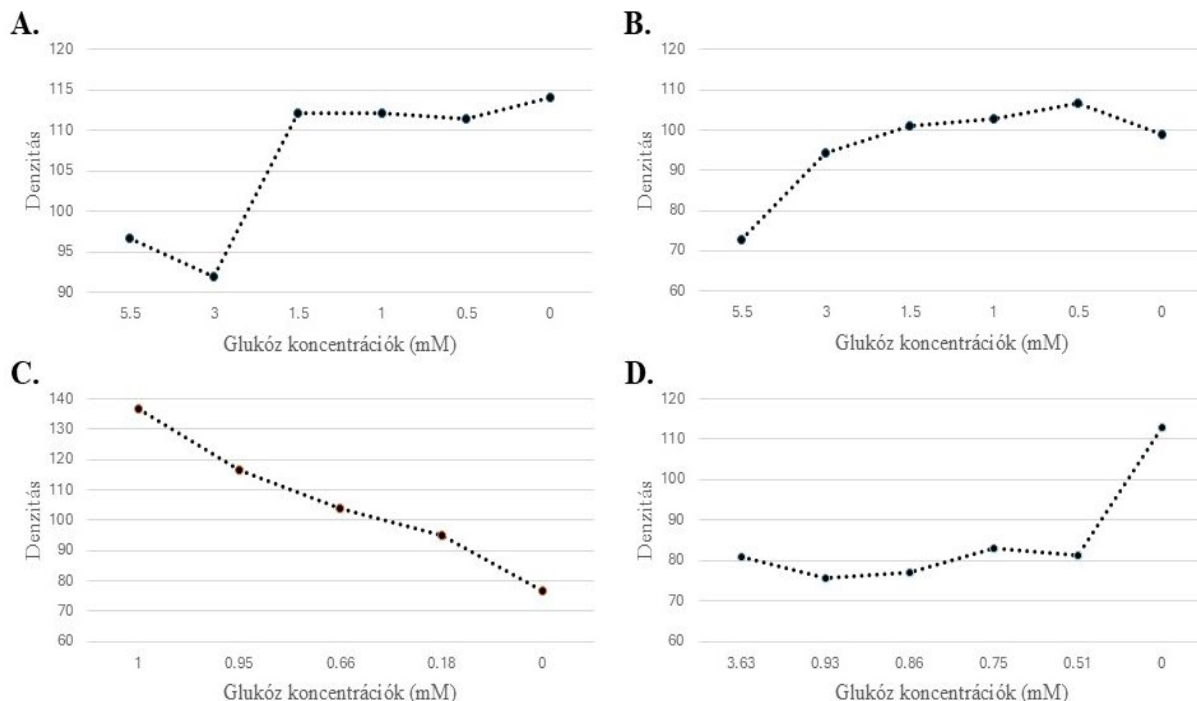
918



920

921

922



923

924 **7. ábra:**

925 **Felül:** Western blot képek RL2 jelöléssel különböző kísérletekben. Középen a molekulasúly
926 (kDa), a detektált képek alatt az A és B esetben a kezdeti, a C és D esetben a végső
927 glükózkoncentrációk vannak feltüntetve (mM) a futásnak megfelelően.

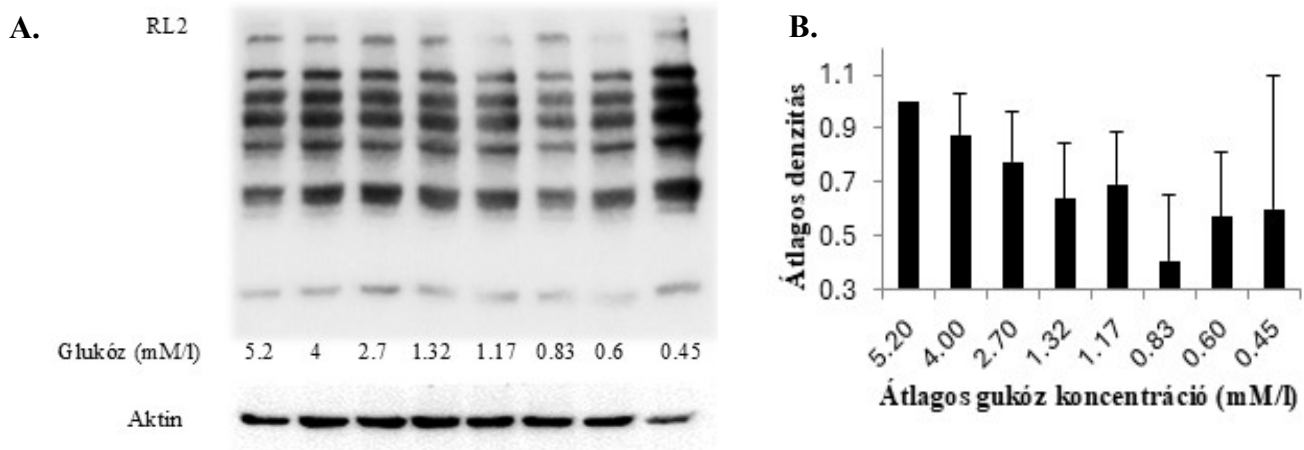
928 **Alul:** Image J szoftver alkalmazását követően a Western blotok mintánkénti össz-denzitásának
929 ábrázolása a glükózkoncentrációk függvényében. **A:** 96 órán át és **B:** 72 órán át történt
930 inkubáció 24 óránként cserélt médiummal a kezdetileg beállított glükózkoncentrációknak
931 megfelelően. **C:** Kezdeti 1,3 mM glükóztartalmú médiumban történt 72 órás inkubáció. **D:**
932 Balról indulva 5,5 mM glükózkoncentrációjú médiumban 24 órás inkubációt, majd azt követően
933 1,5 mM glükóztartalmú médiumba való áthelyezést követően történt inkubáció 1, 2, 4, 8, majd
934 újabb 24 órán át további médiumcsere nélkül.

935

936 Ezt követően egy 8 órás megfigyelést végeztünk különböző glükóztartalmú médiumok
937 beállítása mellett. A mellékelt ábrán (**8. ábra**) a feltüntetett kezdeti mM-os értékek háromszori
938 ismétlés során mért átlaga látható. A kiértékelt Western blotok alapján arra a következtetésre
939 jutottunk, hogy az O-Glikoziláció csökkenése már ezen időszak alatt is 1 és 0,5 mM között
940 elkezdődik, majd az EC cukor további fogyásával emelkedni kezd.

941

942



943 **8. ábra:**

944 **A.** *Reprezentatív Western blot 8 órás kezelést követően. A neuroblasztóma sejteket 8 különböző*
 945 *glükóz koncentrációjú médiumban inkubáltuk 8 órán keresztül, mely alatt ismételt médiumcsere*
 946 *nem történt. A flaskák konfluenciája 75%-os volt a kísérlet befejezésekor. A fehérjéket RL2 és*
 947 *Aktin antitestekkel jelöltük. **B.** Kéértékelt Western blotok átlagos denzitásának ábrázolása a*
 948 *szórás mértékével együtt (SD). n=3*

949

950 A fenti kísérletek bemutatásával szerettem volna érzékeltetni azt az utat, ami során eljutottunk
 951 a jelenlegi, 24 órás modellünkhöz, amely még korántsem a kísérletsorozatok végét jelenti.

952 A célunk az volt, hogy – az AD kialakulásának megfelelően – egy hosszabb, állandó
 953 hypoglikémiás környezetet tudjunk biztosítani a sejteknek, ezáltal modellezve a betegség lassú
 954 progresszióját, biztosítva az elegendő időt az adott feltételekhez történő alkalmazkodáshoz
 955 stresszreakció kialakulása nélkül. Ezért figyelembe véve az SH SY5Y sejt vonal közel 48 órás
 956 duplikációs idejét a 24 órás megfigyelést választottuk 6 különböző glükózkoncentráció
 957 beállításával a médiumban, melyeket a korábbi kísérletsorozatokból kiindulva átlagos
 958 értékeként határoztunk meg: 0,5; 0,8; 1,3; 1,8; 3 és 5 mM. További kihívást jelentett a
 959 legmegfelelőbb konfluencia elérése a begyűjtés szempontjából, hiszen, ha ez túl alacsony, nem
 960 tudjuk megfelelően detektálni a jelet, ha pedig túl magas a kísérlet végére, akkor az a
 961 neuroblasztómákban szintén elindíthat egyfajta stresszreakciót, megemelve ezzel az O-GlcNAc
 962 szintjét, nem is említve a glükózfelhasználás mértékének változását. Ennek megoldásában volt
 963 segítségünkre a MM kinetika és a Lineweaver- Burk diagram használata.

964

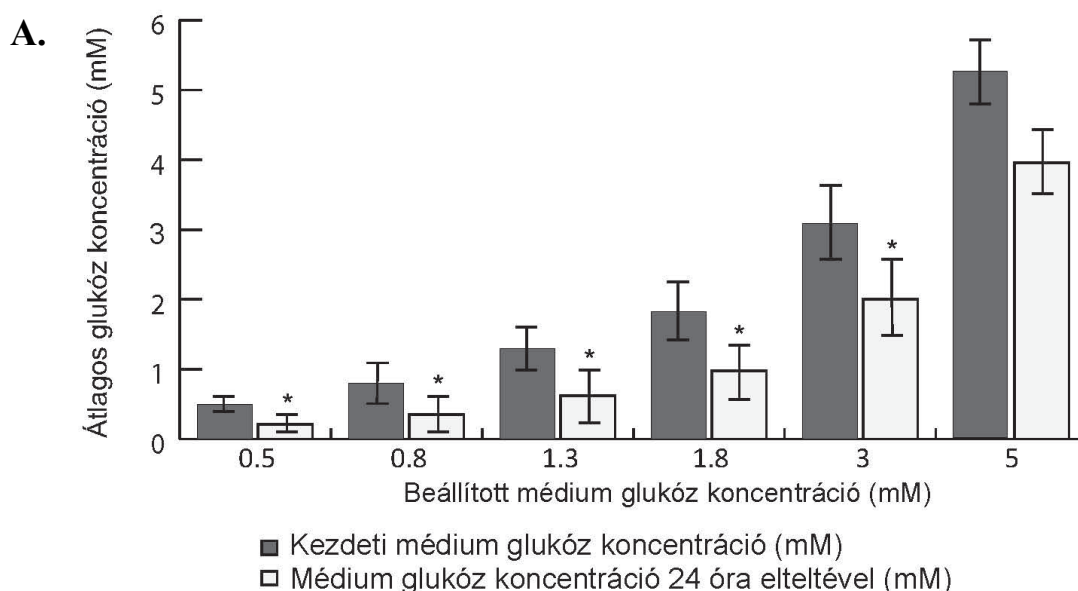
965 IV. 1. 2. A JELENLEGI MODELL BEMUTATÁSA

966

967 IV. 1. 2. 1. A glükóz koncentrációk változása

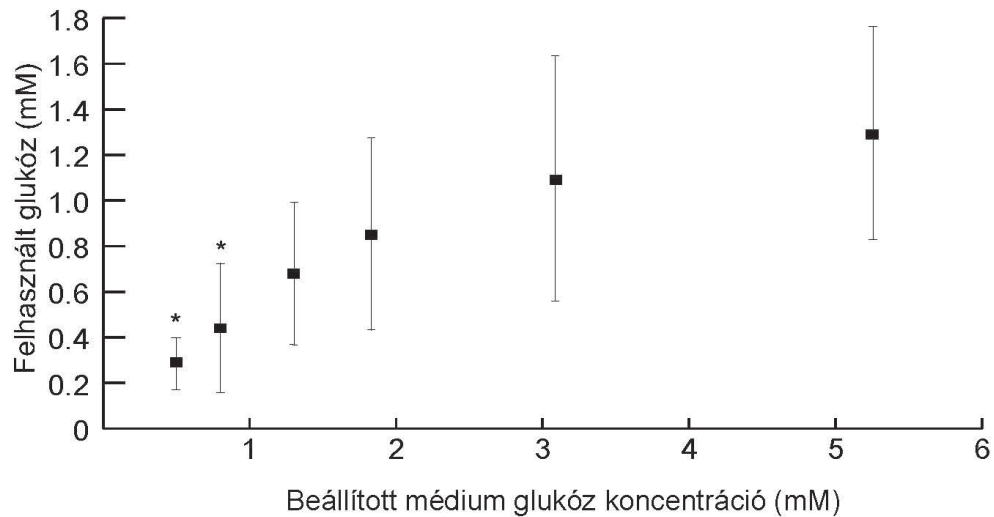
968

969 A neuroblasztóma sejteket 24 órán át RPMI médiumban inkubáltuk, melyeket különböző
970 glükóz koncentrációkkal egészítettünk ki (0,5; 0,8; 1,3; 1,8; 3; 5 mM). A médium glükóz- és
971 laktátkoncentrációit párhuzamosan követtük. Átlagosan a 0,5 mM, 0,8 mM és 1,3 mM glükózt
972 tartalmazó médiumban lévő sejtek 57,1% ($\pm 0,11$), 55,6% ($\pm 0,28$) és 52,0% ($\pm 0,31$) glükózt
973 fogyasztottak el. Ezzel szemben az 1,8 mM, 3 mM és 5 mM glükózkoncentrációjú médiumban
974 tartott sejtek 46,5% ($\pm 0,42$), 25,4% ($\pm 0,53$) és 24,6% ($\pm 0,46$) glükózt használtak el (**9. ábra A**
975 **és B**). A glükózfogyasztás jelentősen alacsonyabb volt a 0,5 és a 0,8 mM glükózzal kiegészített
976 médiumban tenyésztett sejtek esetében az 5 mM glükózzal kezeltékhez képest (0,29; 0,44 vs.
977 1,29 mM). Továbbá, a glükóz kimerülése, mint az EC glükóz koncentrációjának függvénye,
978 nem-lineáris kapcsolatot követett. Mivel a glükóz transzporterek és minden glikolitikus lépés
979 MM kinetikát követ, adatainkat Lineweaver-Burk diagramon ábrázoltuk [99; 100] (**9. ábra C**).
980 Kísérletes eredményeink szorosan illeszkedtek az MM kinetikus görbéhez. A görbétől való
981 átlagos eltérés 0,65% ($\pm 5,91\%$) volt. Megállapítottuk, hogy kísérleti körülményeink mellett a
982 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)
983 értéket vett fel.



984

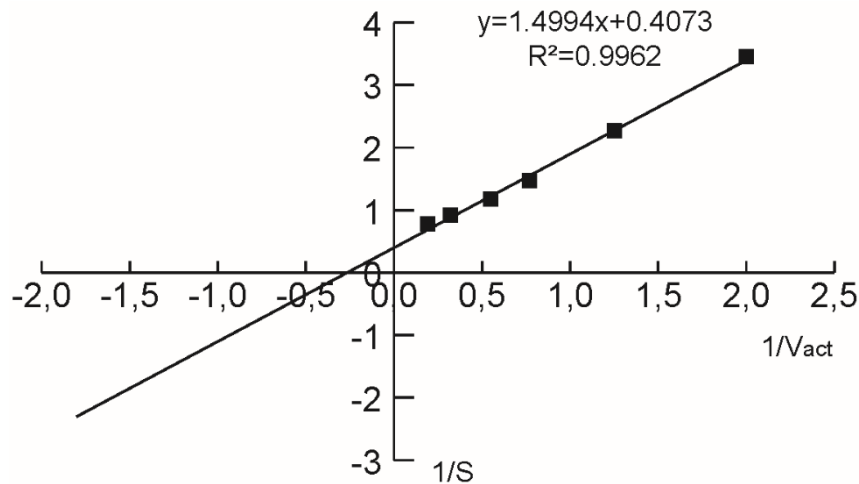
B.



985

986

C.



987

988 **9. ábra:** A glükóz fogyasztás nyomon követése.

989 **A.** EC glükóz koncentrációk a kísérlet előtt és után. **B.** Átlagos glükóz fogyasztás 24 óra alatt.

990 * $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkoncentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA, Dunnett T3

991 post hoc testet alkalmazva. $n = 7$

992 **C.** A glükóz felhasználás alapján felvett Lineweaver-Burk diagram. A MM kinetikát követve a

993 V_{max} és a K_m kiszámítható.

994

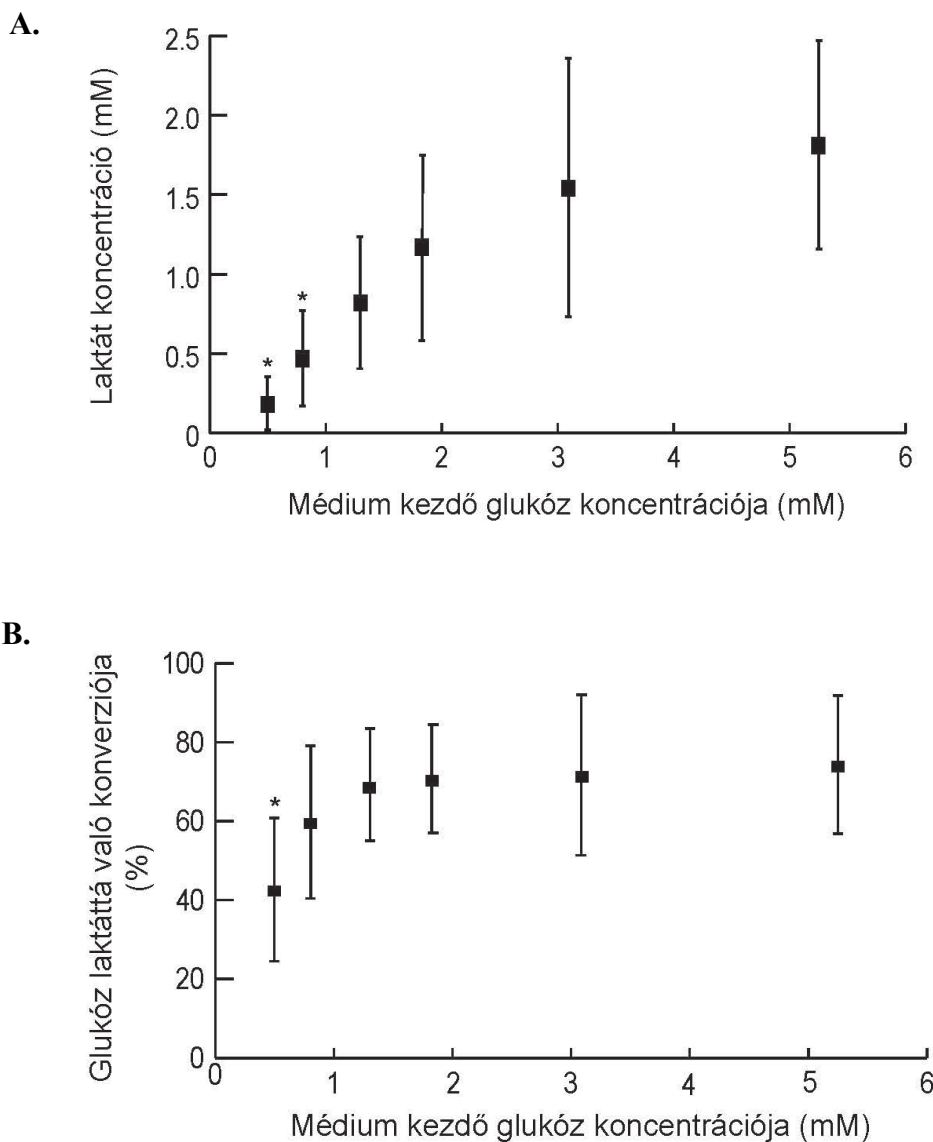
995 **IV. 1. 2. 2. Adaptáció a Michaelis-Menten kinetikához**

996

997 A Michaelis-Menten kinetika alapján a glükóz fogyasztás alacsony EC glükózszinteken
998 gyorsabban csökken, mint ahogy azt várnánk egy lineáris modell alkalmazása esetén. Ezért
999 vizsgáltuk meg, hogy vajon a sejtek képesek-e alkalmazkodni ehhez az anyagcserével
1000 kapcsolatos kihíváshoz. Normoglikémiás körülmények között az SH-SY5Y sejtek a glükózt
1001 laktáttá majdnem sztöchiometriás arányban alakítják át (~70-80%). Megállapítottuk, hogy ez

1002 az arány csökkenni kezd $\sim 1,8$ mM EC glükózkoncentráció alatt, míg felette viszonylag
1003 változatlan marad. Azaz a laktát-konverziós arány 73.8% ($\pm 17.4\%$), 70.3% ($\pm 13.7\%$) és 42.35%
1004 ($\pm 18\%$) volt 5-, 1,8- illetve 0,5 mM glükóz tartalmú médiumban inkubált sejtekben (**10. A és B**
1005 **ábra**).

1006



1007

1008

1009

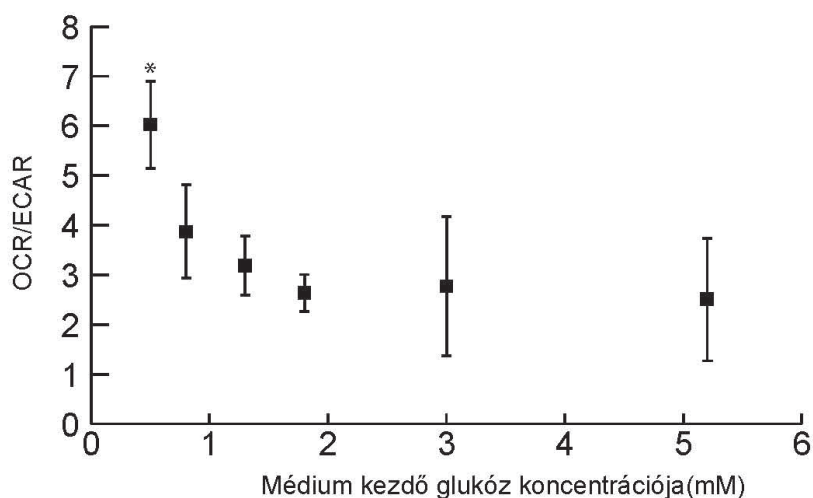
1010 **10. ábra: A. Laktát termelés és B. Glükóz konverzió laktattá 24 órás inkubációt követően.**

1011 ** $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkoncentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA és Dunnett*
1012 *T3 (laktát termelés) ill. Bonferroni post hoc tesztek alkalmazásával. $n = 7$*

1013

1014 Az anyagcserében a glikolízis és az oxidatív foszforiláció metabolikus hozzájárulását is
1015 értékeltük az Oxigénfogyasztási ráta (OCR) és az EC savasodási ráta (ECAR) mérésével az
1016 Agilent Seahorse Extracellular Flux (XF HS Mini Analyzer) Analizátorral (**11. ábra**).
1017 Hasonlóan a laktát-konverziós arányokhoz, az OCR/ECAR arány nem változott 5 mM – 1,8
1018 mM között, de 1,8 mM EC glükózsint alatt fokozatosan nőtt. A 0,5 mM glükóz tartalmú

1019 médiumban kezelt sejtek esetében lényegesen emelkedett, 3-szorosan magasabb OCR/ECAR
1020 aránya volt, az 5 mM glükózzal kezelt sejtekhez képest.



1021 **11. ábra:**

1022 *Normalizált OCR/ECAR arányok. A normalizáció a lyukanként mért proteinkoncentrációra*
1023 *történt a kísérlet befejeztével. * $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkoncentrációhoz*
1024 *viszonyítva, egyutas ANOVA és Bonferroni post hoc tesztek alkalmazásával. $n=3$*

1025

1026 **IV. 1. 2. 3. Intracelluláris glükózsztint mérése**

1027

1028 Az intracelluláris (IC) glükózsztint jelzi a glükóz bejutása és az IC glükóz-felhasználó
1029 folyamatok összessége közötti nettó egyensúlyt (**12. ábra**). Eredményeink szerint nem volt
1030 jelentős különbség az EC glükózfeltételek között - azaz a sejtek konstansan tartották az IC
1031 glükózsztintjeiket. Úgy tűnt, hogy van egy alap IC glükózsztint $\sim 10 \mu\text{M}$ körül, amely egyik
1032 esetben sem csökkent ez alá, míg az "extra" mennyiségű EC glükóz ($\sim 3 \text{ mM}$ és felette) növelte
1033 az IC glükózsztintet is.

1034

1035

1036

1037

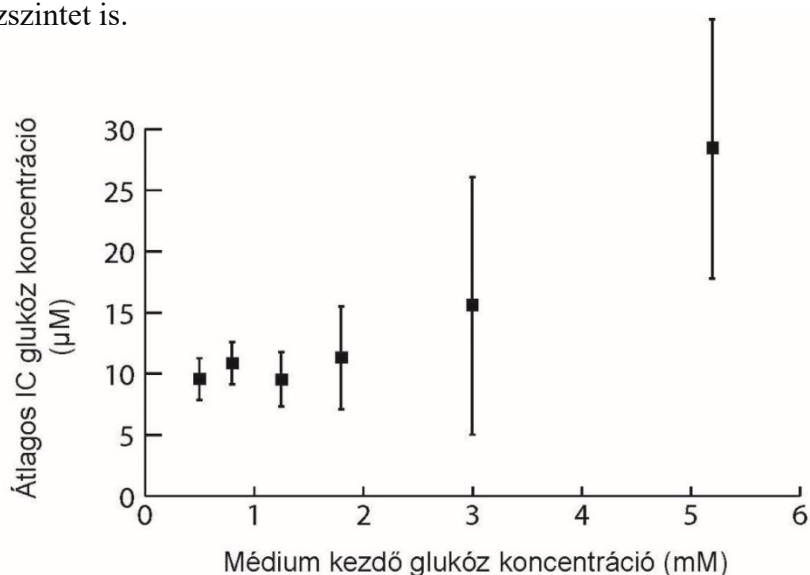
1038

1039

1040

1041

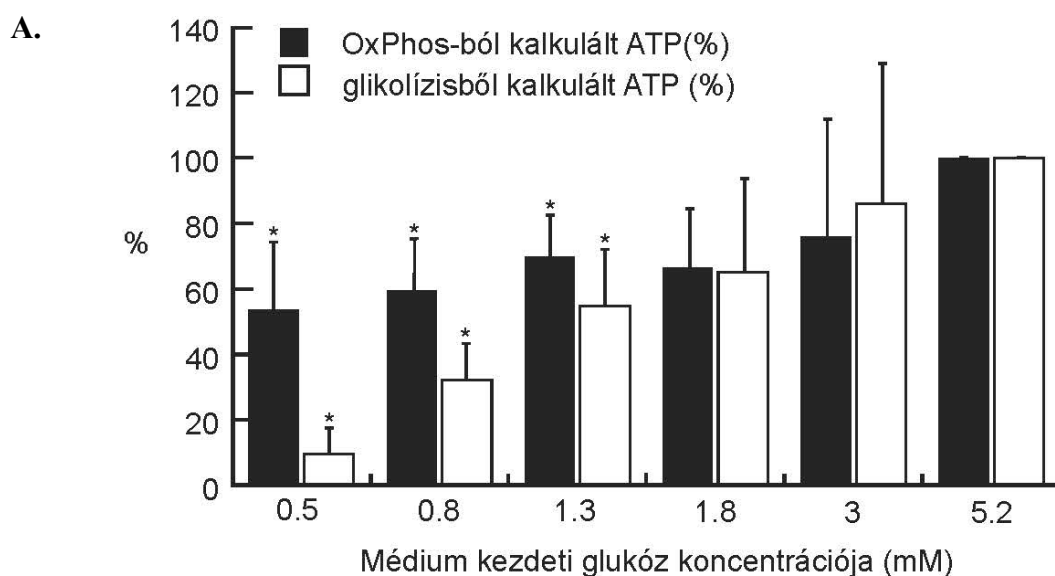
1042



1043 **12. ábra:** Mért IC glükóz szintek. $n=5$

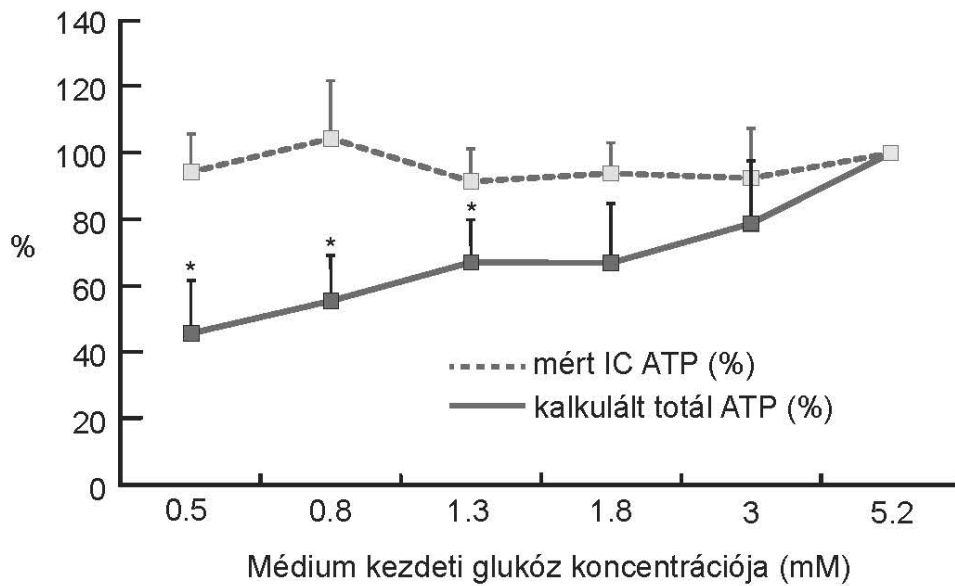
1044 **IV. 1. 2. 4. Az ATP szintek meghatározása**

1045
1046 A glükózfogyasztás és a laktát termelés adatainak felhasználásával kiszámoltuk a maximálisan
1047 elérhető ATP szintet, feltételezve, hogy mind a glikolízis, mind az oxidatív foszforiláció a
1048 teoretikus maximális hatékonyságot éri el (**13. A ábra**). Megállapítottuk, hogy a sejteknek
1049 jelentős tartalékaik vannak az ATP szint fenntartásához az oxidatív foszforilációs ráta
1050 növelésével. Tehát, elméletileg az 1,8 mM-nál alacsonyabb EC glükózsztintnek kitett sejt
1051 jelentősen növelheti az ATP szintjét a laktát felhasználásával és az oxidatív foszforiláció
1052 növelésével. Hogy teszteljük ezt az elméletet, megmértük az effektív ATP szintet a sejtekben
1053 (**13. B. ábra**). Meglepő módon az anyagcsereadaptáció nemcsak csökkentette a fogyó
1054 energiaforrások hatását, hanem az ATP szintek állandóak maradtak, illetve a mért ATP szintek
1055 nem különböztek jelentősen egyik esetben sem. Ez arra utalhat, hogy más adaptációs
1056 mechanizmusok is jelen lehetnek az OCR/ECAR-n kívül.
1057



1058
1059 **13. A. ábra:** Az OxPhos-ból és a glikolízisből kiszámított teoretikus ATP szintek arányai.
1060 * $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkoncentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA és Dunnett
1061 T3 post hoc teszt alkalmazásával. $n = 5$

B.



1062

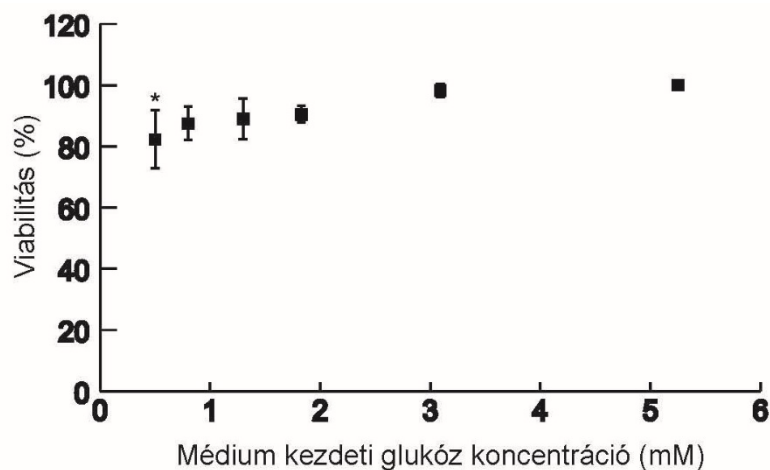
1063 **13. B. ábra:** A mért és a számított totál ATP szintek aránya. * $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os
1064 glükózkoncentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA, Dunnett T3 post hoc test alkalmazásával.
1065 $n=5$

1066

1067 **IV. 1. 2. 5. A sejtviabilitás vizsgálata**

1068

1069 A sejtek életképességét MTT reakcióval mértük meg. Jelentős különbségek csak a 0,5 mM és
1070 a 3 mM vagy 5 mM glükóz tartalmú médiumban tartott sejtek esetében mutatkoztak, míg a
1071 többinél nem detektáltunk változást (**14. ábra**). Az átlagos csökkenés 17.8% ($\pm 9.5\%$) volt a 0,5
1072 mM-os esetben.



1073

1074 **14. ábra:**

1075 A sejtek életképessége a különböző glükóz koncentrációjú médiumokban.

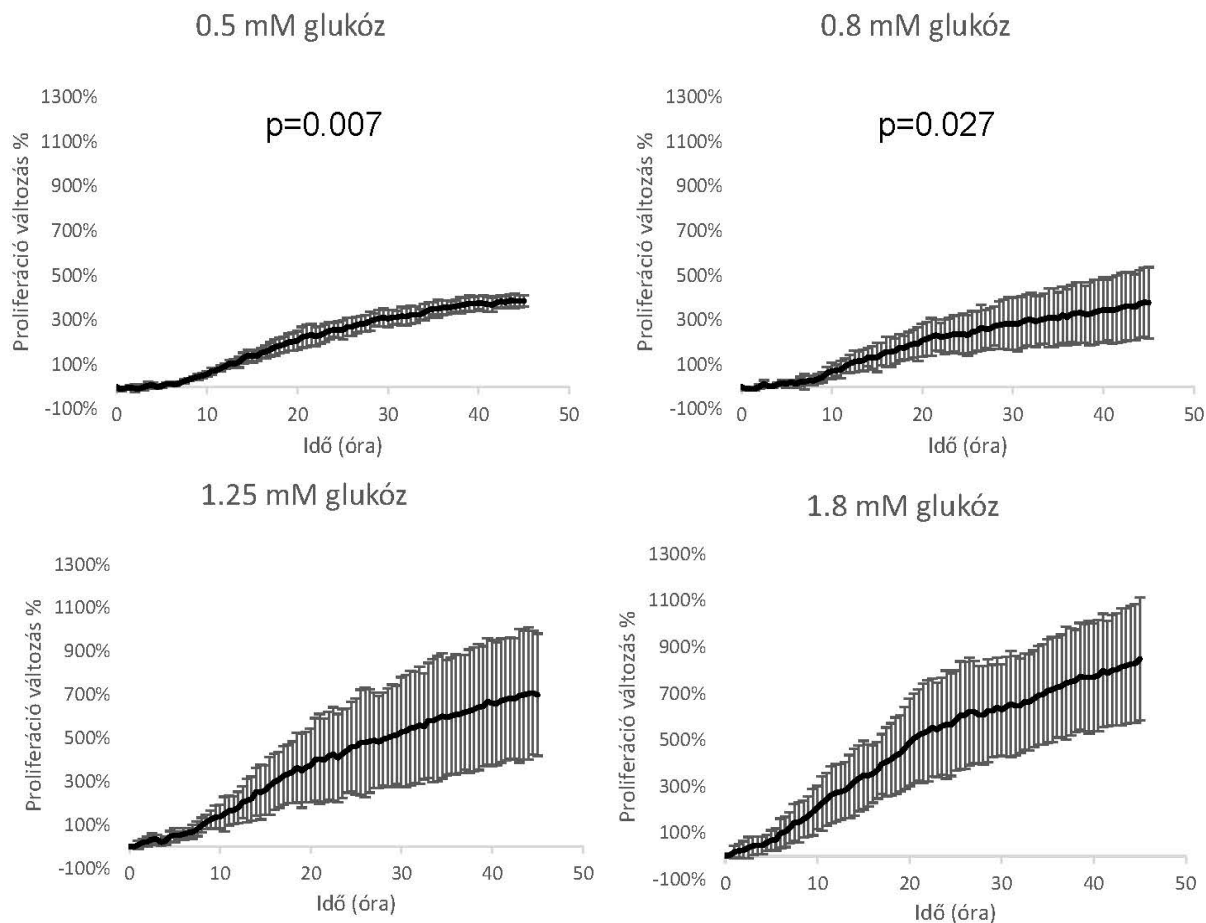
1076 * $p < 0.05$ a kontroll 5 mM-os glükózkoncentrációhoz viszonyítva, egyutas ANOVA és Bonferroni
1077 post hoc teszt alkalmazásával. $n=3$

1078

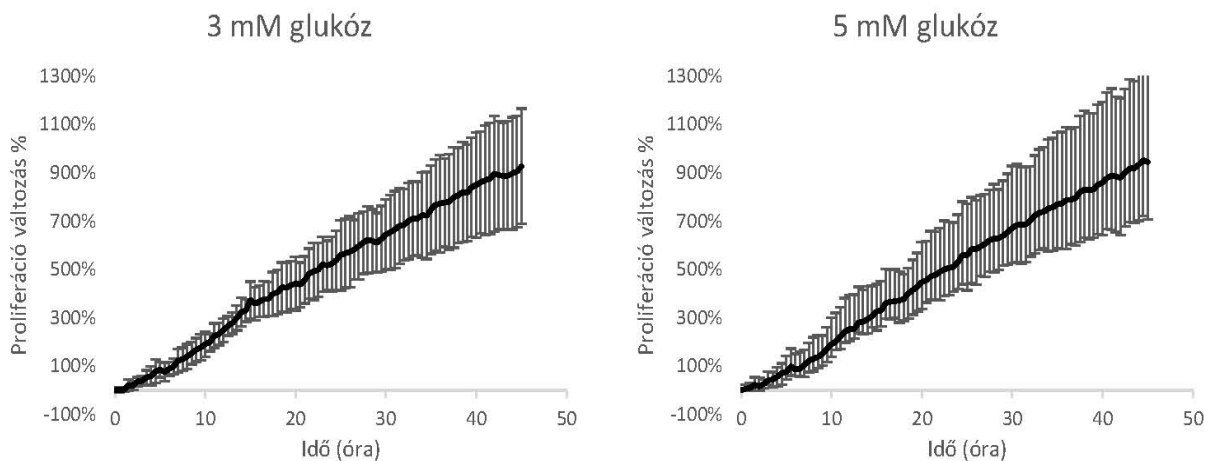
1079 *IV. 1. 2. 6. A sejtproliferáció és -morfológia vizsgálata*

1080

1081 Ellentétben egy primer idegszövetrel, az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek rendelkeznek
1082 mitotikus aktivitással [101], amelyet a glükóz elérhetősége befolyásolhat [30]. Ezért értékeltük
1083 a sejtosztódási arányt JuLi mikroszkóppal (**15. ábra**). 24 óra elteltével a 0,5 mM és a 0,8 mM
1084 glükózzal kezelt sejtek osztódási aránya jelentősen lassabb volt az 5 mM glükóz tartalmú
1085 médiumban inkubált sejtekhez képest ($p=0,007$, illetve $p=0,027$). A felvétel végén (45 óra) a
1086 különböző glükózzal kezelt sejtek aránya közötti különbség továbbra is fennállt; a 0,5 mM és
1087 az 1,25 mM glükózzal kezelt sejtek osztódási aránya mindössze $40,1 (\pm 3) \%$ és $40,0 (\pm 17) \%$
1088 volt a kontrollhoz (5 mM) képest. Azonban meg kell említeni, hogy a sejtek által elfoglalt
1089 terület nem pontosan felel meg a sejtszámnak vagy a sejt térfogat/-massza aránynak ezzel
1090 módszerrel, tekintve, hogy a program által meghatározott sejterületek nem pontosan tükrözik
1091 a sejtek valódi számát. (**16. ábra**) A közvetlen mikroszkópos megfigyelés szintén egyértelműen
1092 kimutatta a sejtek lassabb mitotikus aktivitását hypoglikémiás körülmények között, azonban
1093 morfológiai változásokat nem találtunk a különböző kezelésekek között, noha ez utóbbi nem
1094 tekinthető teljesen objektívnek. (**17. ábra**).



1095



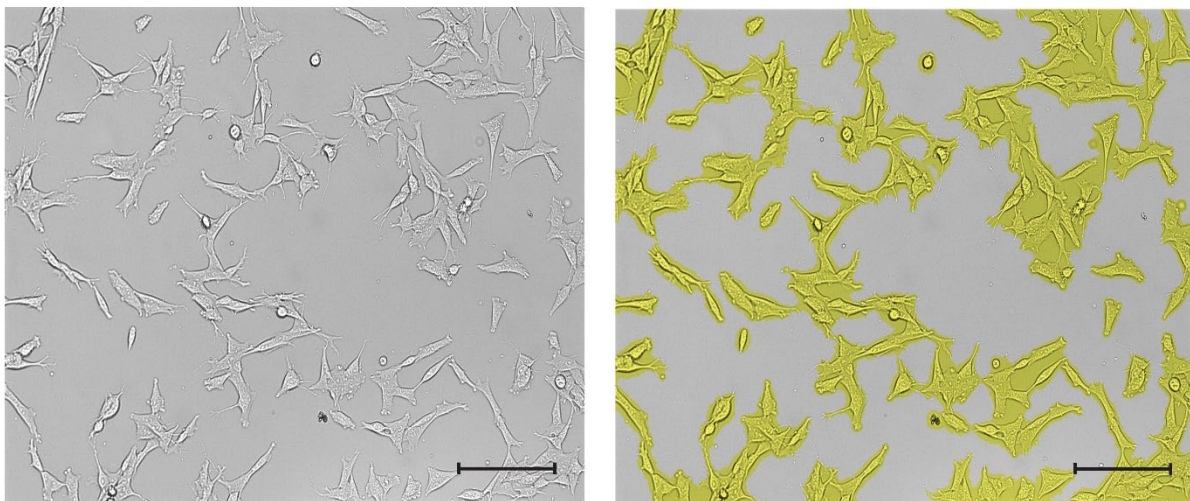
1096 **15. ábra:**

1097 *A sejtproliferáció változásai a kezdeti beállított glükózkoncentrációk szerint az idő*
1098 *függvényében, SD értékekkel együtt feltüntetve. n=4*

1099

1100

1101

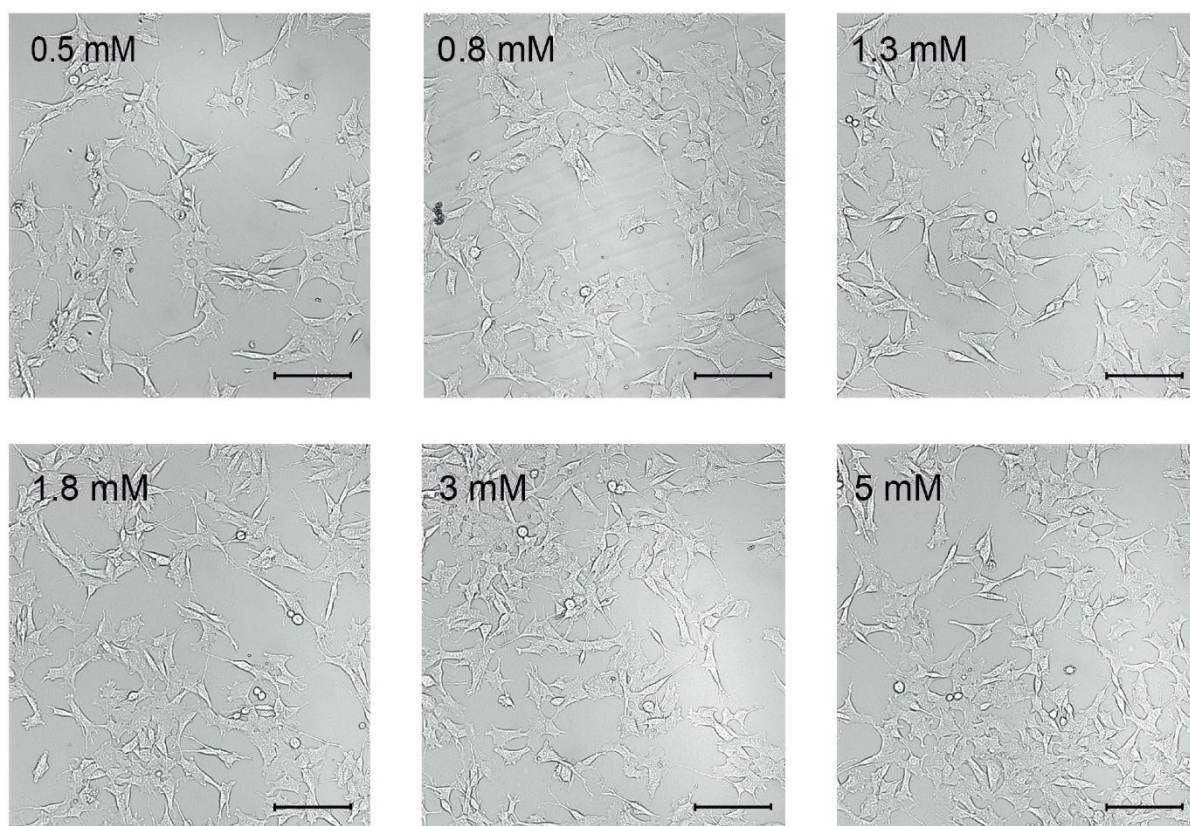


1102

1103 **16. ábra:**

1104 *A JuLi mikroszkóp által valós időben rögzített felvétel és a proliferáció becslésére használt*
1105 *számítás alapja a területi fedettség a fényintenzitás változásai alapján. A módszer becslésnek*
1106 *megfelelő, azonban pontos, számszerű adatokat nem szolgáltat.*

1107 *A méretarány 125 μm .*



1109 **17. ábra:**
 1110 *A neuroblasztómák morfológiai változásai a különböző glükóz koncentrációjú médiumokban.*
 1111 *A méretarány 125 μ m.*
 1112

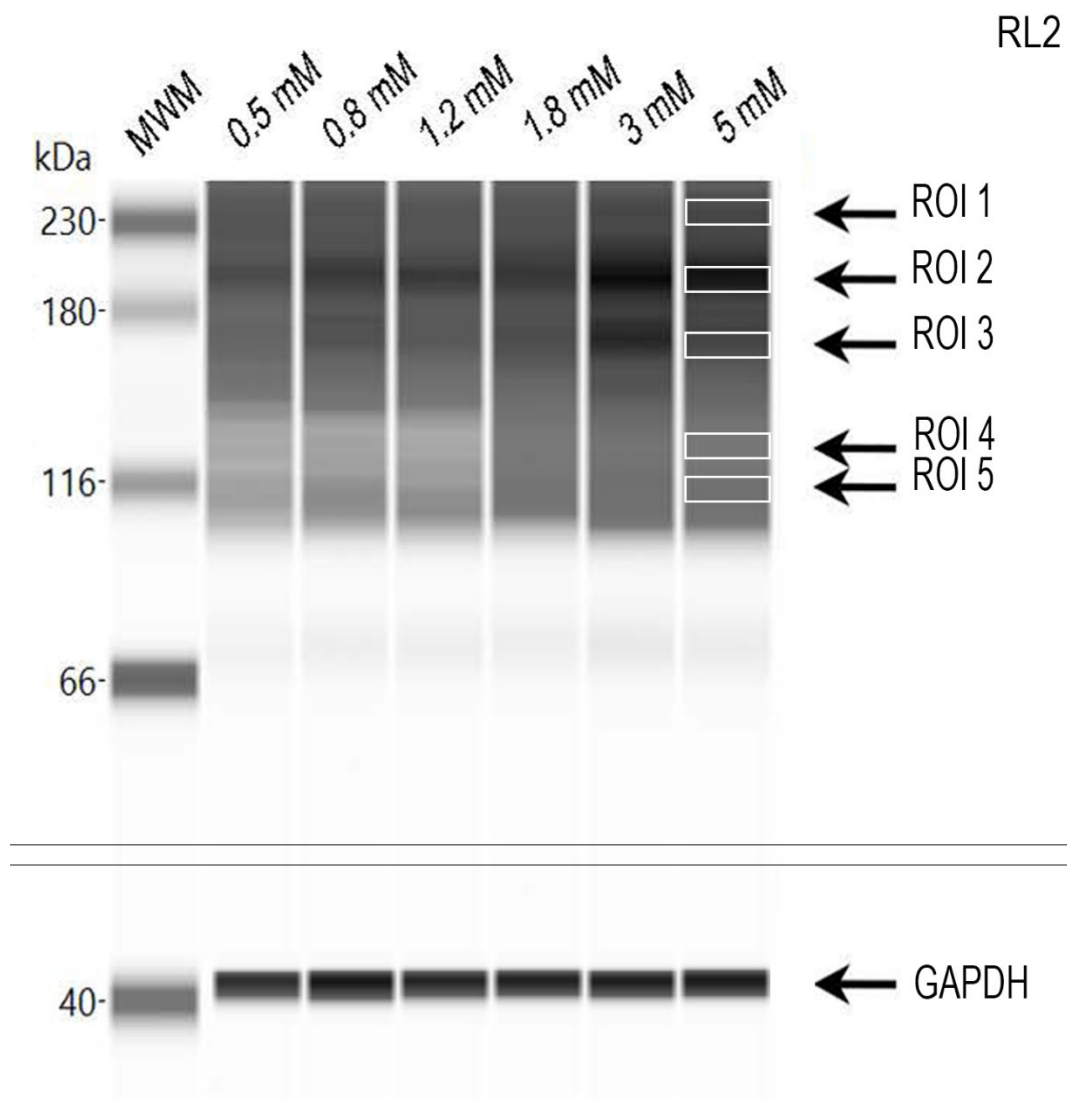
1113 **IV. 1. 2. 7. Az o-Glikoziláció vizsgálata**

1114

1115 A fehérje O-GlcNAc módosítása különböző sejtfolyamatokat képvisel, amelyek glükózt
 1116 használnak fel, és érzékeny mutatója az átalakult glükózanyagcserének [30]. Az O-GlcNAc
 1117 szinteket immunoblotokkal igazoltuk (**18. ábra**). Öt régiót (ROI 1-5) választottunk ki az RL2
 1118 antitest által jelölt fehérjék közül, amelyek kb. $\sim 100 - 230$ kDa közötti molekulásúly
 1119 tartományban találhatóak, hogy elemezzük a különböző hpoglikémiás (0,5 – 3 mM)
 1120 körülmények hatását 24 órás időtartamon belül a normoglikémiás (5 mM) körülményekhez
 1121 viszonyítva. (**19. ábra**) A felső molekulatömegű régiókban ($\sim 180 - 230$ kD) nem találtunk
 1122 jelentős változásokat. A kisebb molekulatömegű régiókban ($\sim 100 - 180$ kD) az O-GlcNAc
 1123 szintek fokozatosan csökkentek, a EC glükóz mennyiségének csökkenésével arányosan. Azaz,
 1124 az O-GlcNAc szintek szignifikánsan csökkentek a 0,5 mM EC glükózzal kezelt sejtekben a
 1125 ROI 3 -5 területen ($65\% \pm 17,68$). A ROI 4-5 területen az O-GlcNAc szintje a 0,8 mM EC
 1126 glükózzal kezelt sejtekben is szignifikánsan csökkent (ROI 4, 0,5 mM: $47,34\% \pm 12,94$; 0,8 mM:

1127 59,02%±9,28; ROI 5, 0,5 mM: 55,23%±14,73 és 0,8 mM: 63,1%±10,84) a
1128 kontrollkörülmenyekhez viszonyítva.

1129

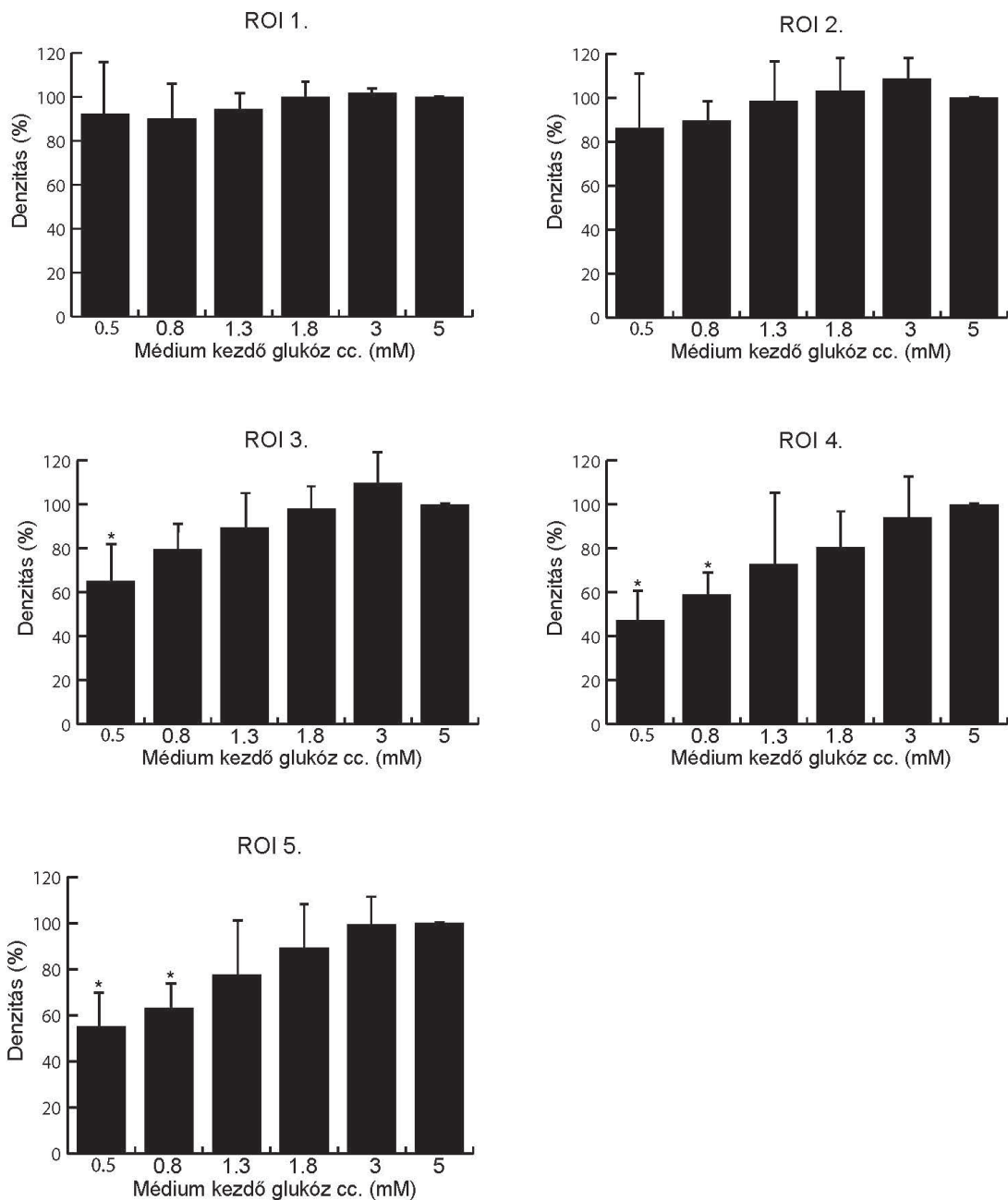


1130

1131

1132 **18. ábra:**

1133 *Reprezentatív Western blot a totál SH SY5Y sejtizántumból a 24 órás kezelést követően Wes*
1134 *segítségével. Az O-Glikoziláció mértékét RL2 antitest használatával határoztuk meg, emellett*
1135 *detektálásra került a GAPDH is.*



1136

19. ábra:

A Western blot régiók elemzése. Az O-glikozilációt RL2 antitest segítségével határoztuk meg, kontrollként a GAPDH antitestet 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 glükóz koncentrációinak (cc.) függvényében. Statisztikai tesztként egyutas ANOVA-t használtunk, Bonferroni post hoc teszttel kiegészítve. * $p < 0.05$ $n = 6$

1137

1138

IV. 2. A PLAZMA GLÜKÓZ ÉS A HbA1c KAPCSOLATÁNAK MODELLEZÉSE

1139

1140

1141 Retrospektív módon elemeztünk 15 év alatt összegyűlt 175437 rögzített laboratóriumi
 1142 eredményt, amelyek egyszerre tartalmaztak plazma glükóz és HbA_{1c} adatokat. A kutatás
 1143 tárgyát képező adatok jellemzőit az **2. Táblázat** foglalja össze. Az összes beteg száma 46646
 1144 volt, az egy személyre eső átlagos vizsgálatok száma 3,76 volt. A látogatások között eltelt
 1145 átlagos idő kb. 10 hónap volt. 4686 beteg 10 vagy több bejegyzéssel rendelkezett, a bejegyzések
 1146 között eltelt átlagos idő 6,2 hónap volt (a magyar egészségbiztosítás évente legfeljebb 4 db
 1147 HbA_{1c} tesztet finanszíroz). A **20. A** ábra mutatja a mért plazma glükóz és HbA_{1c} eredmények
 1148 eloszlását. Az eredmények számának és a glükózkoncentrációnak az eloszlása a **21. ábrán**
 1149 látható.

1150

1151 **2. Táblázat** A kutatás tárgyának jellemzői

| | Összes vizsgálat | Összesített | Férfiak | Nők |
|--|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Betegszám | | 46646 | 21652 | 24994 |
| Megjelenések száma | | 175437 | 83894 | 91543 |
| Megjelenések számának átlaga/ fő | | 3.76 | 3.87 | 3.66 |
| A megjelenések között eltelt átlagos idő (hónap) | | 10.05 | 9.83 | 10.25 |
| Az első megjelenéskori életkor (átlag ± SD) | | 56.75 (±16.82) | 56.02 (±15.96) | 57.38 (±17.51) |
| Az utolsó megjelenéskori életkor (átlag ± SD) | | 59.06 (±17.28) | 58.38 (±16.44) | 59.65 (±17.96) |
| Hemoglobin (g/L, az összes megjelenés átlaga±SD) | | 138.02 (±16.55) | 144.14 (±16.8) | 132.4 (±14.17) |
| Plazma glükóz (mM, az összes megjelenés átlaga±SD) | | 7.63 (±3.21) | 7.86 (±3.25) | 7.42 (±3.16) |
| HbA_{1c} (mmol/mol, az összes megjelenés átlaga±SD) | | 50 (±16.1) | 50.4 (±16.2) | 49.6 (±16.1) |
| HbA_{1c} % ≥ 158.7 mmol/mol | | 0.021 | 0.023 | 0.019 |
| A minimum 10 alkalommal megjelent betegek adatai | | | | |
| Betegszám | | 4686 | 2286 | 2400 |
| Megjelenések száma | | 6.19 | 6.13 | 6.25 |
| Az első megjelenéskori életkor (átlag ± SD) | | 58.48 (±12.44) | 57.72 (±11.72) | 59.2 (±13.05) |
| A 10. megjelenéskori életkor (átlag ± SD) | | 63.85 (±12.54) | 63.11 (±11.81) | 64.55 (±13.15) |
| Az első alkalommal mért hemoglobinszint (g/L, átlag ±SD) | | 139.83 (±16.46) | 145.54 (±15.27) | 134.02 (±13.39) |
| A 10. alkalommal mért hemoglobinszint (g/L, átlag ±SD) | | 136.84 (±16.57) | 142.92 (±16.37) | 131.06 (±14.57) |

| | | | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Az első alkalommal mért lazma glükózsztint (mM, átlag \pm SD) | 8.49 (\pm 3.55) | 8.76 (\pm 3.74) | 8.22 (\pm 3.35) |
| A 10. alkalommal mért lazma glükózsztint (mM, átlag \pm SD) | 8.23 (\pm 3.3) | 8.37 (\pm 3.25) | 8.09 (\pm 3.34) |
| Az első alkalommal mért HbA _{1c} szintje (mmol/mol, átlag \pm SD) | 56.7 (\pm 18.8) | 56.7 (\pm 19) | 56.8 (\pm 1) |
| HbA _{1c} at the 10th visit (mmol/mol, átlag \pm SD) | 53.6 (\pm 15.2) | 53.4 (\pm 14.4) | 53.9 (\pm 15.8) |
| Az első alkalom K _m értéke (átlag \pm SD) | 16.1 (\pm 5.69) | 16.6 (\pm 5.89) | 15.6 (\pm 5.47) |
| A 10. Alkalom K _m értéke (átlag \pm SD) | 16.9 (\pm 5.67) | 17.3 (\pm 5.79) | 16.5 (\pm 5.53) |

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

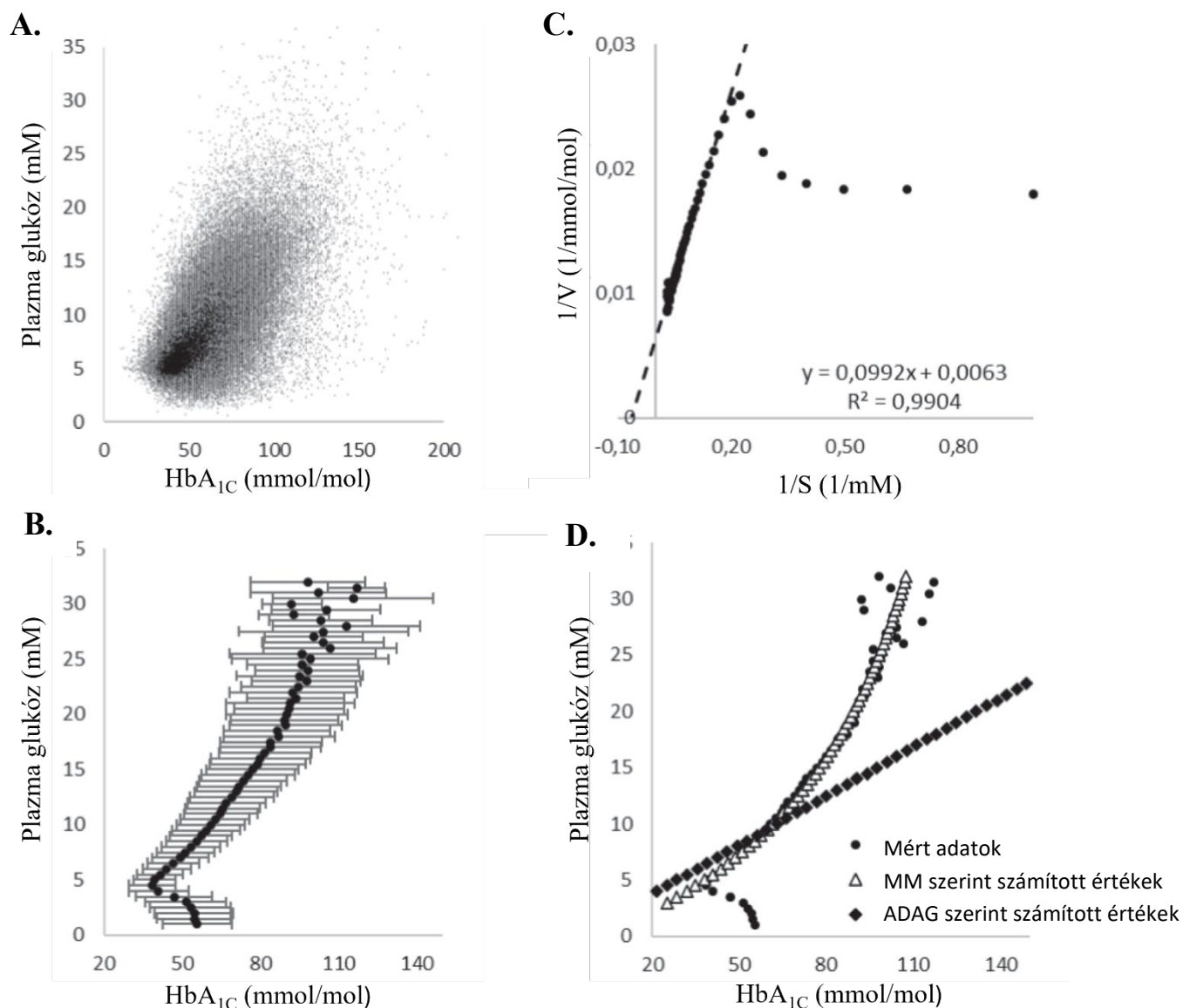
1168

1169

1170

1171

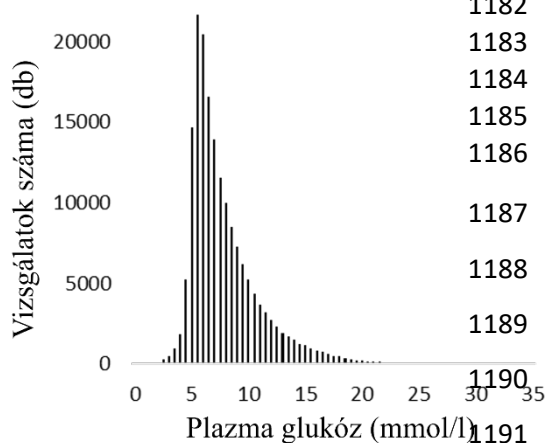
1172



1173 **20. ábra:**

1174 *A HbA_{1c} és a vele egyidejűleg mért plazmaglükóz-szintek közötti kapcsolat. (A) Nyers adatok,*
 1175 *175 437 esemény ábrázolva. (B) Átlagos (\pm SD) HbA_{1c} értékek bemutatása. Minden adatpont*
 1176 *egy 0.5 mM plazmaglükóz-koncentrációs tartományt képvisel. (C) Lineweaver-Burk ábra az*

1177 *HbA_{1c} kinetikájáról. Az átlagos HbA_{1c} szintek reciprok értékei (1/v) vannak kijelölve a*
 1178 *megfelelő plazmaglükóz-szintek reciprok értékeivel szemben (1/S). (D) Az átlagos HbA_{1c}*
 1179 *értékek előrejelzése a MM (V_{max} = 158,7 mmol/mol és K_m = 15,7 mM) és a lineáris (ADAG)*
 1180 *egyenlet által az észlelt átlagos HbA_{1c} értékekkel összehasonlítva.*
 1181



1182 **21. ábra:**

1183 *A vizsgálatok száma a glükózkoncentráció*
 1184 *függvényében. Minden sáv 0,5 mM-os*
 1185 *glükózkoncentrációs tartományt képvisel.*
 1186

1187 A HbA_{1c} eredményeket a megfelelő
 1188 plazmaglükóz-értékekkel vetettük össze; minden
 1189 kategóriát egy 0,5 mM-os plazmaglükóz-
 1190 tartománnyal határoztunk meg. Ahogy a **20B.**
 1191 **ábrán** látható, az átlagos HbA_{1c} értékeknek

1192 látszólag van egy maximális határértéke. Az átlagos HbA_{1c}- és plazmaglükóz értékek
 1193 Lineweaver–Burk ábrán történő ábrázolásakor (**20C. ábra**) az adatok lineáris mintázatot
 1194 mutattak 5–32 mM glükózértékek között, ami arra utal, hogy a HbA_{1c} képződése a Michaelis-
 1195 Menten (MM) kinetikát követi. A lineáris trendvonal interpolálásával a V_{max} értéke 158.7
 1196 mmol/mol (95% CI, 112.5–269.5 mmol/mol), míg a K_m értéke 15.7 mM volt (95% CI, 15,2–
 1197 16.3 mM). Ezt a K_m értéket a teljes populáció átlagának tekintve megállapítottuk, hogy az MM
 1198 által előrejelzett HbA_{1c} szintek szorosan illeszkedtek a ténylegesen mért átlagos szintekhez
 1199 (**20D. ábra**).

1200 Bár a K_m értéke egy populáció számára szintén tájékoztató lehet, sokkal hasznosabb lenne, ha
 1201 minden egyes egyénre személyre szabott K_m értéket tudnánk meghatározni. Ezért teszteltük az
 1202 MM egyenlet prognosztikai potenciálját az egyén szintjén. Az első 5 adatpárt (a HbA_{1c} és a
 1203 plazmaglükóz) felhasználtuk minden olyan beteg esetében, akinek legalább 6 egymást követő
 1204 megjelenése volt, hogy kiszámítsuk az átlagos K_m paramétert. Ezután kiszámoltuk az elvárt
 1205 HbA_{1c} szinteket a 6. látogatás glükózkoncentrációja alapján, vagy az MM egyenlet (beleértve
 1206 a fent említett személyre szabott K_m-et) vagy az ADAG egyenlet segítségével (amelyet a legelső
 1207 5 látogatás átlagos HGI-jével korrigáltunk). Megállapítottuk, hogy az MM esetében 85.1%-os,
 1208 az ADAG egyenlet esetében 78.4%-os az előrejelzett értékek aránya, 20% alatti hibahatár
 1209 mellett. Az MM egyenlet jobb prognosztikai ereje még a 30. megjelenésre kiterjesztve is
 1210 érvényesült (71.4%-os arányban, ha 20%-os hibahatáron belül maradtunk, míg az ADAG
 1211 egyenletnél ez az arány 66.7% volt), ahogy az a **3. táblázatban** látható. Észrevettük, hogy mind
 1212 az ADAG, mind az MM prognosztikai ereje idővel csökkent, ami arra utal, hogy az egyéni K_m
 1213 érték fokozatosan változhat (például terápia, étrend, öregedés stb. miatt). Ennek nemkívánatos

1214 hatásait könnyen ellensúlyozhatjuk az egyes látogatások után automatikusan frissített K_m
 1215 értékkel, javítva ezzel a prognosztikai erejét.

1216

| MM becslés | Összes | A célértéktől való átlag szórás | 20%-os hibahatárral | |
|------------------------|--------|---------------------------------------|---------------------|------|
| | | | N | % |
| Megjelenés sorszama | N | % (\pm SD) | N | % |
| 6. | 8275 | -0.3 (\pm 14.9) | 7041 | 85.1 |
| 7. | 7040 | -0.6 (\pm 15.4) | 5916 | 84.0 |
| 10. | 4686 | -1.4 (\pm 19.0) | 3593 | 76.7 |
| 20. | 1424 | -1.6 (\pm 21.1) | 1026 | 72.1 |
| 30. | 454 | -2.7 (\pm 20.6) | 324 | 71.4 |

| ADAG becslés | Összes | A célértéktől való átlag szórás | 20%-os hibahatárral | |
|------------------------|--------|---------------------------------------|---------------------|------|
| | | | N | % |
| Megjelenés sorszama | N | % (\pm SD) | N | % |
| 6. | 8275 | -0.9 (\pm 19.1) | 6485 | 78.4 |
| 7. | 7040 | -1.2 (\pm 19.9) | 5423 | 77.0 |
| 10. | 4686 | -1.4 (\pm 21.4) | 3477 | 74.2 |
| 20. | 1424 | -2.1 (\pm 23.9) | 982 | 69.0 |
| 30. | 454 | -2.8 (\pm 24.4) | 303 | 66.7 |

3. Táblázat:

Az MM és az ADAG becslések prognosztikus ereje: A táblázatba az összes egyén, aki legalább 6 megjelenéssel rendelkezett beletartozott (8275 beteg). Az MM számításokhoz a személyre szabott K_m értékeket az első 5 látogatás átlagából határoztuk meg. A HbA_{1c} előrejelzéséhez ezeket a K_m értékeket és a ténylegesen mért plazmaglükóz szinteket minden megjelenés alkalmával beillesztettük az MM egyenletbe. Az ADAG számításokhoz a lineáris egyenletben a ténylegesen mért plazmaglükóz szintjét használtuk, és azt az első 5 megjelenés átlagos HGI-vel korrigáltuk. Az előrejelzett HbA_{1c} értékeket összehasonlítottuk a mért HbA_{1c} értékekkel.

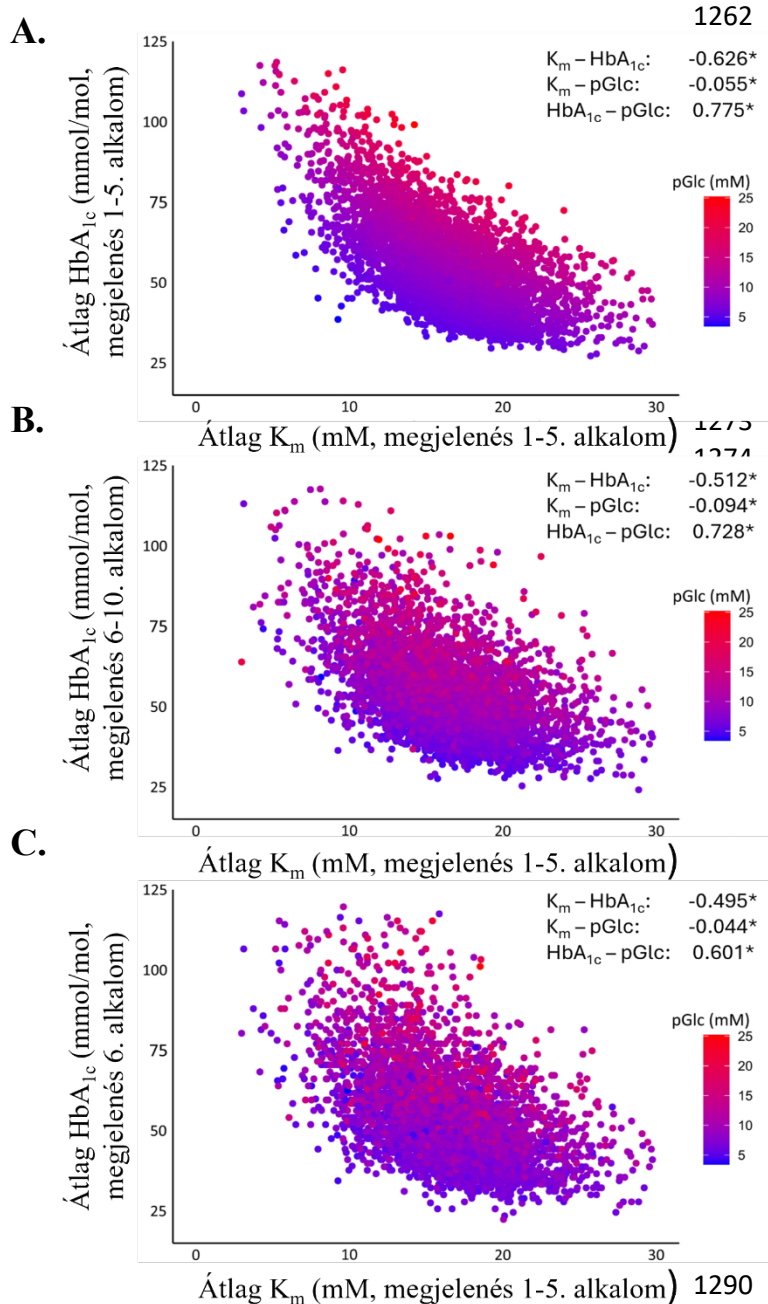
1242

1243 A K_m viszonylagos stabilitásának további bizonyítása végett, ábrázoltuk a K_m értékeket (az első
 1244 5 látogatás átlaga) az első 5 látogatás átlagos HbA_{1c} értékével, a 6. látogatással és a második 5
 1245 látogatás átlagával. Az adatpontokat színekkel kódoltuk a megfelelő, átlagos plazmaglükózsintek
 1246 szerint (**22. ábra**). Ahogy azt vártuk, a magasabb plazmaglükóz koncentrációval rendelkező
 1247 betegek általában magasabb HbA_{1c} szintekkel rendelkeztek. Érdekeség, hogy a K_m -nek
 1248 látszólag fokozatos, fordított kapcsolata van a HbA_{1c} -vel. Azoknak az adatoknak az átlagos
 1249 HbA_{1c} szintje, amelyeknél a K_m értéke egyenlő vagy alacsonyabb volt 14 mM-nál, 80,5
 1250 mmol/mol volt, míg a 14 mM-nál magasabb K_m értékek esetén az átlagos HbA_{1c} szint
 1251 alacsonyabb értéket vett fel: 50,2 mmol/mol-t. Habár az adatok jobban szóródtak, a hatás a
 1252 következő 5 látogatásra (~2,5 évre) is kiterjedt.

1253 Egyéb változók interferálhatnak a K_m -el és befolyásolhatják a HbA_{1c} szinteket, ezért a
 1254 hemoglobin koncentráció, életkor és nem hatását értékeltük a HbA_{1c} -re és a K_m -re egy lineáris
 1255 regressziós modell segítségével (**4. táblázat**). Megállapítottuk, hogy mindhárom paraméter

1256 jelentősen kihat a HbA_{1c}-re vagy a K_m-re, bár kevésbé befolyásolta az eredményt. Másrésztől
 1257 erős, negatív összefüggést találtunk a K_m és az HbA_{1c} között ($r_2 = 0.403$, $F = 3164.2$, $p <$
 1258 0.001), valamint pozitív összefüggést a plazmaglükóz és az HbA_{1c} között ($r_2 = 0,581$, $F =$
 1259 6483.6 , $p < 0,001$). Érdekeség, hogy a K_m és a plazmaglükóz közötti kapcsolat gyenge volt (r_2
 1260 $= 0.001$, $F = 6.729$, $p = 0.010$).

1261



22. 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.

1291

1292 **4. Táblázat:** A plazma glükóz (pGlc), a haemoglobin (Hgb), az életkor és a nem befolyásoló
 1293 szerepe a HbA_{1c} és a K_m értékekre.

1294

| Független változó: | K _m | | pGlc | | Hgb | | Életkor | | Nem | |
|--------------------|-------------------|--------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | HbA _{1c} | pGlc | HbA _{1c} | K _m | HbA _{1c} | K _m | HbA _{1c} | K _m | HbA _{1c} | K _m |
| r ² | 0.403 | 0.001 | 81 | 0.001 | 0.003 | 0 | 0.015 | 0.012 | 0 | 0.012 |
| F | 3164.2 | 6.729 | 6483.6 | 6.729 | 16.36 | 0.282 | 73.52 | 58.52 | 1.043 | 55.61 |
| β | -0.635 | -0.038 | 0.762 | 0.038 | 0.059 | 0.008 | -0.124 | 0.111 | 0.015 | -0.108 |
| t | -56.3 | -2.59 | 80.5 | -2.59 | 4.04 | 0.53 | -8.57 | 7.65 | 1.02 | -7.46 |
| p | <0.001 | 0.010 | <0.001 | 0.010 | <0.001 | 0.596 | <0.001 | <0.001 | 1 | 0.307 |

1295

1296 *Az első 5 mérés átlagértékeit választottuk ki a pGlc, Hgb, HbA_{1c} és Km paraméterek közül,*
 1297 *azokból az adatokból, amelyek legalább 10 egymást követő méréssel rendelkező betegektől*
 1298 *származtak (N = 4686). Az életkor és a nem az első megjelenéskor került rögzítésre. Az önálló*
 1299 *paraméterek HbA_{1c}-hez, pGlc-hoz és Km-hez való kapcsolódását lineáris regressziós modell*
 1300 *segítségével értékeltük. Egyéb, nem lineáris regressziós modellek hasonló r² értékeket*
 1301 *eredményeztek (ezek külön nincsenek feltüntetve).*

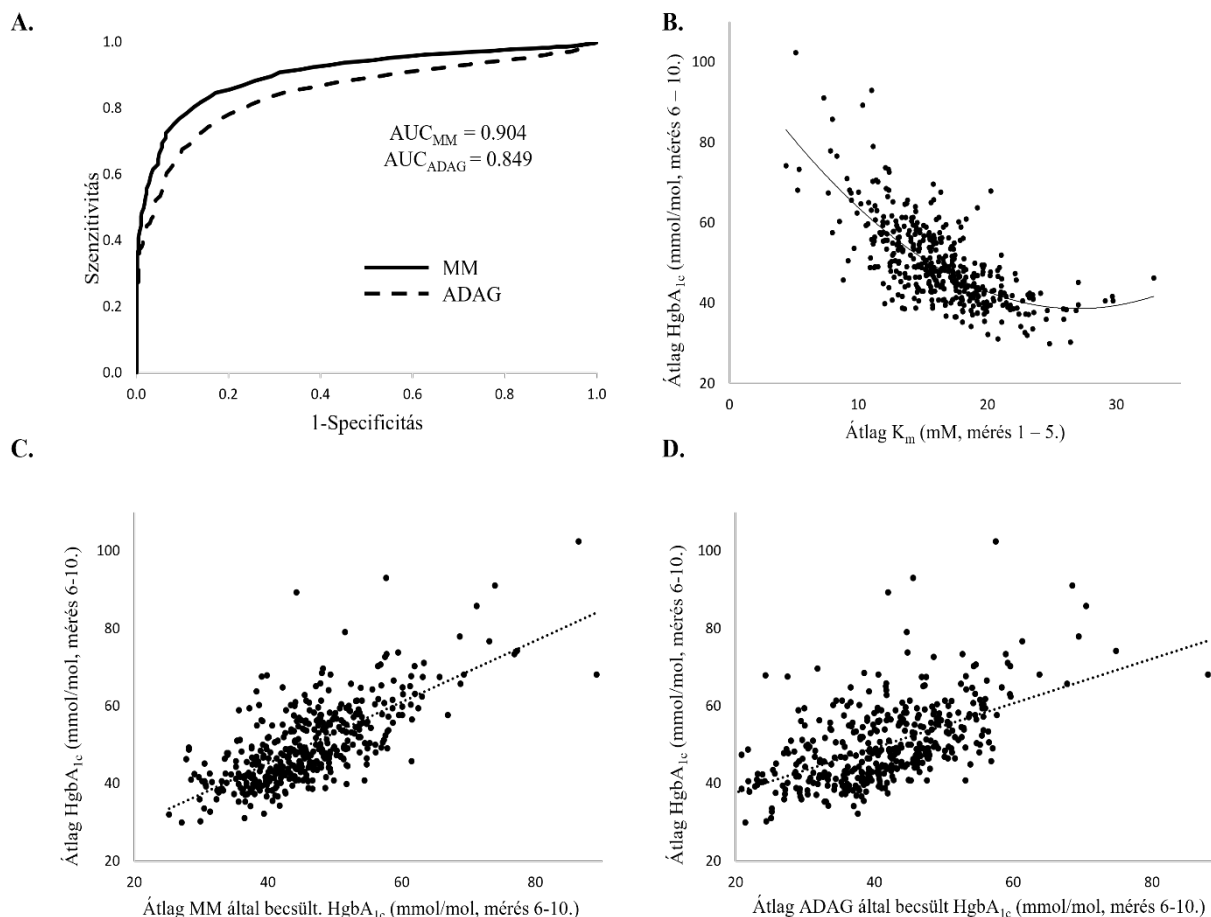
1302

1303 Az MM egyenlet prediktív potenciálját az egyéni K_m értékek alapján ROC elemzéssel
 1304 értékeltük (**23.A. ábra**), a pozitív osztályozás cutoff értéke 37.7 mmol/mol volt. Ebben a
 1305 összehasonlításban az MM jelentősen különbözött (p < 0.0001) és jobban teljesített, mint az
 1306 ADAG (AUC_{MM} = 0.904 (99% konfidencia intervallum: ±0.015) vs. AUC_{ADAG} = 0,849 (99%
 1307 konfidencia intervallum: ±0.018)). Az optimális küszöbértéknél a szenzitivitás 83.3% volt az
 1308 MM esetében és 78.3% az ADAG esetében, míg a specificitás 84.2% és 79.6%.

1309 Az MM prognosztikai értéke akkor tűnik ki igazán, amikor a betegeknél az idő múlásával nagy
 1310 változások történnek a plazmaglükóz szintekben. A **23.B. ábrán** látható azon betegek első 5
 1311 mérésének átlagos K_m értéke a második 5 mérésnek az átlagos HbA_{1c} szintjeinek a
 1312 függvényében, akiknél az 1–5 látogatások során a glükózsztint 7 mM fölött volt, majd a további
 1313 látogatások során átlagosan 7 mM alatti értéket vett föl. Annak ellenére, hogy jelentős
 1314 csökkenés történt a glükózsztintekben, a K_m érték továbbra is negatív korrelációt mutatott a mért
 1315 HbA_{1c}-vel. Amikor ezeket a K_m értékeket (az 1-5. látogatás átlaga) a tényleges
 1316 glükózkoncentrációkkal (6-10. látogatás) együtt beillesztették az MM egyenletbe, hogy
 1317 kiszámítsák a 6-10. látogatásra vonatkozó becsült átlagos HbA_{1c}-értéket, az szignifikáns
 1318 összefüggést mutatott a mért HbA_{1c}-szintekkel (r² = 0,52) (**23.C. ábra**). Ugyanazokat a

1319 kiválasztási kritériumokat alkalmazva az ADAG-előrejelzésnek az átlagos HGI-vel (az 1-5.
 1320 látogatásból) korrigált értéke alacsonyabb determinációs együtthatóval rendelkezett. ($r_2 =$
 1321 0.312) (23.D. ábra).

1322



1323

1324 **23. ábra:**

1325 *Az MM és ADAG becslések prediktív ereje. (A) A 4686 egyed egymást követő rekordjai alapján*
 1326 *készült előrejelző Receiver-operating curve (ROC-görbe) elemzése. Az MM-számításhoz a*
 1327 *személyre szabott K_m -értékeket úgy választottuk, hogy az első 5 látogatás K_m -értékeinek átlagát*
 1328 *vettük alapul. Ezeket a K_m -értékeket és a 6. látogatás mért plazma glükózsintjeit*
 1329 *helyettesítettük be az MM egyenletbe. Az ADAG-számításhoz a 6. látogatás plazma*
 1330 *glükózsintjeit beillesztettük a lineáris egyenletbe, és a számítást korrigáltuk az első 5 látogatás*
 1331 *HGI-értékének átlagával. A függő változó a 6. látogatás mért HbA_{1C} -szintje volt. (B) Azokat az*
 1332 *egyéneket választottuk ki, akiknek átlagos glükózsintje az első 5 vizit során 7 mM-nál*
 1333 *magasabb volt, de a második 5 vizit során 7 mM-nál alacsonyabb ($N = 427$). A K_m -értékeket az*
 1334 *első 5 vizit során mért HbA_{1C} - és plazma glükózsintjeikkel felhasználásával számítottuk ki, és*
 1335 *ábrázoltuk a második 5 vizit során mért HbA_{1C} -értékek átlagának függvényében. (C&D) A B.*
 1336 *pontban szereplő adathalmazzal megegyezően az MM és ADAG (HGI-vel korrigált)*
 1337 *számításokkal előre jelzett HbA_{1C} -szinteket hasonlítottuk össze a mért HbA_{1C} -szintekkel (MM:*
 1338 *$R^2 = 0,517$, $P < 0,001$, ADAG: $R^2 = 0,312$, $P < 0,001$, lineáris regressziós modell).*

1339

1340 V. DISZKUSSZIÓ

1341

1342 V. 1. A HYPOGLIKÉMIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SEJTES 1343 MODELLEN

1344

1345 A dolgozatomban első felében ismertetett sejttes modell segítségével kívántunk pontosabb
1346 ismereteket gyűjteni az idegi eredetű sejtek metabolikus viselkedéséről, amennyiben a
1347 hypoglikémiás környezet lassan, fokozatosan alakul ki és viszonylag hosszú ideig fennáll.
1348 Ezáltal alapot szolgáltatunk az AD progressziójának pontosabb megértéséhez. Az
1349 irodalomban eddig fellelhető kutatások tárgyát már szintén képezték hasonló elképzelések [42;
1350 51; 52; 102], azonban az állatkísérletes modellek (pl. éheztetés) kivitelezése nehézségekbe
1351 ütközik, hiszen a szervezet kompenzációs mechanizmusai aktiválódnak, ezáltal a vércukorszint
1352 csökkenése mérséklődik, az intracerebrális tér homeosztázisa nem borul fel.

1353 A sejttes modellek ebből a szempontból kedvezőbbnek bizonyulnak, ha tisztán a háttérben
1354 húzódo biokémiai folyamatokat kívánjuk vizsgálni. Az irodalomban mind a hyper- [103], mind
1355 a hypoglikémia hatását vizsgálták már különböző sejt kultúrákon [59], ezen belül is az O-
1356 GlcNAc válaszreakciókat is egészen a transzkripció szintjéig. [54; 56; 57; 58; 59; 61; 62; 63]
1357 Hyperglükémia esetén növekedést írtak le, elsősorban az OGT aktivitásának fokozódása miatt
1358 [30; 104], míg hypoglikémiában a kutatások döntő többsége emelkedést tapasztalt [105; 106].
1359 Véleményünk szerint ez a paradox helyzet (lecsökkentett szubsztrát fokozott O-GlcNAc-vel jár)
1360 azzal magyarázható, hogy az O-GlcNAc növekedésének az oka hypoglikémia során egy akut
1361 stresszreakcióként való aktiválódás következménye. Rövid távon ugyanis az O-GlcNAc
1362 szintézishez a sejtnek még elegendő szubsztrátja lehet a raktáraiban. Ezt kívántuk kiküszöbölni
1363 azzal, hogy a neuroblasztóma sejteket – azok sejt ciklusához viszonyítva – hosszabb ideig
1364 alacsony glükózkoncentráció elviselésének tettük ki. Ezáltal az SH SY5Y sejteknek lehetősége
1365 nyílt az alkalmazkodásra, metabolikus útjaik átrendezésére, illetve azok intenzitásainak,
1366 arányainak változtatására. Azt tapasztaltuk, hogy alacsony, 1,8 mM-os glükózkoncentráció alatt
1367 a sejtek metabolizmusa módosul, ami különösen 0,8-0,5 mM-os cukortartalom esetén
1368 szembetűnő a kontrollhoz képest. Ebben az esetben a glükóz Michaelis-Menten kinetikát
1369 követő csökkenése miatt kialakuló hiányt a glikolízis és az OxPhos arányának
1370 megváltoztatásával kompenzálják: a glikolízisből származó ATP mennyisége jelentősebben
1371 csökken, mint az OxPhos-ból származó ATP, mindamellett, hogy ezek összesített szintje nem
1372 tér el jelentősen egymástól. Ezt látszik alátámasztani az OCR/ECAR hányados exponenciális

1373 növekedése is. Tekintettel arra, hogy a hexózamin útvonal egyik szubsztrátja, a fruktóz-6-
1374 foszfát szintén a glikolízisből származik, annak csökkenése magával vonhatja az O-
1375 Glikoziláció csökkenését is. Emellett a glükózfelhasználás alapján felvett Lineweaver-Burk
1376 diagramra a kísérletes eredményeink szorosan illeszkedtek ($R^2=0,9962$), az MM kinetikát
1377 követve a V_{max} és a K_m kiszámíthatóvá vált. Ezen értékek az adott sejtvonalra jellemzőek az
1378 ismertett kísérletsorozatban. A proliferációs ráta követése során a sejtek osztódási aránya
1379 csökkent, mely megfelel az irodalomban tapasztaltakkal, miszerint a sejtek mitotikus
1380 aktivitásának csökkenése a rendelkezésre álló glükóz fogyásával magyarázható. [30; 101] A
1381 neuroblasztóma sejtek a végsőig próbálnak alkalmazkodni a kedvezőtlen környezeti
1382 feltételekhez, így nem csak az ATP szintjüket, hanem az IC glükóz szintjüket is igyekeztek
1383 konstansan tartani, noha egyfajta tendencia megfigyelhető: ~3 mM glükózkoncentráció felett
1384 magasabb értékeket kaptunk (bár az eredmények szórása miatt nem szignifikáns a különbség),
1385 mely szerint az IC glükóz szintje ez alatt csökken, azonban még 0,5 mM esetén sem esik egy
1386 minimál szint alá (~10 μ M). Ha a kísérletet tovább folytatnánk, feltételezhető, hogy az IC
1387 glükóz esetleges további fogyásával, illetve az ATP csökkenése esetén az apoptózis
1388 elkerülhetlenné válna. Ezt a teóriát az irodalomban fellelhető adatok alapján elvethetjük, mert
1389 alternatív tápanyagok alkalmazásával nem csökkent a sejtek túlélése, sokkal inkább a glikolízis
1390 és a hexózamin útvonal blokkolásával [107; 108; 109], ami rávilágít a fenti folyamatok
1391 komplexitására is.

1392 A 24 órás megfigyelés során a sejtek morfológiájában invertált mikroszkóppal történő követés
1393 mellett változás nem történt, az életképesség tekintetében a 0,5 mM-os glükózkoncentrációjú
1394 médiumban tartott sejtek esetén detektáltunk szignifikáns csökkenést. Legfontosabb
1395 eredményünk, hogy az O-GlcNAc szintjének csökkenését el tudtuk érni a hypoglikémiás
1396 környezethez való fokozatos hozzászoktatással, azaz hosszabb ideig alacsony
1397 glükózkoncentrációjú környezetben tartani a sejteket anélkül, hogy ez egy reaktív
1398 stresszreakciót váltott volna ki. Ugyan a metabolikus folyamatokat nem vizsgálták, de O-
1399 GlcNAc terén hasonló eredményre jutott G. Hart és csapata egy nemrég megjelent
1400 közleményük alapján. [110] Feltételezésünk szerint az AD-ben történő metabolikus változások
1401 leginkább egy ilyen, lassan progrediáló folyamat eredményei, melynek során a jól ismert
1402 elváltozások megjelennek az agy szövetében.

1403 A kutatás korlátai közé tartozik, hogy a neuroblasztóma sejtvonal valószínűleg nagyobb
1404 adaptációs potenciállal rendelkezik, mint a primer neuronális sejtek, ugyanis ez utóbbiak főleg
1405 aerob módon az oxidatív foszforiláció által jutnak ATP-hez. Amennyiben a glükóz elérhetősége
1406 csökken, a neuronok az asztociták segítségére szorulnak, amik glikogén tartalmukat képesek

1407 lebontani, azaz glikogén foszforilázzal glükóz-1-foszfáttá, majd foszoglukomutáz által glükóz-
1408 6-foszfáttá izomerizálni, ami a glikolízis során piruváttá oxidálódik és laktát dehidrogenáz
1409 (LDH) laktáttá alakítja. Az asztrociták nem expresszálnak glükóz-6-foszfátot, ezért szabad
1410 glükózt nem tudnak az idegsejteknek szállítani, viszont a neuronok a laktátot már fel tudják
1411 használni, hogy energiaszükségletüket biztosítsa. [111; 112] Ugyan mindkét sejtípus tartalmaz
1412 laktát dehidrogenázt, de míg az asztrociták LDH5 izoformát, addig a neuronok LDH1-t, ami
1413 elsősorban a laktát piruváttá történő átalakítását végzi, ezzel is utalva az oxidatív metabolizmus
1414 túlsúlyára. [113] Ezen enzimek izoformáinak expresszási aránya az agyi területtől függően
1415 szintén változik. [114] A laktátot az asztrocitákból az MCT-1 exportálja és az idegsejtek MCT2-
1416 n keresztül veszik fel. [115] A laktát transzportja erősen függ az EC pH-tól [19], ami
1417 magyarázhatja, miért emelkedik meg az agy laktát felvétele annak vérben történő
1418 felszaporodása során. E. Lezi és munkatársa, Swerdlow SH SY5Y sejteket kezeltek magas
1419 koncentrációjú laktáttal, és azt találták, hogy a sejtlegzés megnőtt, a bioenergetikai folyamatok
1420 az aerob irányba tolódtak, tehát a glikolízis mértéke csökkent az inzulinszignállal és az e
1421 folyamatokban szerepet játszó számos fehérje, illetve poszttranszlációs módosulások
1422 változásával együtt. [116] Az általunk elvégzett kutatás során hasonló változást tapasztaltunk a
1423 metabolizmusban, azonban a laktát koncentrációja meg sem közelítette a fenti kezelésben
1424 alkalmazottat.

1425 A jövőben tervezzük a leírt hypoglikémiás környezetben való kísérletsorozatot primer
1426 neuronokon, illetve asztrocita sejtvonalon is elvégezni. Az asztrociták jelentőségét mutatja,
1427 hogy nem csak a neuronok támogatásában, a megfelelő szinaptikus kapcsolatok létrejöttében
1428 és fenntartásában játszanak szerepet, hanem részt vesznek az agy immunológiai folyamataiban
1429 is. Kimutatták, hogy AD-ben az 1-es típusú, proinflammatorikus asztrociták túlsúlyba kerülnek
1430 a 2-es típusú antiinflammatorikus, neuroprotektív faktorokat termelő asztrocitákkal szemben.
1431 Továbbá ez a sejtípus az ApolipoproteinE4-en keresztül részt vesz az A β eliminációjában is.
1432 [117] Emellett további kutatás tárgyát képezheti alternatív tápanyagok, mint a β -hidroxi-butirát
1433 alkalmazása glükóz helyett. Az O-glikozilációval párhuzamosan célszerű lenne a tau fehérje,
1434 és annak különböző szerin oldalláncaiban való foszforilációjának változásait nyomon követni
1435 különböző vizsgálati módszerekkel a fenti körülmények mellett, de ugyanez igaz az amiloid
1436 prekursor protein mennyiségére is. Továbbá jövőbeni kutatások tárgyát képezheti miRNS profil
1437 feltérképezése, akár endoszomális miRNS-ek detektálása.

1438 Bár mára elsősorban a különböző biomarkerek arányainak változásait figyelembe véve egyetlen
1439 vérvételből is következtetni lehet az AD-re való hajlamra [118], továbbá a mesterséges
1440 intelligencia felhasználásával egyre több lehetőségre derül fény az AD korai diagnosztikája

1441 kapcsán [119], ezáltal növelve az esélyét az adekvát terápiás lehetőségeknek is, nem hagyhatjuk
1442 figyelmen kívül az egész háttérben zajló biokémiai folyamatokat. Ezek minél pontosabb
1443 feltérképezése és megértése szintén hozzájárulhat akár a kezelés, de sokkal inkább a megelőzés
1444 sikeréhez.

1445

1446 **V. 2. A PLAZMA GLÜKÓZ ÉS A HbA1C KAPCSOLATÁNAK** 1447 **MODELLEZÉSE**

1448

1449 A dolgozat második részét képező tanulmányban megerősítettük, hogy a HbA1c-szintek az
1450 MM kinetikával nagyobb pontossággal jósolhatók meg, mint a lineáris modellekkel. Korábban
1451 Xu és munkatársai egy komplex matematikai modellt teszteltek, amely az MM kinetikát
1452 tartalmazta egy kis létszámú, 120 fős mintán [73]. Sikeresen bizonyították, hogy a CGM-
1453 adatokon alapuló kinetikai modelljük pontosan megbecsülte a HbA1c-értéket. A kutatásban
1454 retrospektív módon elemeztünk nagyszámú plazmavércukor- és HbA1c-felvételt az elmúlt 15
1455 évből, amelyeket több mint 46 ezer egyéni betegtől gyűjtöttünk össze és ~10%-uk több mint 10
1456 egymást követő méréssel rendelkezett. A Michaelis-konstans, a K_m a modellből az egyéni
1457 különbségek értékelésére szolgáló hasznos biomarkerként emelkedett ki. A K_m -et egy új
1458 metabolikus paraméterként lehetne bevezetni, amely felülmúlhatja a korábbi markerek, például
1459 a hemoglobin glikációs index, a glikációs rés vagy a glükózkezelési mutató prediktív értékeit
1460 [77; 82; 85]. A K_m időbeli viszonylagos stabilitása azt is biztosítja, hogy a plazma
1461 glükózsintjének HbA1c-re történő átváltása hosszabb időszakokon keresztül is megbízható
1462 lehet.

1463 A HbA1c képződése számos, egymással összefüggő biokémiai folyamat eredménye. Röviden,
1464 az EC glükóz az inzulinfüggetlen glükóztranszporterén, a GLUT1-en keresztül jut be a
1465 vörösvértestekbe [120], majd nem enzimatikusan, a kétlépéses Maillard-reakció révén reagál a
1466 hemoglobin béta-láncának N-terminális valinjával és valószínűleg más maradékokkal is [121].
1467 A vörösvérsejtek teljes élettartama alatt képződik és azok pusztulásával eliminálódik a
1468 keringésből, bár egy része a fruktózamin-3-kináz deglikációja révén is ürülhet. [82; 122] A
1469 plazma glükózkoncentrációja valószínűleg a leggyakrabban mért vizsgálat a világon. A glükóz
1470 membrán transzportja köztudottan az MM kinetikát követi [88], és ez a fő folyamat felelős a
1471 glükóz - HbA1c görbe alakjáért [73]. A GLUT1 Michaelis-állandóját korábban már
1472 meghatározták, de azt találták, hogy a kísérleti körülményektől függően széles tartományon

1473 belül van (1-38 mM) [73; 88; 123], ezért még nem lehet közvetlenül alkalmazni diagnosztikai
1474 számításokhoz.

1475 Ami a HGI-t illeti, a lineáris regressziós modellek, amelyek kielégítő pontossággal működnek,
1476 ha a plazma glükózsintje normális vagy ahhoz közeli [80], magasabb glükózsintek esetén
1477 nem illeszkednek kellőképpen, így a cukorbetegség magasabb HGI-értéke a modellek elégtelen
1478 dinamikai tartományának tulajdonítható. Ezenkívül vitatott, hogy a HGI független változó-e,
1479 és nem áll-e pozitív korrelációban a HbA1c-vel [84]. Másrészt a lineáris egyenlet
1480 meredekségének és metszéspontjának módosítása mindig magában hordozza a HbA1c-szintek
1481 alul- vagy túlbecslésének hibáját a különböző glükóztartományokban. Bergenstal és
1482 munkatársai egy új kifejezést vezettek be „Glükózkezelési mutató (Glucose Management
1483 Indicator)” néven [85], hogy kihangsúlyozzák, hogy a becsült HbA1c sok esetben eltér a mért
1484 HbA1c-től, de ez még mindig lineáris közelítésen alapult, ezért ugyanazokkal a
1485 hiányosságokkal rendelkezett. Felismerve a HbA1c ingadozását és a pontatlan AG-becslést,
1486 Malka és munkatársai korrekciós tényezőként az átlagos vörösvérsejt-kort vezették be (MRBC,
1487 Mean Red Blood Cell Age), mely már betegspecifikusnak számított. [86]

1488 Jelen tanulmányunkban megállapítottuk, hogy a HbA1c kiszámításához használt MM egyenlet
1489 jobban reprezentálja a háttérben húzódó mechanizmusokat, jobban leírja a glükóz - HbA1c
1490 kapcsolatot, és így jobb prediktív képességgel rendelkezik. Emellett, az MM kinetika akkor is
1491 hatékonyan használható, ha kevesebb adat áll rendelkezésre - azaz csak éhgyomri glükózmérés
1492 rögzíthető (természetesen több adat, például gyakori POC glükózvizsgálat vagy CGM tovább
1493 emelné az MM előrejelzés pontosságát). Továbbá, kihasználva azt, hogy a Michaelis-állandó
1494 szerves része az egyenletnek, a K_m olyan új paraméterként használható, amely megőrizheti a
1495 HGI informatív értékét, miközben jobban teljesít a HbA1c-szintek prognosztikájában. Azt
1496 találtuk, hogy a K_m -értékek viszonylag stabilak - hasonlóan a HGI-hez [98; 124], azonban a K_m
1497 időbeli átlagolása és felülbírálata könnyen, automatikusan elvégezhető és tompítja néhány
1498 kiugró plazmacukor-adatpont torzító hatását.

1499 Vizsgálatunk korlátai közé tartozik, hogy a vizsgálati populációnk túlnyomórészt magyar,
1500 kaukázusi emberekből áll, ezért a V_{max} szükség esetén történő kiigazítása érdekében meg kell
1501 ismételni más rasszok esetében is. A GLUT1-aktivitás, valamint az életkor, a nem, a faj, a
1502 kiindulási és a posztprandiális glükóz arányának hatását is figyelembe kell venni. Bár
1503 adatainkat elemeztük e paraméterek némelyikére vonatkozóan, átfogóbb felmérésekre van
1504 szükség. Azt is meg kell jegyezni, hogy a ritka hemoglobinvariánsok [74] zavarhatják az
1505 analízist. A HPLC-analizátorok frakciója elkülöníti a labilis glikált hemoglobint a stabil
1506 HbA1c-től, de a glikémiás státusz hirtelen változása növelheti a labilis frakció mennyiségét,

1507 amely átfedésben lehet a stabil frakcióval is [125; 126]. Az adatgyűjtés standardizálására
1508 szintén szükség van; specifikusabb prospektív vizsgálatokra is szükség van a K_m
1509 referenciatartományainak meghatározásához az adott populációra vonatkozóan. A glikáció és
1510 az RBC eliminációs sebességének változékonysága továbbra is probléma. Előzetes becslésünk
1511 szerint a glikációs sebesség ($\sim\pm 25\%$ -ig) és az RBC élettartam ($\sim\pm 50\%$ -ig) kis eltérései
1512 tolerálható hatásúak a számítás szempontjából, de a nagyobb eltérések megbízhatatlanná teszik
1513 a K_m -et. Ezeknek a variációknak az előfordulási arányát még nem ismerjük, de a
1514 hemoglobinszintézist és az RBC morfológiát jelentősen befolyásoló körülményeket figyelembe
1515 kell venni, mielőtt a modellünket a HbA1c előrejelzésére használnánk [127]. Egy másik
1516 korlátozás, hogy a kezdeti K_m -értékelés a korábbi adatok hiánya miatt pontatlanabb lesz.
1517 Összefoglalva, úgy gondoljuk, hogy a jelenlegi lineáris modelleket és számításokat fel lehetne
1518 váltani az MM-egyenlettel. A már létező webalapú számológépek és mobiltelefonos
1519 alkalmazások könnyen frissíthetők lennének. Így a betegek és az orvosok a kötelező
1520 laboratóriumi HbA1c-ellenőrzések között bármikor nyomon követhetnék terápiájuk/diétájuk
1521 alakulását. A K_m mennyiségi paraméterként való bevezetése lehetővé tenné továbbá a "kevésbé
1522 reagálók" megkülönböztetését, akik esetében nehéz a HbA1c-értéket csökkenteni anélkül, hogy
1523 a hypoglikémia kockázatát vállalnák. E betegek esetében alternatív terápiás megközelítések
1524 megfontolása lenne javasolt. Ezen túlmenően a K_m értékelése segíthet az újabb, fejlett
1525 antidiabetikus gyógyszerek, például az SGLT2-gátlók és a GLP-1-receptor-agonisták
1526 biztonságosságának értékelésében is [128; 129]. A standardizált K_m , mint biomarker segíthet a
1527 társbetegségek metabolikus hatásának értékelésében és jobb megértésében is. A vashiány
1528 például ellentmondásos hatással van a HbA1c-re, mivel úgy találták, hogy egyszerre emeli és
1529 csökkenti is a HbA1c-szintet [130; 131]. A K_m számszerűsítése a vashiányos betegek esetében
1530 segíthet az RBC morfológiai változásainak a HbA1c-re gyakorolt közvetlen hatásának
1531 felismerésében.

1532

VI. ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA

1533
1534
1535
1536
1537
1538

1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552

1553
1554
1555

1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563

A dolgozat első felében ismertett kísérletsorozatban neuroblasztóma (SH-SY5Y) sejtvonallal dolgoztunk és krónikus hypoglikémia hatását kívántuk modellezni. Összesen hat különböző, csökkenő 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 tudunk kiváltani. Úgy gondoljuk, a mérsékelt glükóz megvonás az Alzheimer betegség metabolikus elváltozásainak jobb modelljéül szolgálhat.

A disszertáció második felét képező tanulmányban 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.

1564

REFERENCIÁK

1565

- 1566 [1] S. Craft, and G.S. Watson, Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific
1567 mechanisms. *Lancet Neurol* 3 (2004) 169-78.
- 1568 [2] S.M. de la Monte, and J.R. Wands, Review of insulin and insulin-like growth factor expression,
1569 signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J*
1570 *Alzheimers Dis* 7 (2005) 45-61.
- 1571 [3] B.J. Neth, and S. Craft, Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages. *Front*
1572 *Aging Neurosci* 9 (2017) 345.
- 1573 [4] L. Rice, and S. Bisdas, The diagnostic value of FDG and amyloid PET in Alzheimer's disease-A
1574 systematic review. *Eur J Radiol* 94 (2017) 16-24.
- 1575 [5] J.E. Gerich, Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab* 2 (2000) 345-50.
- 1576 [6] O.E. Owen, A.P. Morgan, H.G. Kemp, J.M. Sullivan, M.G. Herrera, and G.F. Cahill, Jr., Brain
1577 metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46 (1967) 1589-95.
- 1578 [7] J.E. Gerich, Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 7 (1993) 551-86.
- 1579 [8] G. Boden, Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46
1580 (1997) 3-10.
- 1581 [9] A.M. Navale, and A.N. Paranjape, Glucose transporters: physiological and pathological roles.
1582 *Biophys Rev* 8 (2016) 5-9.
- 1583 [10] G. Wilcox, Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26 (2005) 19-39.
- 1584 [11] C. Meyer, J.M. Dostou, S.L. Welle, and J.E. Gerich, Role of human liver, kidney, and skeletal
1585 muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 (2002) E419-
1586 27.
- 1587 [12] A. Consoli, F. Kennedy, J. Miles, and J. Gerich, Determination of Krebs cycle metabolic carbon
1588 exchange in vivo and its use to estimate the individual contributions of gluconeogenesis and
1589 glycogenolysis to overall glucose output in man. *J Clin Invest* 80 (1987) 1303-10.
- 1590 [13] B.R. Landau, J. Wahren, V. Chandramouli, W.C. Schumann, K. Ekberg, and S.C. Kalhan,
1591 Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest* 98
1592 (1996) 378-85.
- 1593 [14] L. Pellerin, Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for
1594 sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab* 36 Suppl 3 (2010)
1595 S59-63.
- 1596 [15] S.L.C.a.e.m.o.t.b.l. Siegel, A.B. G, Albers RW, Molinoff P, eds. *Basic Neurochemistry* 4th, and -.
1597 edition. New York: Raven Press 1989, Circulation and energy metabolism of the brain. in:
1598 Siegel, and A.B. G, Albers RW, Molinoff P., (Eds.), *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New
1599 York, 1989.
- 1600 [16] I. Allaman, M. Belanger, and P.J. Magistretti, Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front*
1601 *Neurosci* 9 (2015) 23.
- 1602 [17] M. Belanger, I. Allaman, and P.J. Magistretti, Brain energy metabolism: focus on astrocyte-
1603 neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14 (2011) 724-38.
- 1604 [18] S. Mason, Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond. *Front*
1605 *Neurosci* 11 (2017) 43.
- 1606 [19] J.W. Deitmer, S.M. Theparambil, I. Ruminot, and H.M. Becker, Our hungry brain: Which role do
1607 glial cells play for the energy supply? *e-Neuroforum* 23 (2017) 1-8.
- 1608 [20] A.P. Halestrap, and D. Meredith, The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters
1609 (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447 (2004) 619-28.
- 1610 [21] F.X. Wang, C.L. Xu, C. Su, J. Li, and J.Y. Lin, beta-Hydroxybutyrate Attenuates Painful Diabetic
1611 Neuropathy via Restoration of the Aquaporin-4 Polarity in the Spinal Glymphatic System.
1612 *Front Neurosci* 16 (2022) 926128.

- 1613 [22] M.A. Beydoun, A. Lhotsky, Y. Wang, G. Dal Forno, Y. An, E.J. Metter, L. Ferrucci, R. O'Brien, and
1614 A.B. Zonderman, Association of adiposity status and changes in early to mid-adulthood with
1615 incidence of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* 168 (2008) 1179-89.
- 1616 [23] E. Ronnema, B. Zethelius, J. Sundelof, J. Sundstrom, M. Degerman-Gunnarsson, C. Berne, L.
1617 Lannfelt, and L. Kilander, Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease.
1618 *Neurology* 71 (2008) 1065-71.
- 1619 [24] Z. Kroner, The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern*
1620 *Med Rev* 14 (2009) 373-9.
- 1621 [25] K.J. Gibas, The starving brain: Overfed meets undernourished in the pathology of mild cognitive
1622 impairment (MCI) and Alzheimer's disease (AD). *Neurochem Int* 110 (2017) 57-68.
- 1623 [26] W. Wang, F. Zhao, X. Ma, G. Perry, and X. Zhu, Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of
1624 Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener* 15 (2020) 30.
- 1625 [27] S.V. Hrynevich, T.G. Pekun, T.V. Waseem, and S.V. Fedorovich, Influence of Glucose Deprivation
1626 on Membrane Potentials of Plasma Membranes, Mitochondria and Synaptic Vesicles in Rat
1627 Brain Synaptosomes. *Neurochem Res* 40 (2015) 1188-96.
- 1628 [28] D.A. Butterfield, and B. Halliwell, Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and
1629 Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 20 (2019) 148-160.
- 1630 [29] L.A. Demetrius, and D.K. Simon, An inverse-Warburg effect and the origin of Alzheimer's disease.
1631 *Biogerontology* 13 (2012) 583-94.
- 1632 [30] T. Nagy, V. Fisi, D. Frank, E. Katai, Z. Nagy, and A. Miseta, Hyperglycemia-Induced Aberrant Cell
1633 Proliferation; A Metabolic Challenge Mediated by Protein O-GlcNAc Modification. *Cells* 8
1634 (2019).
- 1635 [31] P.R. Rich, The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 31 (2003)
1636 1095-105.
- 1637 [32] X.B. Li, J.D. Gu, and Q.H. Zhou, Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for
1638 lung cancer therapy. *Thorac Cancer* 6 (2015) 17-24.
- 1639 [33] E.A. Melkonian, and M.P. Schury, Biochemistry, Anaerobic Glycolysis, StatPearls, Treasure Island
1640 (FL), 2022.
- 1641 [34] L. Wells, Y. Gao, J.A. Mahoney, K. Vosseller, C. Chen, A. Rosen, and G.W. Hart, Dynamic O-
1642 glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the
1643 nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem* 277 (2002)
1644 1755-61.
- 1645 [35] T.S. Pinho, D.M. Verde, S.C. Correia, S.M. Cardoso, and P.I. Moreira, O-GlcNAcylation and
1646 neuronal energy status: Implications for Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 46 (2018) 32-41.
- 1647 [36] S. Hardiville, and G.W. Hart, Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by
1648 O-GlcNAcylation. *Cell Metab* 20 (2014) 208-13.
- 1649 [37] D.W. Cleveland, S.Y. Hwo, and M.W. Kirschner, Purification of tau, a microtubule-associated
1650 protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116 (1977)
1651 207-25.
- 1652 [38] M.L. Billingsley, and R.L. Kincaid, Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau
1653 protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration.
1654 *Biochem J* 323 (Pt 3) (1997) 577-91.
- 1655 [39] A. Mudher, and S. Lovestone, Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?
1656 *Trends Neurosci* 25 (2002) 22-6.
- 1657 [40] L.A. Robertson, K.L. Moya, and K.C. Breen, The potential role of tau protein O-glycosylation in
1658 Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 6 (2004) 489-95.
- 1659 [41] P.S. Kakade, S. Budnar, R.D. Kalraiya, and M.M. Vaidya, Functional Implications of O-
1660 GlcNAcylation-dependent Phosphorylation at a Proximal Site on Keratin 18. *J Biol Chem* 291
1661 (2016) 12003-13.
- 1662 [42] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G.W. Hart, and C.X. Gong, O-GlcNAcylation regulates
1663 phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S*
1664 *A* 101 (2004) 10804-9.

- 1665 [43] D.L. Graham, A.J. Gray, J.A. Joyce, D. Yu, J. O'Moore, G.A. Carlson, M.S. Shearman, T.L. Dellovade,
 1666 and H. Hering, Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its
 1667 normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology* 79 (2014) 307-
 1668 13.
- 1669 [44] V.J.R. de Paula, F.M. Guimaraes, B.S. Diniz, and O.V. Forlenza, Neurobiological pathways to
 1670 Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dement Neuropsychol* 3 (2009)
 1671 188-194.
- 1672 [45] Y. Hu, X.C. Li, Z.H. Wang, Y. Luo, X. Zhang, X.P. Liu, Q. Feng, Q. Wang, Z. Yue, Z. Chen, K. Ye, J.Z.
 1673 Wang, and G.P. Liu, Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial
 1674 membrane potential and reducing mitochondrial Parkin. *Oncotarget* 7 (2016) 17356-68.
- 1675 [46] J.A. Duce, A. Tsatsanis, M.A. Cater, S.A. James, E. Robb, K. Wikke, S.L. Leong, K. Perez, T.
 1676 Johanssen, M.A. Greenough, H.H. Cho, D. Galatis, R.D. Moir, C.L. Masters, C. McLean, R.E.
 1677 Tanzi, R. Cappai, K.J. Barnham, G.D. Ciccotosto, J.T. Rogers, and A.I. Bush, Iron-export
 1678 ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's
 1679 disease. *Cell* 142 (2010) 857-67.
- 1680 [47] R.D. Moir, R. Lathe, and R.E. Tanzi, The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's
 1681 disease. *Alzheimers Dement* 14 (2018) 1602-1614.
- 1682 [48] C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H.A. Kretzschmar, and J. Herms, Synapse formation
 1683 and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26 (2006) 7212-21.
- 1684 [49] P.R. Turner, K. O'Connor, W.P. Tate, and W.C. Abraham, Roles of amyloid precursor protein and
 1685 its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70 (2003) 1-
 1686 32.
- 1687 [50] K.T. Jacobsen, and K. Iverfeldt, O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the
 1688 amyloid-beta precursor protein (APP). *Biochem Biophys Res Commun* 404 (2011) 882-6.
- 1689 [51] X. Li, F. Lu, J.Z. Wang, and C.X. Gong, Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and
 1690 phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *Eur J Neurosci* 23 (2006) 2078-86.
- 1691 [52] W.D. Cheung, and G.W. Hart, AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-
 1692 GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem* 283 (2008)
 1693 13009-20.
- 1694 [53] N.E. Zachara, and G.W. Hart, O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic
 1695 glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim*
 1696 *Biophys Acta* 1673 (2004) 13-28.
- 1697 [54] N.E. Zachara, N. O'Donnell, W.D. Cheung, J.J. Mercer, J.D. Marth, and G.W. Hart, Dynamic O-
 1698 GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response
 1699 of mammalian cells. *J Biol Chem* 279 (2004) 30133-42.
- 1700 [55] S.P. Jones, N.E. Zachara, G.A. Ngoh, B.G. Hill, Y. Teshima, A. Bhatnagar, G.W. Hart, and E.
 1701 Marban, Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation*
 1702 117 (2008) 1172-82.
- 1703 [56] G.A. Ngoh, H.T. Facundo, T. Hamid, W. Dillmann, N.E. Zachara, and S.P. Jones, Unique
 1704 hexosaminidase reduces metabolic survival signal and sensitizes cardiac myocytes to
 1705 hypoxia/reoxygenation injury. *Circ Res* 104 (2009) 41-9.
- 1706 [57] G.A. Ngoh, L.J. Watson, H.T. Facundo, and S.P. Jones, Augmented O-GlcNAc signaling attenuates
 1707 oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids* 40 (2011) 895-911.
- 1708 [58] L. Zou, X. Zhu-Mauldin, R.B. Marchase, A.J. Paterson, J. Liu, Q. Yang, and J.C. Chatham, Glucose
 1709 deprivation-induced increase in protein O-GlcNAcylation in cardiomyocytes is calcium-
 1710 dependent. *J Biol Chem* 287 (2012) 34419-31.
- 1711 [59] R.P. Taylor, G.J. Parker, M.W. Hazel, Y. Soesanto, W. Fuller, M.J. Yazzie, and D.A. McClain,
 1712 Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of
 1713 O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 283 (2008) 6050-7.
- 1714 [60] W.B. Dias, and G.W. Hart, O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol*
 1715 *Biosyst* 3 (2007) 766-72.

- 1716 [61] V. Balendra, J.C. Esposto, and N. Reich, Bitter brain: Hypoglycemia and the pathology of
1717 neurodegeneration and dementia. *Alzheimer's & Dementia* 17 (2021) e052401.
- 1718 [62] J.G. Kang, S.Y. Park, S. Ji, I. Jang, S. Park, H.S. Kim, S.M. Kim, J.I. Yook, Y.I. Park, J. Roth, and J.W.
1719 Cho, O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose
1720 deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem* 284 (2009) 34777-84.
- 1721 [63] R.P. Taylor, T.S. Geisler, J.H. Chambers, and D.A. McClain, Up-regulation of O-GlcNAc transferase
1722 with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux. *J*
1723 *Biol Chem* 284 (2009) 3425-32.
- 1724 [64] K.M.M. Fahie, K.N. Papanicolaou, and N.E. Zachara, Integration of O-GlcNAc into Stress Response
1725 Pathways. *Cells* 11 (2022).
- 1726 [65] B. Laczy, B.G. Hill, K. Wang, A.J. Paterson, C.R. White, D. Xing, Y.F. Chen, V. Darley-Usmar, S.
1727 Oparil, and J.C. Chatham, Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the
1728 cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (2009) H13-28.
- 1729 [66] Y. Fardini, V. Dehennaut, T. Lefebvre, and T. Issad, O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark?
1730 *Front Endocrinol (Lausanne)* 4 (2013) 99.
- 1731 [67] C. Fehl, and J.A. Hanover, Tools, tactics and objectives to interrogate cellular roles of O-GlcNAc in
1732 disease. *Nat Chem Biol* 18 (2022) 8-17.
- 1733 [68] G. Roglic, and World Health Organization, Global report on diabetes, World Health Organization,
1734 Geneva, Switzerland, 2016.
- 1735 [69] M. Pohanka, Glycated Hemoglobin and Methods for Its Point of Care Testing. *Biosensors (Basel)*
1736 11 (2021).
- 1737 [70] A. Geistanger, S. Arends, C. Berding, T. Hoshino, J.O. Jeppsson, R. Little, C. Siebelder, C.
1738 Weykamp, and I.W.G.o.S.o.H. A1c, Statistical methods for monitoring the relationship
1739 between the IFCC reference measurement procedure for hemoglobin A1c and the
1740 designated comparison methods in the United States, Japan, and Sweden. *Clin Chem* 54
1741 (2008) 1379-85.
- 1742 [71] C. Consensus, Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C
1743 measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of
1744 Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the
1745 International Diabetes Federation. *Diabetes Care* 30 (2007) 2399-400.
- 1746 [72] N.A. ElSayed, G. Aleppo, V.R. Aroda, R.R. Bannuru, F.M. Brown, D. Bruemmer, B.S. Collins, M.E.
1747 Hilliard, D. Isaacs, E.L. Johnson, S. Kahan, K. Khunti, J. Leon, S.K. Lyons, M.L. Perry, P.
1748 Prahalad, R.E. Pratley, J.J. Seley, R.C. Stanton, R.A. Gabbay, and o.b.o.t.A.D. Association, 6.
1749 Glycemic Targets: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care* 46 (2022) S97-S110.
- 1750 [73] Y. Xu, T.C. Dunn, and R.A. Ajjan, A Kinetic Model for Glucose Levels and Hemoglobin A1c
1751 Provides a Novel Tool for Individualized Diabetes Management. *J Diabetes Sci Technol* 15
1752 (2021) 294-302.
- 1753 [74] C.L. Rohlfing, H.M. Wiedmeyer, R.R. Little, J.D. England, A. Tennill, and D.E. Goldstein, Defining
1754 the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and
1755 HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 25 (2002) 275-8.
- 1756 [75] D.M. Nathan, J. Kuenen, R. Borg, H. Zheng, D. Schoenfeld, R.J. Heine, and A.c.-D.A.G.S. Group,
1757 Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 31 (2008)
1758 1473-8.
- 1759 [76] B.P. Kovatchev, F. Flacke, J. Sieber, and M.D. Breton, Accuracy and robustness of dynamical
1760 tracking of average glycemia (A1c) to provide real-time estimation of hemoglobin A1c using
1761 routine self-monitored blood glucose data. *Diabetes Technol Ther* 16 (2014) 303-9.
- 1762 [77] J.M. Hempe, R. Gomez, R.J. McCarter, Jr., and S.A. Chalew, High and low hemoglobin glycation
1763 phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycemic control. *J Diabetes*
1764 *Complications* 16 (2002) 313-20.
- 1765 [78] R.J. McCarter, J.M. Hempe, R. Gomez, and S.A. Chalew, Biological variation in HbA1c predicts risk
1766 of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27 (2004) 1259-64.

- 1767 [79] Y. Ogawa, T. Nakahara, M. Ono, T. Kawaguchi, H. Isoda, A. Hiramatsu, S. Uchikawa, H. Fujino, E.
1768 Murakami, T. Kawaoka, M. Yamauchi, M. Tsuge, K. Munekage, T. Ochi, C.N. Hayes, M.
1769 Imamura, H. Aikata, H. Takahashi, T. Torimura, and K. Chayama, Underestimation of impaired
1770 glucose tolerance and usefulness of a continuous glucose monitoring system in chronic liver
1771 disease. *J Gastroenterol Hepatol* 37 (2022) 592-599.
- 1772 [80] J.M. Hempe, S. Yang, S. Liu, and D.S. Hsia, Standardizing the haemoglobin glycation index.
1773 *Endocrinol Diabetes Metab* 4 (2021) e00299.
- 1774 [81] Y. Pan, J. Jing, Y. Wang, L. Liu, Y. Wang, and Y. He, Association of hemoglobin glycation index
1775 with outcomes of acute ischemic stroke in type 2 diabetic patients. *Neurol Res* 40 (2018) 573-
1776 580.
- 1777 [82] A.U. Nayak, B.M. Singh, and S.J. Dunmore, Potential Clinical Error Arising From Use of HbA1c in
1778 Diabetes: Effects of the Glycation Gap. *Endocr Rev* 40 (2019) 988-999.
- 1779 [83] H.Y. Kim, S.Y. Lee, S. Suh, J.H. Kim, M.K. Lee, and H.D. Park, The relationship between estimated
1780 average glucose and fasting plasma glucose. *Clin Chem Lab Med* 51 (2013) 2195-200.
- 1781 [84] J.M. Lachin, S. Genuth, D.M. Nathan, and B.N. Rutledge, The hemoglobin glycation index is not
1782 an independent predictor of the risk of microvascular complications in the Diabetes Control
1783 and Complications Trial. *Diabetes* 56 (2007) 1913-21.
- 1784 [85] R.M. Bergenstal, R.W. Beck, K.L. Close, G. Grunberger, D.B. Sacks, A. Kowalski, A.S. Brown, L.
1785 Heinemann, G. Aleppo, D.B. Ryan, T.D. Riddlesworth, and W.T. Cefalu, Glucose Management
1786 Indicator (GMI): A New Term for Estimating A1C From Continuous Glucose Monitoring.
1787 *Diabetes Care* 41 (2018) 2275-2280.
- 1788 [86] R. Malka, D.M. Nathan, and J.M. Higgins, Mechanistic modeling of hemoglobin glycation and red
1789 blood cell kinetics enables personalized diabetes monitoring. *Sci Transl Med* 8 (2016)
1790 359ra130.
- 1791 [87] L. Michaelis, M.L. Menten, K.A. Johnson, and R.S. Goody, The original Michaelis constant:
1792 translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 50 (2011) 8264-9.
- 1793 [88] A. Carruthers, and D.L. Melchior, Asymmetric or symmetric? Cytosolic modulation of human
1794 erythrocyte hexose transfer. *Biochim Biophys Acta* 728 (1983) 254-66.
- 1795 [89] H. Lineweaver, and D. Burk, The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the*
1796 *American Chemical Society* 56 (1934) 658-666.
- 1797 [90] Z. Jiang, G. Liu, F. Meng, W. Wang, P. Hao, Y. Xiang, Y. Wang, R. Han, F. Li, L. Wang, and X. Li,
1798 Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J*
1799 *Ophthalmol* 101 (2017) 1583-1590.
- 1800 [91] Q. Guo, A. Yang, R. Zhao, H. Zhao, Y. Mu, J. Zhang, Q. Han, and Y. Su, Nimodipine ameliorates
1801 liver fibrosis via reshaping liver immune microenvironment in TAA-induced in mice. *Int*
1802 *Immunopharmacol* 138 (2024) 112586.
- 1803 [92] Z. Vizvari, N. Gyorfi, G. Maczko, R. Varga, R. Jakabfi-Csepregi, Z. Sari, A. Furedi, E. Bajtai, F. Vajda,
1804 V. Tadic, P. Odry, Z. Karadi, and A. Toth, Reproducibility analysis of bioimpedance-based self-
1805 developed live cell assays. *Scientific Reports* 14 (2024) 16380.
- 1806 [93] R. Csepregi, V. Temesfoi, N. Sali, M. Poor, W.N. P, A.K. P, and T. Koszegi, A One-Step Extraction
1807 and Luminescence Assay for Quantifying Glucose and ATP Levels in Cultured HepG2 Cells. *Int*
1808 *J Mol Sci* 19 (2018).
- 1809 [94] M.C. McKenna, G.A. Dienel, U. Sonnewald, H.S. Waagepetersen, and A. Schousboe, Energy
1810 Metabolism of the Brain. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and*
1811 *Medical Neurobiology*, 8th edition (2012) 200-231.
- 1812 [95] R. Bizzotto, A. Natali, A. Gastaldelli, E. Muscelli, M. Krssak, A. Brehm, M. Roden, E. Ferrannini,
1813 and A. Mari, Glucose uptake saturation explains glucose kinetics profiles measured by
1814 different tests. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311 (2016) E346-57.
- 1815 [96] J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo, and A. Blazquez-Castro, Tetrazolium salts and
1816 formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling
1817 perspectives. *Acta Histochem* 120 (2018) 159-167.

- 1818 [97] B.D. A. Kunst, J. Ziegenhorn, Carbohydrates, U.V. method with hexokinase and glucose-6-
1819 phosphate dehydrogenase. in: H.U. Bergmeyer, (Ed.), Methods in Enzymatic Analysis, Basel,
1820 1984, pp. 163–172.
- 1821 [98] A.A. Soros, S.A. Chalew, R.J. McCarter, R. Shepard, and J.M. Hempe, Hemoglobin glycation index:
1822 a robust measure of hemoglobin A1c bias in pediatric type 1 diabetes patients. *Pediatr*
1823 *Diabetes* 11 (2010) 455-61.
- 1824 [99] R. Gruetter, E.J. Novotny, S.D. Boulware, D.L. Rothman, and R.G. Shulman, ¹H NMR studies of
1825 glucose transport in the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (1996) 427-38.
- 1826 [100] H. Lund-Andersen, Transport of glucose from blood to brain. *Physiol Rev* 59 (1979) 305-52.
- 1827 [101] J. Kovalevich, and D. Langford, Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in
1828 neurobiology. *Methods Mol Biol* 1078 (2013) 9-21.
- 1829 [102] S. Takeda, N. Sato, K. Uchio-Yamada, K. Sawada, T. Kunieda, D. Takeuchi, H. Kurinami, M.
1830 Shinohara, H. Rakugi, and R. Morishita, Diabetes-accelerated memory dysfunction via
1831 cerebrovascular inflammation and Aβ deposition in an Alzheimer mouse model with
1832 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 7036-41.
- 1833 [103] N. Masaki, B. Feng, R. Breton-Romero, E. Inagaki, R.M. Weisbrod, J.L. Fetterman, and N.M.
1834 Hamburg, O-GlcNAcylation Mediates Glucose-Induced Alterations in Endothelial Cell
1835 Phenotype in Human Diabetes Mellitus. *J Am Heart Assoc* 9 (2020) e014046.
- 1836 [104] Z. Zhang, E.P. Tan, N.J. VandenHull, K.R. Peterson, and C. Slawson, O-GlcNAcase Expression is
1837 Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5 (2014) 206.
- 1838 [105] H.T. Kang, J.W. Ju, J.W. Cho, and E.S. Hwang, Down-regulation of Sp1 activity through
1839 modulation of O-glycosylation by treatment with a low glucose mimetic, 2-deoxyglucose. *J*
1840 *Biol Chem* 278 (2003) 51223-31.
- 1841 [106] A. He, S. Hu, Q. Pi, Y. Guo, Y. Long, S. Luo, and Y. Xia, Regulation of O-GlcNAcylation on
1842 endothelial nitric oxide synthase by glucose deprivation and identification of its O-
1843 GlcNAcylation sites. *Sci Rep* 10 (2020) 19364.
- 1844 [107] K.H. Moley, and M.M. Mueckler, Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 5 (2000) 99-105.
- 1845 [108] R. Malhotra, and F.C. Brosius, 3rd, Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced
1846 apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 274 (1999) 12567-75.
- 1847 [109] O. Kan, S.A. Baldwin, and A.D. Whetton, Apoptosis is regulated by the rate of glucose transport
1848 in an interleukin 3 dependent cell line. *J Exp Med* 180 (1994) 917-23.
- 1849 [110] C.W. Huang, N.C. Rust, H.F. Wu, A. Yin, N. Zeltner, H. Yin, and G.W. Hart, Low glucose induced
1850 Alzheimer's disease-like biochemical changes in human induced pluripotent stem cell-derived
1851 neurons is due to dysregulated O-GlcNAcylation. *Alzheimers Dement* 19 (2023) 4872-4885.
- 1852 [111] R. Dringen, R. Gebhardt, and B. Hamprecht, Glycogen in astrocytes: possible function as lactate
1853 supply for neighboring cells. *Brain Res* 623 (1993) 208-14.
- 1854 [112] R. Wender, A.M. Brown, R. Fern, R.A. Swanson, K. Farrell, and B.R. Ransom, Astrocytic glycogen
1855 influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J*
1856 *Neurosci* 20 (2000) 6804-10.
- 1857 [113] P.G. Bittar, Y. Charnay, L. Pellerin, C. Bouras, and P.J. Magistretti, Selective distribution of
1858 lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood*
1859 *Flow Metab* 16 (1996) 1079-89.
- 1860 [114] J.D. Laughton, Y. Charnay, B. Belloir, L. Pellerin, P.J. Magistretti, and C. Bouras, Differential
1861 messenger RNA distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and LDH-5 isoforms in the rat
1862 brain. *Neuroscience* 96 (2000) 619-25.
- 1863 [115] K. Pierre, L. Pellerin, R. Debernardi, B.M. Riederer, and P.J. Magistretti, Cell-specific localization
1864 of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by
1865 double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100 (2000)
1866 617-27.
- 1867 [116] L. E, and R.H. Swerdlow, Lactate's effect on human neuroblastoma cell bioenergetic fluxes.
1868 *Biochem Pharmacol* 99 (2016) 88-100.

- 1869 [117] S. Stanca, M. Rossetti, and P. Bongioanni, Astrocytes as Neuroimmunocytes in Alzheimer's
1870 Disease: A Biochemical Tool in the Neuron-Glia Crosstalk along the Pathogenetic Pathways.
1871 *Int J Mol Sci* 24 (2023).
- 1872 [118] A.B. Niculescu, H. Le-Niculescu, K. Roseberry, S. Wang, J. Hart, A. Kaur, H. Robertson, T. Jones,
1873 A. Strasburger, A. Williams, S.M. Kurian, B. Lamb, A. Shekhar, D.K. Lahiri, and A.J. Saykin,
1874 Blood biomarkers for memory: toward early detection of risk for Alzheimer disease,
1875 pharmacogenomics, and repurposed drugs. *Mol Psychiatry* 25 (2020) 1651-1672.
- 1876 [119] M.E. AlMansoori, S. Jemimah, F. Abuhantash, and A. AlShehhi, Predicting early Alzheimer's with
1877 blood biomarkers and clinical features. *Sci Rep* 14 (2024) 6039.
- 1878 [120] H. Guizouarn, and B. Allegrini, Erythroid glucose transport in health and disease. *Pflugers Arch*
1879 472 (2020) 1371-1383.
- 1880 [121] J.G.P. Karen P Peterson, David Goldstein, Randie Little, Jack England, Charles M Peterson, What
1881 is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass
1882 spectrometry. *Clinical Chemistry* 44 (1998) 1951-1958.
- 1883 [122] G. Delpierre, F. Collard, J. Fortpied, and E. Van Schaftingen, Fructosamine 3-kinase is involved in
1884 an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem J* 365 (2002) 801-8.
- 1885 [123] F.V.P. H. Nishimura, G.A. Seidner, S. Vannucci, I.A. Simpson, M. J. Birnbaum, Kinetics of GLUT1
1886 and GLUT4 glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 268 (1993)
1887 8514-8520.
- 1888 [124] J.M. Hempe, S. Liu, L. Myers, R.J. McCarter, J.B. Buse, and V. Fonseca, The hemoglobin glycation
1889 index identifies subpopulations with harms or benefits from intensive treatment in the
1890 ACCORD trial. *Diabetes Care* 38 (2015) 1067-74.
- 1891 [125] Y. Oe, T. Anno, Y. Katsuhara, R. Sugahara, M. Kobayashi, M. Yakusue, M. Tamura, Y. Kimura, F.
1892 Kawasaki, K. Kaku, H. Kaneto, and A. Kitanaka, A pitfall in hemoglobin A1c measurement with
1893 high performance liquid chromatography method in the diagnosis of onset of fulminant type
1894 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 13 (2022) 1943-1944.
- 1895 [126] J.R. Delanghe, S. Lambrecht, T. Fiers, and M.M. Speeckaert, Labile glycated hemoglobin: an
1896 underestimated laboratory marker of short term glycemia. *Clin Chem Lab Med* 60 (2022)
1897 451-455.
- 1898 [127] L. Campbell, T. Pepper, and K. Shipman, HbA1c: a review of non-glycaemic variables. *J Clin*
1899 *Pathol* 72 (2019) 12-19.
- 1900 [128] T. Horii, Y. Oikawa, N. Kunisada, A. Shimada, and K. Atsuda, Real-world risk of hypoglycemia-
1901 related hospitalization in Japanese patients with type 2 diabetes using SGLT2 inhibitors: a
1902 nationwide cohort study. *BMJ Open Diabetes Res Care* 8 (2020).
- 1903 [129] T.D. Filippatos, T.V. Panagiotopoulou, and M.S. Elisaf, Adverse Effects of GLP-1 Receptor
1904 Agonists. *Rev Diabet Stud* 11 (2014) 202-30.
- 1905 [130] N. Sinha, T.K. Mishra, T. Singh, and N. Gupta, Effect of iron deficiency anemia on hemoglobin
1906 A1c levels. *Ann Lab Med* 32 (2012) 17-22.
- 1907 [131] L.V. Rao, G.W. Pratt, C. Bi, and M.H. Kroll, Large-scale retrospective analyses of the effect of
1908 iron deficiency anemia on hemoglobin A1c concentrations. *Clin Chim Acta* 529 (2022) 21-24.

1909

1910

1911 PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

1912

1913 DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

1914

1915 **Nagy Zsófia**; Poór Viktor S; Fülöp Norbert; Chauhan Deepanjali ; Miseta Attila; Nagy
1916 Tamás: *Michaelis-Menten kinetic modeling of Hemoglobin A1c status facilitates personalized*
1917 *glycemic control*. CLINICA CHIMICA ACTA (0009-8981 1873-3492): 548 Paper 117526. 8
1918 p. (2023) IF: 5.000

1919

1920 **Zsófia Nagy**; Rita Csepregi; Emese Kátai; Attila Miseta; Katalin Ördög; Róbert Halmosi;
1921 Tamás Nagy: *Metabolic shift may influence protein O-GlcNac modification in SH-SY5Y cells*
1922 *in a hypoglycemic AD model* – közlés alatt

1923

1924

1925 **Összesített impakt faktor a dolgozat alapjául szolgáló közleményekből: 5.0**

1926

1927 EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

1928

1929 **Nagy Zsófia**; Papp Ábel; Kristály Christopher; Horváth L. Levente; Béri Laura; Nagy Tamás;
1930 Vámos Zoltán: *Induktív keringésmegállás során felszabaduló neuronspecifikus enoláz és*
1931 *S100b neurobiomarker preanalitikai mérési hibalehetőségei*. Ideggyógyászati Szemle
1932 Proceedings/ Clinical Neuroscience Proceedings szakfolyóirat, ISSN 2498-6240 Megjelenés:
1933 (2023)

1934

1935 Papp Ábel; Kristály Christopher; Horváth L. Levente; Béri Laura; Kittka Bálint; Nagy Tamás;
1936 **Nagy Zsófia**; Vámos Zoltán: *Hemodinamikai instabilitás okozta S100b neurobiomarker*
1937 *szérumkoncentráció-változása*. Ideggyógyászati Szemle Proceedings/ Clinical Neuroscience
1938 Proceedings szakfolyóirat, ISSN 2498-6240 Megjelenés: (2023)

1939

1940 Kristály Christopher; Papp Ábel; Horváth L. Levente; Béri Laura; Kittka Bálint; Nagy Tamás;
1941 **Nagy Zsófia**; Vámos Zoltán: *Neuronspecifikus enoláz-szérumkoncentráció változása*
1942 *pacemakerrel indukált periarrest állapotban*. Ideggyógyászati Szemle Proceedings/ Clinical
1943 Neuroscience Proceedings szakfolyóirat, ISSN 2498-6240 Megjelenés: (2023)

1944

1945

1946 Karsai István; **Nagy Zsófia** ✉; Nagy Tamás; Kocsor Ferenc; Láng András; Kátai
1947 Emese; Miseta Attila; Fazekas Gábor; Kállai János: *Physical exercise induces mental flow*
1948 *related to catecholamine levels in noncompetitive, but not competitive conditions in men*.
1949 SCIENTIFIC REPORTS (2045-2322 2045-2322): 13 Paper 14238. 10 p. (2023) IF: 4.6

1950

- 1951 **Nagy Zsófia** ✉; Karsai István; Nagy Tamás; Kátai Emese; Miseta Attila; Fazekas
1952 Gábor; Láng András; Kocsor Ferenc; Kállai János: *Reward Dependence-Moderated*
1953 *Noradrenergic and Hormonal Responses During Noncompetitive and Competitive Physical*
1954 *Activities*. FRONTIERS IN BEHAVIORAL NEUROSCIENCE (1662-5153): 16 Paper
1955 763220. 11 p. (2022) IF: 3.0
- 1956
1957 Nagy Tamás; Fisi Viktória; Frank Dorottya; Kátai Emese; **Nagy Zsófia**; Miseta Attila:
1958 *Hyperglycemia-Induced Aberrant Cell Proliferation; A Metabolic Challenge Mediated by*
1959 *Protein O-GlcNAc Modification*. CELLS (2073-4409): 8 9 Paper 999. 29 p. (2019)
1960 IF: 4.366
- 1961 **Nagy Zsófia**; Kátai Emese; Miseta Attila; Nagy Tamás: *Stress Tolerance and Protein O-*
1962 *GlcNAc Regulation in Neuroblastoma Cells under Hypoglycemic Condition*. Experimental
1963 Biology 2019 2019-04-06 [Orlando (FL), Amerikai Egyesült Államok] Megjelenés: (2019)
- 1964
1965 Darnai G; Szolcsányi T; Hegedüs G; Kincses P; Kállai J; Kovács M; Simon E; **Nagy**
1966 **Zs**; Janszky J: *Hearing Visuo-tactile Synchrony - Sound-Induced Proprioceptive Drift in the*
1967 *Invisible Hand Illusion*. BRITISH JOURNAL OF PSYCHOLOGY (0007-1269 2044-8295):
1968 108 1 pp 91-106 (2017) IF: 2.507
- 1969
- 1970 **Összesített impakt faktor az egyéb eredeti közleményekből: 14.473**
- 1971
- 1972
- 1973 **Összesített impakt faktor: 19.473**
- 1974

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

1975

1976

1977 Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Nagy Tamásnak az elmúlt években
1978 nyújtott támogatásáért és türelméért. Hálás vagyok, hogy befogadott, szakmailag és emberileg
1979 is mellettem állt, hasznos tanácsai mind a kutatói munkában, mind az oktatásban értékesnek
1980 bizonyultak.

1981 Köszönettel tartozom Prof. Dr. Miseta Attilának, hogy a kezdetektől fogva hitt bennem és
1982 támogatott minden ötletem megvalósításában.

1983 Szintén köszönöm Dr. Karsai Istvánnak, hogy már kutatómunkám kezdetén mellém állt és
1984 támogatott.

1985 Hálás vagyok Dr. Bock-Marquette Ildikónak a kutatómunkámban nyújtott segítségéért, a
1986 hasznos tapasztalatok átadásáért, a barátságáért és a kezdetektől való támogatásáért minden
1987 téren.

1988 Szívből köszönöm Dr. Kátai Emese, Dr. Jakabfi-Csepregi Rita, Halász Heléna, Dr. Réger
1989 Barbara kolléganőimnek, Német Istvánnak és Dr. Vámos Zoltánnak értékes szakmai tanácsait
1990 és javaslatait. Ugyanakkor köszönöm, hogy barátként is mindig számíthattam rájuk.

1991 Köszönetemet fejezem ki közvetlen munkatársaimnak, akikkel a Laboratóriumi Medicina
1992 Intézetben, illetve a Szentágothai János Kutatóközpontban együtt dolgozhattam.

1993 Végezetül, nagyon köszönöm édesanyámnak, páromnak és az egész családomnak a támogatást,
1994 hogy lehetővé tették tanulmányaimat. Hálás vagyok a megértésükért, segítségükért és
1995 türelmükért, mely nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el.

1996