

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

A kutatási téma előzményei

A energiaháztartás hypothalamicus szabályozása:

A neuroendokrin hypothalamus számos homeosztatiszikus folyamatnak, a teljesség igénye nélkül pl. a szervezet energiaháztartásának (táplálékfelvétel, energiadepók felépítése-lebontása, hőháztartás) és a reprodukció folyamatoknak az idegi központja. A hypothalamicus energiaszint-szabályozás különös sajátossága, hogy miközben ezen agyi központ működése alapvető fontosságú a teljes szervezet energiaháztartásának szabályozásában, e szabályozóműködésért felelős idegsejtek energiaszintje a megfelelő működés érdekében szintén precíz celluláris energiaszint szabályozásra szorul. A tudomány mai állása szerint nem ismert az a határ, amely a szervezeti szintű és a sejtszintű energiaszabályozás között húzódik. Legnagyobb valószínűség szerint a perifériás feedback jelek, amelyek alapján a hypothalamus megfelelő áramkörei neuroendokrin mechanizmusokon keresztül irányítják a teljes szervezet anyagcseréjét, egy ponton divergálnak, és e ponton túl az intraneuronális (biokémiai) jelrendszer az adott individuális idegsejtek saját „nyelvén” indukálja a sejtekben a kívánt válaszreakciót. Ezek az intracelluláris jelek egyben úgy szabályozzák a sejt mitokondriumainak működését, hogy azok a kívánt válaszreakcióval arányos mennyiségű energiát (pl. ATP-t) termeljenek (azaz, ha a kívántnál kevesebb energiátároló molekula képződne, a sejt nem lenne képes ellátni a feladatát, ha pedig túl sok, akkor fennállna az „üzemanyag”, elsősorban glükóz túlzott mértékű felhasználásából adódó energiahány lehetőség, amely felboríthatná a szervezet homeosztázisának szabályozását.

Jelen OTKA pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy fényt derítünk egy ma még igen kevésbé ismert intramitochondriális mechanizmusra, amely korábbi kutatásaink alapján az ektonukleozid-trifoszfát difoszfohidroláz 3 (NTPDáz3) nevű enzim segítségével képes lehet a mitokondrium által termelt ATP mennyiségének a szabályozására.

Az NTPDáz3

Napjainkban az NTPDázoknak 8 fajtája ismert (NTPDáz1-8). Ezek közül a legtöbb integrált membrán protein: Az NTPDáz1 [1], NTPDáz2 [2], NTPDáz3 [3, 4] és NTPDáz8 [5] membránba épült, aktív doménjük az extracelluláris tér felé néz. E sejtfelszíni enzimek extracelluláris nukleotidokat hidrolizálnak, ezúton szabályozva a P_2X és P_2Y purinerg receptorok specifikus ligandumainak mennyiségét. Egyes szövetekben a nukleozid monofoszfátokat az 5'-ektonukleotidáz tovább hidrolizálja adenzinná, amely a P_1 adenzin receptor aktivátora. Az NTPDázok közül eddig csak NTPDáz1-3-at azonosítottak agyszövetben. Az NTPDáz1 előfordul az idegsejtekben, valamint a gliában és endotel sejtekben is [6, 7], míg NTPDáz2-t főként a központi idegrendszer germinális zónáiban találtak (A B-limfociták szintén expresszálnak NTPDáz2-t [8]). Az NTPDáz3 mRNS-ét először Chadwick and Frischauf azonosította a központi idegrendszerben [4], mi pedig a közelmúltban írtuk le ezen enzim disztribúcióját patkányok agyában [9]. Utóbbi munkában valószínűsítettük, hogy az NTPDáz3 neuron-specifikus, ezen túl pedig kimutattuk, hogy az NTPDáz3 jelen van az idegsejtek perikarionjában és nyúlványaiban is. NTPDáz3-immunreaktív (NTPDáz3-IR) perikarionokat csak a nucleus arcuatusban (AN) és a laterális hypothalamicus magban (LHN) találtunk. Ezután tovább karakterizáltuk az NTPDáz3 szubcelluláris lokalizációját a hypothalamusban [10], azonosítottuk az enzimet a mitokondriális mátrixban, illetve a belső mitokondriális membrán szoros közelségében. Kiegészítő vizsgálataink erősen valószínűsítették, hogy a hypothalamusban az NTPDáz3 gátló neuronokban nem, hanem csak serkentő idegsejtekben fordul elő. Ezen morfológiai

munkákból nyert eredményeket funkcionális vizsgálatokkal is alátámasztottuk, amelyek elsősorban a hypothalamusból nyert szinaptoszómák mitokondriális légzésének mérésére támaszkodtak. Eredményeink az mutatták, hogy az NTPDáz3 kísérletes gátlása szignifikánsan csökkentette az ADP-függő, 3-as típusú mitokondriális légzési ráta (state 3 mitochondrial respiration rate, St3 *mrr*) értékét, valamint a teljes mitokondriális légzési kapacitást (St5, lásd később). Minthogy az idegi aktivitás, különösen a neurotranszmisszió, erősen energiafüggő [11], azt feltételeztük, hogy a hypothalamicus idegi működés, különösen az excitatórikus aktivitás, erősen függhet a mitokondriális NTPDáz3 működésétől, azaz annak ATP-hidrolizáló képességétől.

A mitokondriális légzés

A sejtlégzés gyakorlatilag a mitokondriumokban (mitokondriális légzés) zajlik. Minthogy a téma egyetemi tananyag, ennek részletezése ehelyt nem indokolt. Mindazonáltal szükségesnek látjuk, hogy a kutatási módszereink (kísérlettervezés, módszerek megválasztása) szempontjából a mitokondriális légzés néhány vonatkozását kihangsúlyozzuk. Minthogy a sejt működéséhez szükséges energiatároló ATP zömmel a mitokondriumokban képződik, a celluláris működés pedig energiafüggő, nem nehéz belátni, hogy a sejt egészséges működése, energetikai szempontból, a kielégítő mitokondriális légzésen, más szóval mitokondriális metabolizmuson múlik. Fontos tehát, hogy a mitokondriális metabolizmus sebességét, mértékét, a sejt energiaellátásának szempontjából indikátor paraméternek tekintsük. A közelmúltban végzett kutatásaink során, tekintettel az NTPDáz3 funkciójára (ATP-hidrolizálás, és ezen keresztül a mitokondrium ATP-készletének szabályozása), az ADP-függő, 3-as típusú mitokondriális légzés NTPDáz3-függőségére koncentráltunk, és jelen pályázat kísérleteit is e paraméter mérésére fókuszáltuk. Kiegészítő vizsgálataink azonban igazolták azt az egyébként szintén tankönyvi ismeretet, miszerint az ADP serkentőleg hat a mitokondriális metabolizmus sebességére, azaz nagyobb mennyisége felpörgeti a mitokondriális légzést, ami több oxigén és a citrát körhöz tartozó „üzemanyag” molekula fogyasztásához vezet. Az ADP átfogó, pozitív visszacsatolós működését figyelembe véve, a mitokondriális metabolizmus precízebb elemzése érdekében ezért az eredetileg tervezett kísérleteinket kiegészítettük négy további olyan paraméter vizsgálatával, amelyek összessége egyrészt szélesebb betekintést enged az extracelluláris jelek (pl. hormonok) mitokondriális metabolizmust befolyásoló hatásainak mechanizmusába, másrészt pedig megmutatják, hogy a mitokondriális légzés egyes elemei hogyan változnak egymáshoz viszonyítva az említett hatások eredményeképpen. Az összesen 5 vizsgált kísérleti körülményt (paramétert) hypothalamusból nyert szinaptoszóma-mitokondrium frakciókban alakítottuk ki, melyeket önkényesen 1-5 stádiumú mitokondriális légzésnek neveztünk el (**St1-5**). Az St1-5-öt a következőképpen állítottuk össze (a mért adatok [itt nem részletezve] a mitokondriális légzési rátát [*mrr*] jelentik [fogyasztott oxigén nmol/egységnyi mennyiségű minta/perc]:

St1: A mitokondriális oxigén (O₂) fogyasztást respirációs pufferben mértük, egyéb szubsztrátum hozzáadása nélkül. Ilyek körülmények között az időegység alatt fogyasztott O₂ mennyisége a hypothalamicus minta metabolikus állapotától, valamint a szövet in vivo történt O₂/vérellátásától függ.

St2: A citrát kör “üzemanyaggal” való ellátása érdekében piruvátot és malátot adtunk a mintához. Ilyen körülmények között a citrát kör felpörög, az O₂ fogyasztás pedig megnő a terminális oxidáció és oxidatív foszforiláció felgyorsulása miatt, amennyiben a szövet in vivo O₂/vérellátása kielégítő volt.

St3: ADP-t adtunk a mintához. Minthogy az ADP a mitokondriális légzés fő serkentője, ilyen körülmények között a légzési ráta (*mrr*) megnő, amennyiben a minta in vivo O₂/vérellátása kielégítő volt.

St4: Oligomicint adtunk a mintához. Az oligomicin blokkolja az ATP-szintetáz, ezért gátolja az oxidatív foszforilációt, mialatt a terminális oxidáció folytatódik. Ilyen körülmények között az O₂-fogyasztás a mitokondriumban uralkodó úgynevezett “uncoupled” állapot és az alternatív oxidáció mértékétől függ. Élettani körülmények között az “uncoupling” (az oxidatív foszforiláció és terminális oxidáció szétválasztása) és az alternatív oxidáció fontos szerepet játszanak a mitokondriális ATP-bioszintézis mértékének átmeneti csökkentésében akkor, amikor a sejt energiaszükséglete lecsökken. Ezért, az ilyen körülmények között történő magas O₂ fogyasztás azt jelzi, hogy egy adott folyamat, amely azelőtt a magas energiaigény miatt intenzíven zajlott, most éppen (azaz annak energiával történő ellátása) leszabályozódik.

St5: FCCP-t (carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone) adtunk a mintához. Az FCCP egy cianvegyület, ezért megköti a rendszerben maradó összes O₂-t. Az O₂ fogyás mértéke ilyen körülmények között attól függ, hogy mennyi O₂ fogyott az St1-4 alatt, valamint a minta in vivo O₂/vérellátásától, azaz, a minta eredeti metabolikus állapotától (mint később látható, ez az ösztroz ciklus egyes fázisai által meghatározott). Más szóval, az St1-4 alatt fogyasztott O₂ plusz az St5-ben lekötött O₂ mennyisége jelzi a hypothalamus O₂-ellátottságát a mintavétel pillanatában.

Ösztrogén (E2) és pajzsmirigyhormonok (PMHk)

Mint korábban említettük, a neuroendokrin hypothalamus a reprodukciós folyamatoknak és az energiaháztartás szabályozásának egyaránt központja. Korábbi irodalmi adatok szerint e két szabályozó tevékenységért felelős hypothalamicus idegi körök számottevő átfedést mutatnak, azaz bizonyos neuron populációk mindkét szabályzó mechanizmusnak elemei [12], így egyik téma vizsgálata sem történhet a másik figyelembevétele nélkül. Ezzel összhangban, a női nemi ciklus fő irányító hormonja, az E2, és az energiaháztartást irányító fő hormonok, a PMHk is átfedő funkciókkal bírnak, ugyanakkor ebbéli szerepük napjainkban is intenzív kutatások tárgya. Ezért volt szükséges, hogy a jelen pályázatban kitűzött kísérletek eredményeinek minél realisztikusabb értékelése érdekében, az adott szűkös anyagi és még szűkösebb időhatárok keretei között néhány kiegészítő vizsgálattal tisztázzuk, vajon létezik-e kapcsolat a mitokondriális NTPDáz3, valamint az E2 és PMHk között. Azt már a közelmúltban publikáltuk, hogy ovariektomizált (ovx), valamint egyszeri E2 dózissal kezelt ovx patkányok hypothalamusában az NTPDáz3 expressziója és aktivitása E2-függő [10]. Jelen kísérleteinkben azt is bebizonyítottuk, hogy az NTPDáz3 aktivitása függ az ösztroz ciklus adott fázisától is, alátámasztva a fent említett korábbi eredményeinket [13]. Olyan kísérleteket is elkezdtünk, amelyek a vér PMH-koncentrációjának relációjában vizsgálja az NTPDáz3 hypothalamicus expresszióját, azonban a kísérletek kezdeti stádiuma miatt itt csak annyit említünk meg, hogy a PMHk mennyisége is befolyásolja az NTPDáz3 hypothalamicus kifejeződését. Szerencsénkre az idén lezárult korábbi OTKA 72186 pályázatunk (vezető kutató Dr. Bartha Tibor) fő témája, az ösztrogén- és PMH receptorok interaktív vizsgálatának témájával [14] segítségünkre volt annak tisztázásában, hogy milyen lehetséges interreceptorális mechanizmusokon keresztül szabályozódhat az E2 és PMHk hatása, ugyanakkor kérdéses maradt, vajon az NTPDáz3-ra kifejtett említett hormonhatások receptor-mediáltak-e. Az E2 és PMH receptorokra vonatkozó vizsgálataink értelmezése [15, 16, 17, 18] mindenesetre nagy segítségünkre volt a jelen pályázat eredményeinek kiértékelésében. (tekintettel a mindössze két éves futamidőre, a kísérletek számára és a téma szerteágazó jellegére, a jelen pályázat NTPDáz3-ra vonatkozó eredményei még csak konferencián [13, 19] és akadémiai beszámolón [20, 21] kerültek bemutatásra, folyóiratban történő publikációk pedig jelenleg zajlanak)

GnRH-hullám, LH-hullám

Röviden összefoglalva, a hypophysealis LH-felszabadulás az előagy GnRH-termelésének a függvénye, a GnRH-felszabadulás pedig a nemi ciklus során alternatív pozitív-negatív feedback folyamatok útján szabályozott. A ciklus legnagyobb szakasza során a vérplazma ovariális E2-je negatív feedback útján alapszinten tartja a GnRH/LH termelődést, majd a késői proösztusz folyamán a ciklus-közepi E2 hullám kíséretében a negatív feedback rövid időre pozitív feedback-re vált, utóbbi pedig GnRH és következményes LH hullámot vált ki, amely előfeltétele és kiváltója is az ovulációnak. Saját korábbi kutatásaink igazolták, hogy az alternatív feedback-fázisok hátterében a hypothalamus neuronjainak plaszticitása áll, amely egyszerűen megfogalmazva a serkentő és gátló szinapszisok számának plasztikus változását jelenti, természetesen szabályozott formában. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy ovx állatokban a GnRH sejteken nem található szinapszis [22, 23, 24], ehelyett e sejteket gliahüvely veszi körül. Az E2-hullám kezdeti szakaszával egyidejűleg a GnRH sejteken nagyszámú excitatórikus szinapszis képződik (pozitív feedback), majd megjelennek a gátló szinapszisok is, és számuk hamarosan túlszárnyalja a serkentő szinapszisok számát (negatív feedback). Jelen pályázat szempontjából e téren a legfontosabb részfolyamat tehát, hogy a pozitív feedback során a serkentő/gátló szinapszisok hányadosa átmenetileg megnő, és ez jól tükröződik a serkentő idegsejtekben működő NTPDáz3 aktivitásán és az össz szöveti mitokondriális metabolizmus mértékén is.

Kísérletes megközelítés, állatok

A fentiekben részletezett kutatási előzmények után jelen pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy felderítsük a GnRH felszabadulás és a hypothalamicus NTPDáz3 aktivitásának összefüggéseit, a fentiekben vázolt kiegészítésekkel. Kísérleteink kiegészítéseit saját metodikai fejlesztéseink [21], valamint az OTKA 72186 sz. pályázat által finanszírozott és témájában kapcsolódó kutatásaink is elősegítették, aminek eredményeképpen eredményeink messze túlmutatnak az eredetileg tervezettnél.

Az NTPDáz3 olyan ATP hidrolizáló enzim, amelynek jelenlétét a hypothalamus serkentő neuronjainak mitokondriumaiban először mi mutattuk ki, és valószínűsítettük ezen enzim szerepét a mitokondriális ATP mennyiségének szabályozásában. Ennek igazolására több, egymást kiegészítő kísérletet végeztünk patkányokon, a következő kísérletes beállításokkal:

- Ovariektomizált (ovx) állatok, illetve ovx+E2 állatok hypothalamus szövetének vizsgálata a pályázatban leírtak szerint;
- Fiziológiásan ciklizáló intakt nőstény patkányok hypothalamus szövetének vizsgálata az ösztusz ciklus minden fázisában (a ciklus fázisait hüvelykenet vizsgálatával állapítottuk meg);
- A hypothalamusból készült szinaptoszóma-mitokondrium frakciók (lásd alább) metabolizmusának mérése a „A mitokondriális légzés” c. fentebbi fejezet szempontjai szerint, NTPDáz3 blokkolásával és anélkül;
- A hypothalamus bal- és jobboldali féltékéből készült minták szimultán vizsgálata;
- A vérszérum E2 és LH szintjének meghatározása minden állatban (a hormon szint vizsgálatok jelenleg zajlanak, a mérési eredmények a közeljövőben várhatók).

A mitokondriális légzés méréséhez szükséges mintának a méréshez történő előkészítési technikáját a pályázatban leírtakhoz képest úgy fejlesztettük, hogy egy módosított ultracentrifugálási protokoll és egy percol grádiens beépítésével a módszer mérési érzékenységét javítottuk. Ezt alapvetően úgy értük el, hogy a szinaptoszóma frakció mellett a perikaryonok mitokondriumaiból külön frakciót nyertünk, emellett pedig a nagy myelin tartalmú sejtörtmeléket (a myelin mérési pontatlanságokat eredményez), mint külön megjelenő frakciót eltávolítottuk. Ezúton a relatíve kicsi méretű minták (a hypothalamus egyik

oldali „fele”) a korábinál megbízhatóbb eredményeket szolgáltatottak és a két félteke eredményeinek összehasonlítása megbízhatóbbá vált.

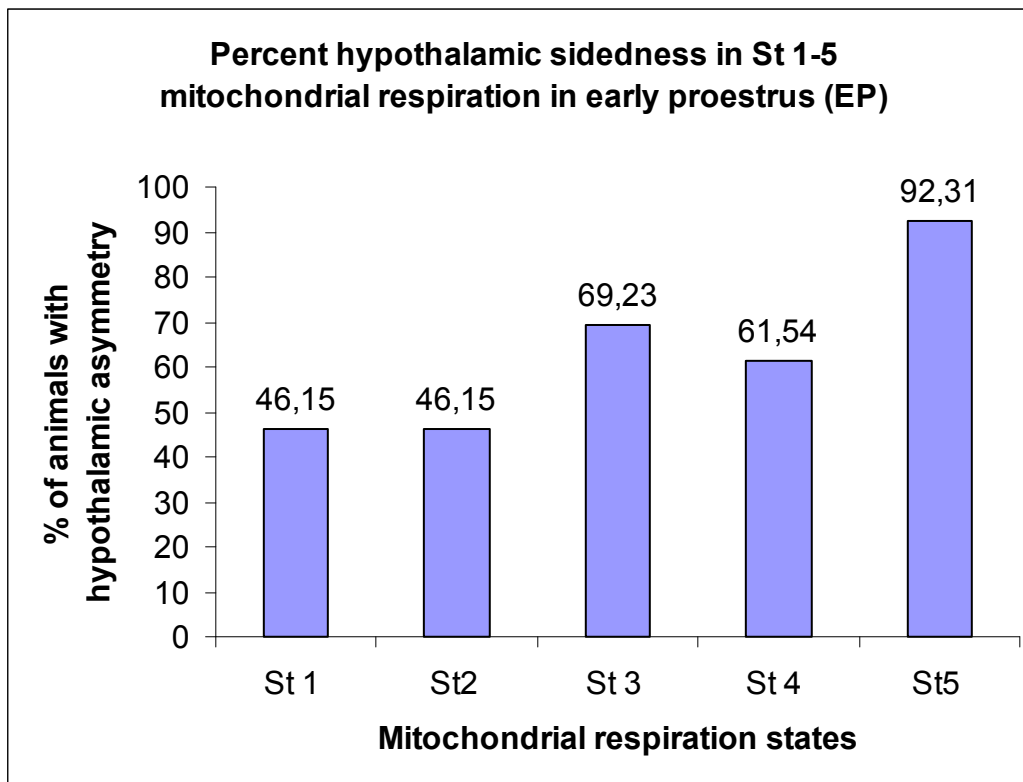
OTKA támogatással elért eredmények

Jelen pályázat eredményeiről célszerűnek tartottuk két külön szempont szerint beszámolni: „A hypothalamicus aszimmetria”; és „A mitokondriális metabolizmus” alcímek alatt, annak ellenére, hogy maguk az eredmények ugyanazon kísérletekből származnak.

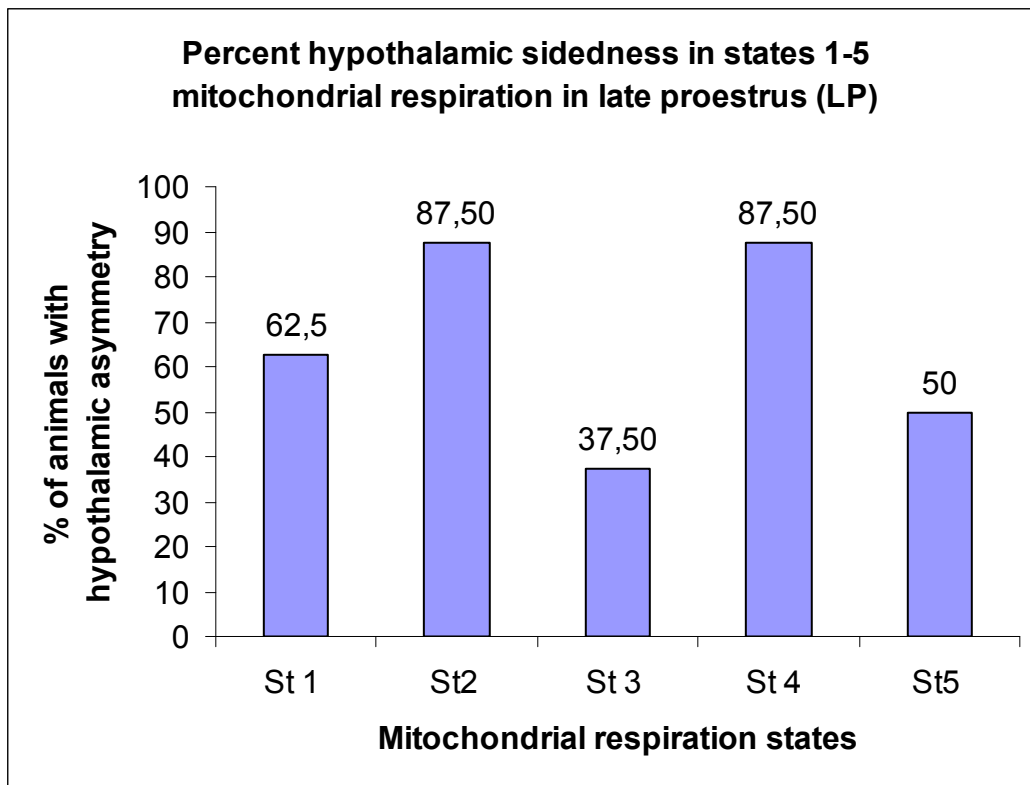
Hypothalamicus aszimmetria

A fentiekben leírt kísérletes körülmények és a pályázatban leírt módon kivitelezett (St1-5-re bővített) mérések oly módon történtek, hogy függetlenül a kísérletes körülményektől, az állatok hypothalamusainak jobb és bal féltekéjét elkülönítettük egymástól és azok mitokondriális metabolizmusát féltekék szerint mértük és elemeztük. A konkrét eredmények alapvetően két fontos aspektusa említendő meg: **1.) A mitokondriális metabolizmus, beleértve az NTPDáz3 aktivitását is, az ösztroz ciklushoz, illetve annak egyes fázisaihoz igazodó hullámzó tendenciát mutatott; 2.) Ez a hullámzó tendencia az állatok több mint 80 %-ában a hypothalamusnak csak az egyik féltekéjében mutatkozott, míg az ellenoldali félteke mitokondriális metabolizmusa a ciklus minden fázisában egyenletes, kiegyenlített tendenciát mutatott** (az alábbi táblázatokban azonban csak azon állatokból származó méréseket vettük aszimmetrikusnak, amelyek esetében a két félteke közötti százalékos arány elérte/meghaladta az 58/42 %-os arányt).

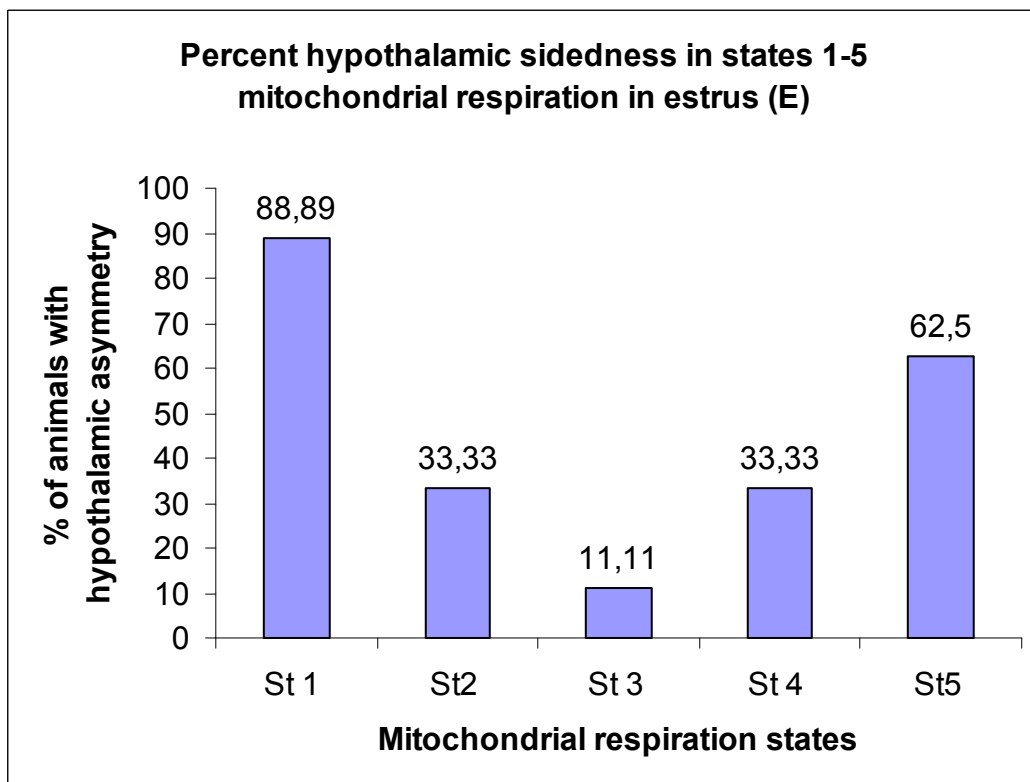
1. Ábra. Az egyes respirációs stádiumokban tapasztalt aszimmetria az állatok százalékos arányában kifejezve a korai proösztrozban.



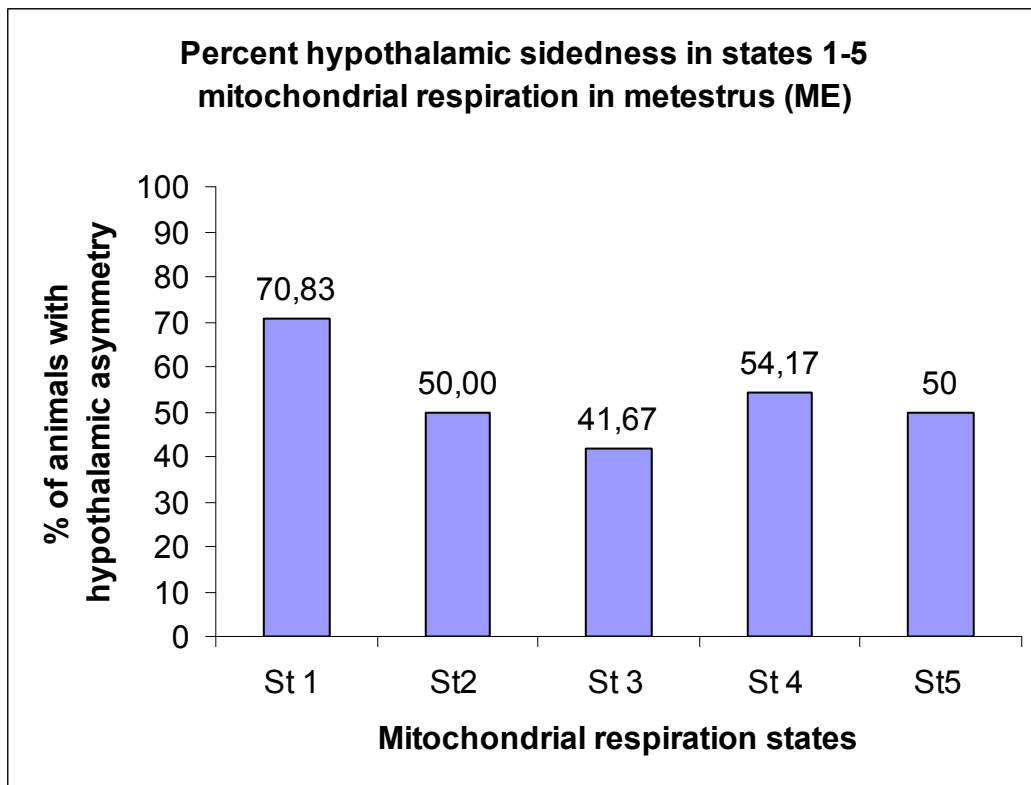
2. Ábra. Az egyes respirációs stádiumokban tapasztalt aszimmetria az állatok százalékos arányában kifejezve a késői proösztrozban.



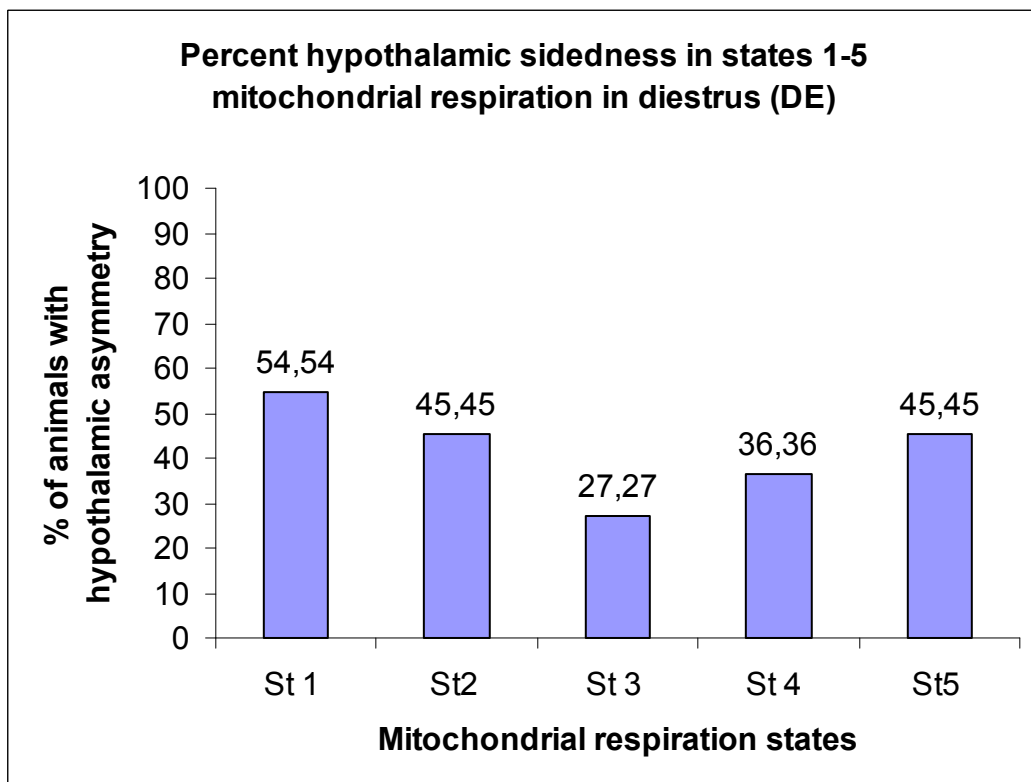
3. Ábra. Az egyes respirációs stádiumokban tapasztalt aszimmetria az állatok százalékos arányában kifejezve ösztrozusban.



4. Ábra. Az egyes respirációs stádiumokban tapasztalt aszimmetria az állatok százalékos arányában kifejezve metösztrozusban.



5. Ábra. Az egyes respirációs stádiumokban tapasztalt aszimmetria az állatok százalékos arányában kifejezve diösztuszban.



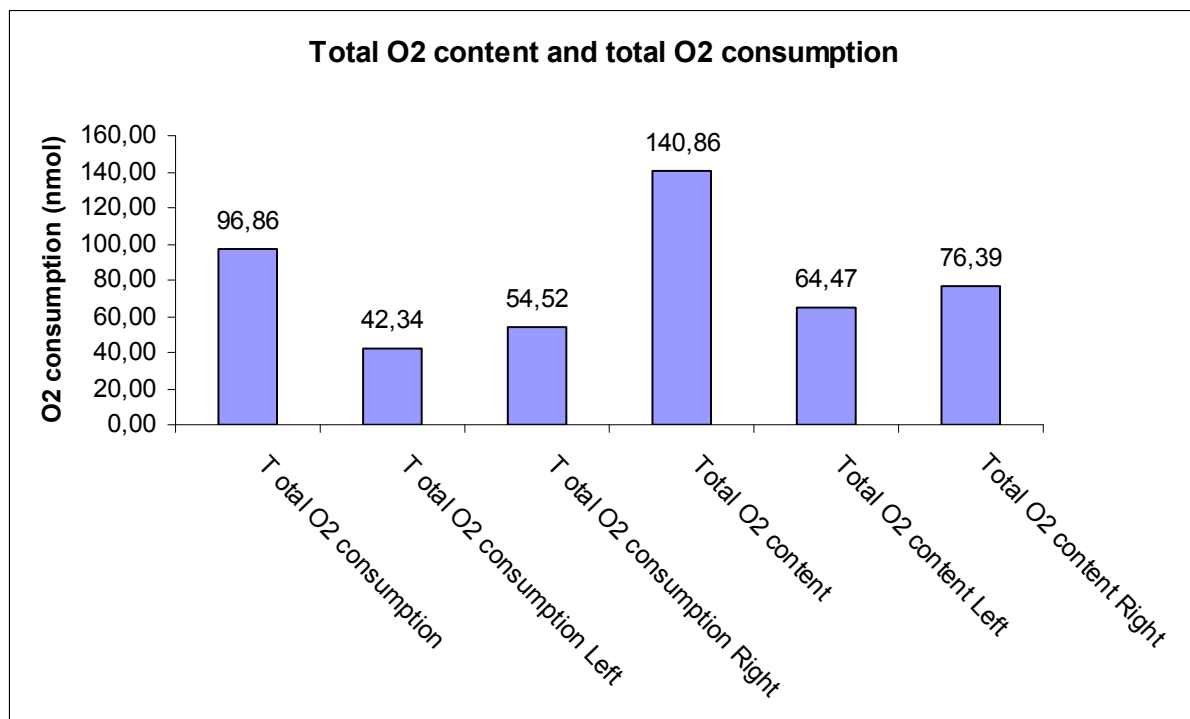
Ez a jelenség arra enged következtetni, hogy – legalábbis patkányokban – a GnRH hypothalamicus szabályozása aszimmetrikus, azaz féloldali hypothalamus aktivitáson

alapszik. A hypothalamicus aszimmetriáról rendelkezésre álló korai adatokat Halász Béla foglalta össze 1997-ben [25]. Eszerint már az 1900-as évek második felében mind morfológiai, mind pedig szöveti GnRH mérések utaltak a hypothalamus aszimmetrikus működésére. Ennek ellenére az irodalmi adatok arról tanúskodnak, hogy e kutatási terület vonatkozó kísérletei ezen ismereteket a mai napig nem veszik figyelembe. Minthogy a hypothalamus funkcionális aszimmetriája további fontos kérdéseket vet fel, azt reméljük, hogy jelen eredményeink felhívják a kutatók figyelmét e jelenség fontosságára. Meglátásunk szerint a hypothalamus aszimmetriája, a teljesség igénye nélkül, a következő fontosabb kérdéseket illetve lehetőségeket veti fel: Hogyan és mikor fejlődik ki az aszimmetria az egyedfejlődés során? Befolyásolható-e az aszimmetria kialakulása, és ha igen, az milyen következményekkel jár? Adott egyed esetében oldalhoz kötött-e az aszimmetria, vagy ciklusról ciklusra alternatív (oldalváltó) módon jelentkezik-e? Korhoz kötött-e, hogy melyik félteke az aktív, illetve történik-e kortól függő félteke-váltás az állat reprodukív élete során? Megvan-e a „passzív” féltekében is a ciklicitás potenciája? Létezik-e egy, a „passzív” féltekében rejlő második reprodukív élet lehetősége?

A saját jelen kísérleteink szempontjából a további, az aszimmetriára vonatkozó kísérletek legnagyobb gátjának azt tartjuk, hogy jelenleg csak post mortem tudjuk megállapítani ezt az aszimmetriát, ezért, és mert az egyes állatokban változó, hogy melyik oldali félteke az „aktív”, nem vagyunk képesek célzottan, in vivo kísérletekkel vizsgálni az adott egyed „aktív” hypothalamus féltekéjét. Ezért intenzíven dolgozunk azon, hogy megfelelő módszert találjunk arra, hogy élő állatban azonosíthassuk a hypothalamus „aktív” féltekéjét.

A fentiekben leírt módon kiegészített vizsgálataink lehetőséget adtak arra is, hogy összehasonlítsuk a hypothalamicus féltekék O₂ ellátását.

6. Ábra. Összesített (kétoldali), valamint féltekékre vetített teljes oxigénfogyasztás és oxigén tartalom középértékei.



E téren is aszimmetriát tapasztaltunk, azzal a kiegészítéssel, hogy a hypothalamus O₂ ellátása azon állatokban is aszimmetrikus volt, ahol a mitokondriális O₂ fogyasztás a két félteke között kiegyenlítettnek bizonyult. Ebből a jelenségből arra a következtetésre

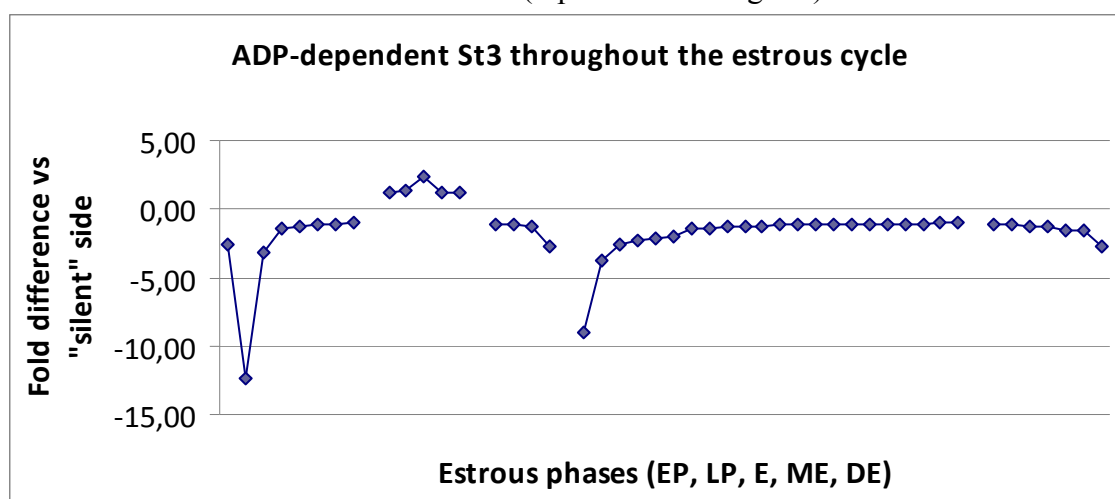
jutottunk, hogy a féltekék aktivitásához igazodó aszimmetrikus O₂ ellátás a lokális vérkeringés aszimmetriájával jár, és ez arra utal, hogy léteznie kell egy, az autonóm idegrendszer hypothalamust beidegző részében is fellelhető aszimmetriának.

Mitokondriális metabolizmus, mitokondriális légzési ráta (mrr)

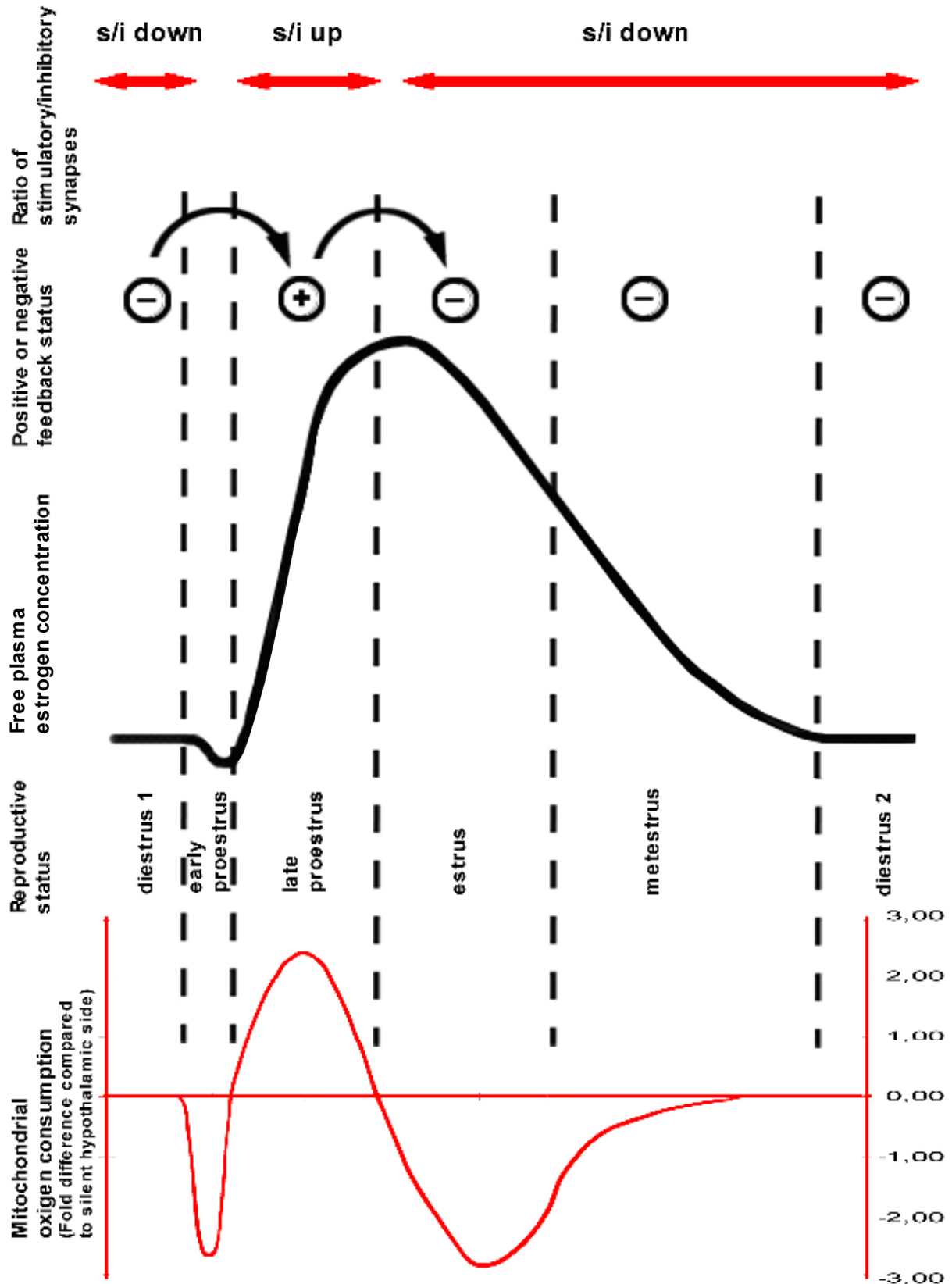
A hypothalamicus minták mitokondriális metabolizmusának mérései óriási adatmennyiséget szolgáltatottak, az 5 külön kísérletes körülmény (St1-5) pedig lehetőséget kínált arra, hogy a minta in vivo (még élő) állapotában, az állat feláldozásának pillanatában zajló folyamatok energetikai hátterét folyamatukban is tanulmányozhassuk. Az eredmények e bősége miatt az adatok kiértékelése még jelenleg is folyamatban van, de az ezzel kapcsolatos első publikációhoz már elegendő letisztult információval rendelkezünk (publikálás folyamatban). Az alábbiakban összefoglaljuk azon megfigyeléseinket, amelyekkel kapcsolatban már többé-kevésbé stabil következtetésre jutottunk.

1.) Az ADP-függő St3 korrelál a korábbi kísérleteink szerint leírt „hirtelen” nagyszámú hypothalamicus excitatórikus szinapszis létrejöttének és aktivitásának idejével, ami az ösztrusz ciklus proösztrusz-korai ösztrusz fázisainak idejére esik. Ez a megfigyelés lehetővé tette, hogy a szinaptikus plaszticitás történéseinek [24] megfelelő hullámvonal formájában ábrázoljuk az NTPDáz3-függő St3 adatokat. Ebben a megközelítésben a hullámvonalon azonos vagy közel azonos értéket mutató adatok vagylagosan kerültek a hullám felszálló vagy leszálló szakaszára, minthogy az St3 érték önmagában nem mutatja, hogy egy hullámgörbét követő folyamat kezdeti vagy végfázisáról van-e szó. St1-5-re bővített kísérleteink azonban, a „A mitokondriális légzés” c. részében megfogalmazott értékelési szempontokat figyelembe véve (különös tekintettel az St4-re), lehetővé tették, hogy nagy biztonsággal azonosítsuk az egyes ösztrusz fázisok kezdeti és vég-szakaszait, és így az St3 eredmények realiztikus sorrendje is megállapíthatóvá vált. Az St3 adatok sorrendiségét (amely hullámgörbét formált) követve a többi St adatot is azonos sorrendben ábrázolva sajátosan és eddig nem publikált módon mutatja az ösztrusz cikluson átívelő mitokondriális metabolizmus alapvető paramétereit.

7. **Ábra.** ADP-függő St3 értékek („aktív” vs „passzív” félteke). Az egyes ösztrusz fázisok értékei elkülönített vonalakon ábrázolva (reprezentatív diagram).



8. Ábra. A szinaptikus egyensúly (a serkentő/gátló szinapszisok aktuális aránya), a feedback típusának aktuális állása, a plazma aktuális szabad ösztrogén szintje, az ösztrusz aktuális fázisa, valamint a fentiekkel időben egybeeső mitokondriális légzési paraméterek együttes ábrázolása. Ezen az ábrán jól kivehető az ösztrusz fázisaitól függő hullámzó intenzitású mitokondriális metabolizmus.



Ez a fajta ábrázolásmód, amely folyóiratban közölve is hamarosan megjelenik, azért fontos, mert egy adott egyed egészséges állapotát jellemző paraméterekkel (centrális St1-5 értékek perifériás hormonszintekkel igazolt ovulációval kiegészítve) látja el.

A pályázat eredeti célkitűzései között szerepelt az NTPDáz3 blokkolás hatásának vizsgálata. **Az NTPDáz3 blokkolása (Suraminnal) szignifikánsan csökkentette az ATP-hidrolizálást, emiatt pedig a (kevesebb ADP miatt) következményesen csökkent facilitáló hatás csökkentette a mitokondriális O₂ felhasználást. Ez a jelenség azonban nem csak az St3-t jellemzi, hanem (minthogy a Suramin-kezelés már a kísérlet elején megtörtént) a csökkent ADP szint visszahatva az St1-2-t is csökkentette, ugyanakkor megnőtt a minták St5 (reziduális O₂) értéke. Ebből arra következtethetünk, hogy az NTPDáz3 gátlásával nem csupán a már szintetizált mitokondriális ATP mennyiség csökkenthető, hanem visszacsatolós módon, átfogóan csökkenthető a mitokondriális metabolizmus sebessége is. Emiatt feltételezhető, hogy olyan esetekben, amikor az excitotoxicitás veszélye fenyeget, az NTPDáz3 részleges, terápiás blokkolása mitokondrium- és sejtvédő hatású lehet. Az, hogy az NTPDáz3 blokkolása ténylegesen megakadályozta-e az LH hullám kialakulását, a jelenleg (és a közeljövőben) zajló hormonszint vizsgálatokból tudható majd meg.**

Elméletileg tehát, kísérleteink ezen eredményei hozzájárulnak ahhoz, hogy a jövőben remélhetően kifejlesztett in vivo (de itt nem meghatározott) módszerekkel is mérhető St1-5 adatokkal az esetleges patológiás szaporodásbiológiai tünetek konkrét oka(i) meghatározhatók és orvosolhatók lesznek.

További célok

Az azonnali és legfőbb célunk, hogy olyan módszert találjunk vagy fejlesszünk, amely lehetővé teszi az „aktív” hypothalamus félteke megállapítását élő állatban. Minthogy az általunk leírt aszimmetria a hypothalamus vérellátottságára is vonatkozik, az egyik lehetséges módszer a termográfia alkalmazása lehet, amely jelenleg általánosan alkalmazott módján kellően érzékeny, azonban térbeli felbontási képessége kérdésessé teszi, hogy kisméretű rágsálók esetében, jelen esetben patkányok hypothalamusának hőmérsékleti monitorozására, speciális módosítás nélkül megfelel-e.

A mitokondriális NTPDáz3 működésének hormonális szabályozása alig ismert. Ezért kiemelkedő fontosságú, hogy a hypothalamus esetében, amelynek működését az E2 és PMHk alapvetően befolyásolják, mielőbb tisztázzuk, hogy milyen módon hat e két hormonsalád az NTPDáz3 expressziójára és aktivitására. A hormonhatások legvalószínűbb mediálói maguk a hormonok specifikus receptorai lehetnek, ezért további terveink között szerepel az E2, PMHk, ezek receptorai és az NTPDáz3 közötti funkcionális viszony tisztázása.

Végezetül, távolabbi céljaink közé tartozik egy olyan metabolikus paraméterekből álló képlet kidolgozása, amely az adott (hypothalamusra ható vagy abból fakadó) hormonális viszonyok illetve szimultán metabolikus paraméterek segítségével jellemzőek egy adott egyedre (egészségképlet), így patológiás esetekben támpontul szolgálhat mind a helyes diagnózis felállításában, mind pedig a megfelelő terápia megválasztásában.

A témához kapcsolódó irodalmak (saját közlemények vastag sorszámmal)

1. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, Alpert A, Friend D, Gimpel SD, Gayle RBI: The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. J Immunol 1994, 153:3574–3583.

2. Mateo J, Harden TK, Boyer JL: Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* 1999, 128:396–402.
3. Smith T, Kirley TL: Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1386:65–78.
4. Chadwick BP, Frischauf AM: The CD39-like gene family: Identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 1998, 50:357–367.
5. Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J: Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 2004, 43:5511–5519.
6. Wang T-F, Guidotti G: Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res* 1998, 790:318–322.
7. Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES Jr, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR: Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002, 109:1031–1040.
8. Braun N, Sevigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H: Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci* 2003, 17:1355–1364.
9. Belcher SM, **Zsarnovszky A**, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL: Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: Implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behavior. *Neuroscience* 2006, 137:1331-1346.
10. Kiss DS, **Zsarnovszky A**, Horvath K, Gyorffy A, Bartha T, Hazai D, Sotonyi P, Somogyi V, Frenyo LV, Diano S: Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2009, 7:31-43.
11. Laughlin SB, de Ruyter van Stevenick RR, Anderson JC: The metabolic cost of neuronal information. *Nat Neurosci* 1998, 1:436–441.
12. Horvath TL: The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 2005, 8:561-565.
13. **Zsarnovszky A**, Tóth I, Johnson TS, Somogyi V, Kiss DS, Györffy A, Goszleth G, Bartha T, Frenyo VL: Possible hypothalamic laterality in the central regulation of GnRH release in rats: thoughts that might lead to a novel approach in hypothalamic studies. *IBRO International Workshop*, 2012.

14. Scalise TJ, Győrffy A, Tóth I, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, **Zsarnovszky A**: Ligand-induced changes in Oestrogen and thyroid hormone receptor expression in the developing rat cerebellum: A comparative quantitative PCR and Western blot study. *Acta Vet Hung* 2012, 60:263-284.
15. Somogyi V, Győrffy A, Scalise TJ, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyó VL, **Zsarnovszky A**: Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen and insulin. *Nutr Res Rev* 2011, 22:1-23.
16. Tóth I, Goszleth G, Frenyó VL: The major regulators of feed-intake: ghrelin, leptin and their interactions. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2012, 8:504-512.
17. Kiss DS, Jócsák G, **Zsarnovszky A**: The role of insulin in the central regulation of feed-intake. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2012, közlésre elfogadva
18. Somogyi V, Győrffy A, Bartha T: The role of estrogen and thyroid hormones in the regulation of feed-intake. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2012, közlésre elfogadva
19. Kiss DS, Somogyi V, Győrffy A, Bartha T, Diano S, Frenyó VL, **Zsarnovszky A**: Sexual steroids influence NTPDase3-expression in the neuroendocrine hypothalamus. *IBRO International Workshop*, 2010.
20. Tóth I, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó VL, **Zsarnovszky A**: A hipotalamikus gnRH szekréció unilaterális szabályozása. *Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló, SzIE ÁOTK, Budapest*, 2012. Január.
21. Kiss DS, Tóth I, Goszleth G, Somogyi V, Bartha T, Frenyó VL, **Zsarnovszky A**: Az idegvégződésekből és idegsejt-testekben lévő mitokondriumok légzésének differenciált méréséhez szükséges szubfrakcionálási metodika kidolgozása. *Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló, SzIE ÁOTK, Budapest*, 2012. Január.
22. **Zsarnovszky A**, Horvath TL, Garcia-Segura LM, Horvath B, Naftolin F: Oestrogen-induced changes in the synaptology of the monkey (*Cercopithecus aethiops*) arcuate nucleus during gonadotropin feedback. *J Neuroendocrinol* 2001, 13:22-28.
23. Parducz A, **Zsarnovszky A**, Naftolin F, Horvath TL: Estradiol affects axo-somatic contacts of neuroendocrine cells in the arcuate nucleus of adult rats. *Neuroscience*. 2003, 117:791-794.
24. Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, **Zsarnovszky A**, Demir N, Fadiel A, Leranthe C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A: Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod Sci* 2007, 14:101-116.
25. Gerendai I, Halász B: Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1997, 18:354-381.