

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

A kutatási téma előzményei

Az energiaháztartás

Tanszéki kutatócsoportunk évtizedek óta vizsgálja a szervezet energia-háztartásának hormonális hátterét. E hormonok közül a legrégebb óta a pajzsmirigyhormonok ismertek. Az elmúlt évtizedek kutatásai új hormonokat írtak le, amelyek fontos szerepet játszanak a szervezet általános energia-háztartásának szabályozásában. A leptin és a ghrelin hormonok a kilencvenes évek közepe óta ismertek.

Jelen OTKA pályázatban arra vállalkoztunk, hogy a két legfontosabb energia-háztartást befolyásoló hormon szerepét molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáljuk annak érdekében, hogy funkciójukat és szerepüket az eddigieknél precízebben tudjuk magyarázni.

A pajzsmirigyhormonok

Kutatásaink középpontjában hosszú ideje a szervezet anyagcseréjét befolyásoló egyik legfontosabb hormon, a pajzsmirigyhormon áll. Nagyon távoli visszatekintést adva tanszékünk azzal büszkélkedhet, hogy részese volt a korai pajzsmirigy-kutatásoknak, amikor a hypothalamo-hypophysis tengely központi szabályozását, illetve a centrális negatív feedback jelenséget vizsgálták a kutatók. A későbbiekben tisztázódott, hogy a négy jód atomot tartalmazó pajzsmirigyhormon a tiroxin (T_4) csak elő-hormonnak számít, a valódi biológiai hatásért a három jód atomot tartalmazó trijód-tironin (T_3) a felelős. Tanszékünk ekkor radioimmun analízis (RIA) módszert dolgozott ki a hormonszintek meghatározására.

A nyolcvanas években az idő közben eltávozott Rudas professzor szellemi hozzájárulásával világossá vált, hogy a T_3 legnagyobb részben a perifériás szövetekben (azaz a pajzsmirigyen kívül) alakul át T_4 -ből egy enzimatis folyamat során. A deiodáz enzimek jellemzésére enzimkinetikai vizsgálatokat végeztünk. A kutatások eredményeképpen három különböző deiodáz enzimet írtak le, amelyek a pajzsmirigyhormon aktiválásban és inaktiválásban vesznek részt. Az egyes és kettes-típusú deiodázok (D1 és D2) a hormonaktiválásban, míg a hármas típus (D3) az inaktiválásban vesz részt.

Számos kísérletet terveztünk, amelyek a deiodázok szabályozását voltak hivatottak kideríteni. A szóba jöhető szabályozó faktorokat változtatva az enzimek aktivitásának mennyiségi változásait mértük. Az akkori nemzetközi kutatómunka (melynek kutatócsoportunk is részese volt) legfontosabb eredménye az volt, hogy kimutattuk, az egyes szövetek önálló pajzsmirigyhormon szabályozó képességgel rendelkeznek. Ez egyfajta szöveti automáciát biztosít, amely tehát viszonylagos függetlenséget ad a centrális szabályozástól. Az egyes szövetek tehát képesek lesznek az aktuális igényeiknek megfelelően beállítani a helyi aktív pajzsmirigyhormon szinteket.

A deiodázok klónozása

A deiodázok pontos működésének valamint szabályozásának megértése érdekében világszerte nekifogtak a három enzimtípus klónozásának. A D1 és D3 klónozása után hosszú

éveken keresztül nem jártak sikerrel a D2 klónozására irányuló erőfeszítések. Jelen kutatás témavezetője egy korábbi OTKA pályát segítségével elsőként klónozte a csirke D2 enzimét (3). A molekuláris biológiai jellemzés során (14) kiderült, hogy a D2 is szelén tartalmú enzim. Míg a D1 leginkább a perifériás szövetek (elsősorban máj) T₃ termeléséért felelős, addig a D2 az idegszövet számára állít elő aktív pajzsmirigyhormont. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a D1 működésének szabályozásában a szervezet energia-felvétele volt az egyik legfontosabb szabályozótényező, addig az agyi D2 hormonszintektől és energetikai állapottól függetlenül az idegszövet folytonos T₃ ellátását tartja szem előtt. Külön érdekességnek tartottuk, hogy csirkében a máj is tartalmaz D2-t, míg más állatfajokban a D2 nincs jelen a májban. Ezek a fenti eredményeink irányították figyelmünket a máj és a központi idegrendszer vizsgálataira felé.

A leptin hormon

A leptin elsősorban a fehér zsírszövetben termelődik és elsődleges feladata a központi idegrendszer tájékoztatása a szervezet általános energiatartalékairól. Növekvő zsírdepók és nagy zsírsejtek magas leptin szintet eredményeznek, míg kisméretű zsírsejtek és csökkenő zsírdepók csökkentik azt. A leptin a hypothalamus neuronjain fejt ki a hatásait. Szabályozza a táplálékfelvételt, hatással van az energiatermelő folyamatokra, ugyanakkor befolyásolja a nemi működést is. Számunkra a nemi működés szabályozása azért vált egy fontos tényezővé, mert a szaporodásbiológiai folyamatok szoros összefüggést mutatnak az általános anyagcsere folyamatokkal. A reprodukciós folyamatokat leállítja a romló energetikai egyensúly, a relatív vagy abszolút alultápláltság. A kapcsolat legkézenfekvőbb példája maga a leptin hormon, ami egyszerre rendelkezik anyagcsere és szaporodásbiológiai folyamatokat irányító hatásokkal. A fentieket túlegyszerűsítve elmondhatjuk, hogy a csökkenő leptin hormonszint az, ami vészjelzést ad a szervezet számára.

A leptin további érdekessége az, hogy nemcsak a fehér zsírszövet termeli, hanem számos szövet előállít leptin hormont, ami nem feltétlenül jut el a központi idegrendszerbe, hanem nagy valószínűséggel parakrin módon fejt ki hatását. Úgy tűnik tehát, hogy a pajzsmirigyhormon háztartáshoz hasonlóan a leptin háztartás is rendelkezik lokális szöveti autonómiával, amit kutatásaink során szintén vizsgálni kívántunk.

Kvantitatív módszerek és képi megjelenítés

A molekuláris biológiai módszerek megjelenése új kutatási megközelítést tett lehetővé. A pajzsmirigyhormon háztartás megismerése szempontjából olyan eredmények megjelenéséhez vezetett, amit a hagyományos élettani módszerekkel nem lehetett volna elérni. Az általunk korábban alkalmazott technikák azonban csak "igen-nem" kérdésekre tudtak választ adni. Klónozással azonosítani lehetett az addig ismeretlen dehidrogenáz enzimeket, PCR módszerrel, Northern blot technikával meg lehetett mondani, hogy egy adott DNS vagy RNS szekvencia jelen van-e egy sejtben vagy nincs.

Jelen OTKA pályázat segítségével olyan kutatási módszerek alkalmazására vállalkoztunk, amelyek mennyiségi viszonyokról is tájékoztatást adnak. Olyan PCR technikák használatát tűztük ki célul, amelyek sejten belüli mRNS szintek összehasonlítására, mennyiségi viszonyaik meghatározására is alkalmasak. Fontosnak tartottuk továbbá azt is, hogy az egyes vizsgált mRNS szakaszok, illetve fehérje termékek jelenlétét a szöveteken belül láthatóvá

tegyük. Ennek érdekében immunhisztokémiai és in situ hibridizációs módszerek alkalmazását kívántunk laboratóriumunkban bevezetni.

A kísérletes megközelítés

A fentiekben részletezett kutatási előzmények után jelen pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy a háziállatok energia-metabolizmusát szabályzó fontosabb endokrin tényezőket olyan molekuláris biológiai eszközökkel vizsgáljuk, amelyek az adott transzkripció és transláció folyamatok anatómiai és mennyiségi viszonyairól is tájékoztatást adnak. Két hormont vizsgáltunk behatóan, a leptint és a pajzsmirigyhormonokat.

A leptin olyan fontos energia-háztartást szabályzó hormon, amelynek az általános anyagcsere hatásai mellett a szaporodásbiológiai hatásai nem elhanyagolhatók. A leptin hatásokat ezért a következő szervekben tanulmányoztuk:

- tőgy
- járulékos nemi mirigyek
- máj

A pajzsmirigyhormon háztartást elsősorban két szervben vizsgáltuk:

- máj
- központi idegrendszer

A leptin és a pajzsmirigyhormon háztartás interakcióját a mindkét hormon esetében vizsgált szervben, a májban végeztük.

A következőkben tematikus módon ismertetjük az eredményeket.

OTKA támogatással elért eredmények

Leptin expresszió szarvasmarha tőgyszövetben

A jelen pályázat által támogatott kutatási periódust megelőzően létrehoztunk kérődző állatokban faj-függetlennek mutató leptin és leptin receptor DNS szakaszokat, amellyel bivaly egyes szöveteiben vizsgáltuk a leptin és receptorainak szöveti kifejeződését. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a tőgyszövet termel leptint (**16**).

A tőgyet azért találtuk érdekesnek, mert a kutatásaink elkezdésekor ismert volt, hogy a különböző állatfajok teje leptint tartalmaz. Szarvasmarhában RT-PCR technikával ki is mutatták a leptin lokális termelődését. Más állatfajokban immunhisztokémiai módszerekkel a tejmirigy leptin fehérje termelését megerősítették (további részletek: **19**).

Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a tejmirigy saját leptin termelése hozzájárulhat-e a tej leptin-tartalmának növeléséhez, továbbá arra, hogy a tejmirigy rendelkezik-e helyi autoregulációs képességgel a leptin hormon termelésének és felhasználásának szempontjából. Tejelő és szárazon álló állatokból vettünk szövetmintákat, amelyben a leptin mRNS szinteket hasonlítottuk össze.

Kompetitív PCR technika

A kompetitív PCR technika kidolgozásához egy korábbi részleges leptin klónt használtuk fel. Számítógépes vizsgálattal megállapítottuk, hogy tartalmaz két olyan restriktív enzim vágóhelyet, amely szakasz kivágásával részleges klón hozható létre, és így az eredeti klón mérete 55 bázispárral csökkenthető. Az így előállított módosított DNS szekvenciát ismert töménységgel, növekvő mennyiségben adtuk hozzá a tőgyből izolált cDNS-hez, amelyhez a teljes mRNS reverz transzkripció átírásával jutottunk. A vizsgált szövetben található mRNS töménységét akkor tekintettük a hozzáadott standarddal azonosnak, amennyiben a gélen látható két (55 bázispár különbségű) csík azonos intenzitással jelent meg. A módszer kidolgozása után elvégeztük a kísérleteket. Eredeti várakozásunkkal ellentétben azt találtuk, hogy a tejelő és a szárazon álló tőgyszövet leptin mRNS tartalma nem különböztek egymástól.

In situ hibridizáció

Ekkor elhatároztuk, hogy in situ hibridizációs technikával vizsgáljuk a tőgyszövetben termelt leptin mRNS tartalmát. A kezdeti nehézségeket az okozta, hogy a hibridizáció során – a keresett szakaszok kimutatására – jelölt DNS komplementer szakaszokat (DNS szondát, továbbiakban DNS próbát) használtunk. DNS próbával azonban nem tudtuk a háttér megfelelő módon csökkenteni, a biztosan negatív és pozitív kontrollok gyakran nem mutattak meggyőző különbséget. Ekkor tértünk át RNS próbák alkalmazására. Az in situ hibridizációs módszerhez a próbákat nem radioaktív módon, hanem digoxigeninnel (DIG) jelöltük, ami előhívás után barna színben jelenik meg. A hibridizáció további részleteit a standard molekuláris biológiai leírások szerint végeztük.

Eredményeink azt mutatták, hogy a szarvasmarha tőgyben valóban jelen van a leptin gén transzkripció. Más állatfajokhoz hasonló módon a leptin előállításáért legnagyobb mértékben a tőgy epithel rétege tehető felelőssé. Ez az a sejtréteg, amelyik a tejelő állatokban az acinusokban található tejet határolja, illetve termeli. Szárazon álló állatokban ugyanakkor a leptin jelentős részét a tőgyszövet zsírszövetje állítja elő. A kompetitív PCR technika által a két csoport leptin termelésében kimutatott egyezés tehát csak a teljes tőgyszövetre igaz, azaz arra az esetre, hogyha a szárazon álló tőgyszövet jelentős zsírszövet tartalmának leptin termelését is figyelembe vesszük. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az epithel sejtréteg által termelt leptin mennyisége tejelő állatokban nagyobb, mint szárazon álló egyedekben (17).

Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az mRNS vizsgálatokkal, a kompetitív PCR-rel, valamint in situ hibridizációval csak a transzkripció folyamatát tudjuk nyomon követni. A fenti eredmények tehát csak akkor bírhatnak élettani jelentőséggel, ha az mRNS-ből fehérje is képződik. A leptin transzlációját a megtermelt fehérje kimutatásával tudjuk igazolni. Az igazoláshoz szövettani metszetek immunhisztokémiai festését választottuk. Laboratóriumunkban beállítottuk a leptin kimutatására alkalmas immunhisztokémiai módszert. Szövettani metszeteken azokban a sejtekben találtunk leptin fehérjét, amelyekben in situ hibridizációval is igazoltuk a leptin mRNS jelenlétét. Az immunhisztokémiai vizsgálataink a korábbi eredményeinket támasztották alá (19).

A leptin termelés helyi autonómiát biztosít

További érdekes adatokat szolgáltatottak leptin receptor eredmények. In situ hibridizációval kimutattuk, hogy a tőgyszövet jelentős teljes hosszúságú (Ob-Rb), valamint rövidebb, de funkcionálisan működő (Ob-Ra) receptor-termeléssel rendelkezik. Eredményeink szerint a lokálisan termelődő leptin parakrin módon fejt ki hatását. A laktáló tejmirigy leptin termelésével segít a tejtermelés fenntartásában. Leptin ugyanis elengedhetetlen a tejtermeléshez, leptin nélkül a tejmirigyek elapadnak. Az ellés utáni periódusban ugyanakkor a kialakuló negatív energiaegyensúly és csökkenő testsúly következtében csökken a keringő leptin mennyisége. A tejmirigy a keringésből hiányzó leptin mennyiségét feltehetőleg helyileg pótolja. Eredményeink szerint a pajzsmirigyhormon háztartáshoz hasonlóan a szövetek részben függetleníteni tudják magukat a centrális hormontermeléstől (jelen esetben a fehér zsírszövet leptin termelésétől) és szükségleteiknek megfelelően a helyi hormonszintet emelni lesznek képesek (2).

Leptin expresszió hím patkányok járulékos nemi mirigyeiben

A tőgy által termelt tejben nagyobb a leptin tatalom, mint keringő vérplazmában. A tej többlet leptin tartalmát a tejmirigy szintetizálja. Hímekben az ondóplazma leptin eredete tisztázatlan. Ugyanakkor eltérő adatok találhatóak az irodalomban a leptin szerepéről a hímek járulékos nemi mirigyeinek fejlődésében és működésében. A korábban leírt kísérletsorozathoz hasonlóan hím patkányok járulékos nemi mirigyeit vizsgáltuk meg. Génbanki adatok alapján készítettünk patkány specifikus leptin valamint leptin receptor szekvenciákat, amelyet in vitro transzkripció során DIG-gel jelöltünk. Az így előállított próbákat in situ hibridizációra használtuk fel. Az immunhisztokémiai eljáráshoz a szarvasmarha leptin fehérjéhez előállított ellenanyagot teszteltük, majd használtuk fel sikeresen. Eredményeink szerint hím patkányokban mind a prosztata, mind az ondóhólyag termel leptint. A tejmirigy eredményekhez hasonlóan arra következtettünk, hogy a lokális hormontermelés hatással van magukra a járulékos nemi mirigyekre az ondóplazma leptin tartalmára és a leptin receptorokon keresztül a spermasejtek aktivitására is. Ezek a vizsgálataink is kiemelik a leptin termelés és felhasználás lokális szabályozó hatását, a parakrin hatások jelentőségét (15).

Pajzsmirigyhormon metabolizmus a májban

A pajzsmirigyhormonok a bevezetőben említett módon leginkább a perifériás szövetekben aktiválódnak illetve inaktiválódnak a dehidáz enzimek szabályozó működése következtében. A máj tartalmaz D1-es aktiváló és D3-as inaktiváló enzimet is. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján úgy tűnt, hogy energiahiányos állapotban csökken a májbeli enzimatisz hormonaktiválás és nő az inaktiválás mértéke. Eredményeinket úgy magyaráztuk, hogy a bélcsatornából kevesebb energia ekvivalens szívódik fel, amit legelőször a máj érzékel a portális keringés révén. A máj csökkent energia felvétel során tehát csökkenti az aktív pajzsmirigyhormon mennyiséget, ami végül is csökkenti a szervezet oxigénfogyasztását, azaz csökken az energia leadása, a szervezet egyfajta takarékos működésre vált. Irodalmi adatokban fellelhető enzimkinetikai vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy a D1 enzim aktivitása nem változik, azonban a D3 aktivitás a vártan megfelelően növekszik. A látszólagos paradoxon (véleményünk szerint a hormonaktiválás nő, mások szerint a D1 nem változik) feloldására akkor nyílt remény, amikor csirke májában kimutattuk a D2 enzimet. Jelen OKTA pályázat keretében sikerült kimutatnunk, hogy az általunk már korábban mért

enzim aktivitásnövekedés valóban létezik, csak nem a májbeli D1 aktivitásnak, hanem a csak madarakban fellelhető D2 aktivitásnak köszönhető.

Kísérleteinket úgy terveztük, hogy az állatokat a kontrollhoz képest 70 és 85 %-os energiaszinten takarmányoztuk, majd a csirkék májából mindhárom dehidrogenáz enzim aktivitását mértük. A méréseket hagyományos enzimkinetikai módszerekkel végeztük, az egyes állatok V_{max} és K_m értékeit határoztuk meg.

Kvantitatív PCR

Korábbi kísérleteink során, amikor a dehidrogenázok klónozása még nem történt meg, mindig problémát jelentett annak kiderítése, hogy az egyes enzimek aktivitását transzkripciós vagy poszttranszlációs módon szabályozza-e a szervezet. A kompetitív PCR alkalmazása ugyan alkalmasnak látszik a válaszadásra, azonban kidolgozása nagyon körülményes, az eredmények meglehetősen rossz hibaszázalékkal ismételhetők, az eredmények nem elég precízek (különbség felfedezéséhez legalább kétszeres eltérés szükséges), valamint egy ilyen vizsgálat abszolút értékek meghatározására csak limitált módon képes. Ezért jelentett nagy előrelépést számunkra, hogy sikerült beszerezni egy valós idejű PCR berendezést. A dehidrogenázok esetében a transzkripciós vizsgálatokat ezzel a berendezéssel végeztük.

A valós idejű PCR berendezéssel a méréseket úgynevezett *cyber green* festék felhasználásával végeztük. A berendezés egy olyan PCR készülék, amely minden láncreakciós ciklus végén megméri a keletkezett anyag koncentrációját. Az adatokat számítógépes program dolgozza fel, amely megadja azt a kalkulált ciklusszámot, amelynél a termék koncentrációja a háttér fölé emelkedik. Tekintettel arra, hogy logaritmikus reakcióról van szó, az RNS izolálás, a reverz transzkripció, valamint a minták kezelése során bevitt hibák a módszer jellege miatt idővel hatványozódnak. Ennek kiküszöbölésére minden esetben kell keresni egy belső standardot, egy olyan mRNS-t, amelynek a mennyiségét a kísérleti feltételek nem változtatják meg. Ez pajzsmirigyhormonok esetében különösen nehéz, mivel a T_3 a sejten belül szinte minden folyamatot serkent, legalább 200 fehérje termelését változtatja, ami maga után vonja a transzlációs rendszer változásait is – így például riboszómális RNS kontrollként nem használható. Sok próbálkozás után meglepetésre a béta aktin mutatkozott alkalmas belső standardnak (7).

D2 az az aktivátor, ami szabályozódik

Eredményeink szerint csökkent energia-felvétel esetén a D3 aktivitás és a D3 transzkripció is jelentősen megnő. Ez megerősíti korábbi vizsgálatainkat (1). A D1 enzimről kimutattuk, hogy sem mRNS szinten, sem aktivitás szinten nem szabályozódik a táplálékfelvétel változásainak hatására. Ez az eredmény az irodalmi adatoknak felel meg. Újszerű és számunkra nagyon megnyugtató eredmény született a májbeli D2 vizsgálatával kapcsolatban. Vizsgálataink azt mutatják, hogy relatív energiahiányban a D2 aktivitása csökken, ugyanakkor szignifikánsan kevesebb D2 mRNS is termelődik (20). Mindez azért volt megnyugtató, mert igazoltuk, hogy korábbi állításunk – miszerint ilyen kísérleti elrendezésben a májbeli hormonaktiválás csökken – igaz. Az irodalmi adatoktól való eltérést az adta, hogy a csirkék májbeli hormonaktiválása nem a D1, hanem a D2 enzimnek tudható be. Ugyanakkor új megállapítás az is, hogy az egyes enzimek transzkripciós szinten is szabályozódnak. Korábbi vizsgálatok általában a poszttranszlációs szabályzás fontosságára hívták fel a figyelmet. Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy az egyes enzimek K_m értékeiben nem történt változás, azaz nem egy

újfajta enzim jelent meg, hanem ugyanaz az enzim termelődött kisebb vagy nagyobb mennyiségben (7).

Átfogó energiaháztartást vizsgáló kísérletek

A pajzsmirigyhormon háztartás szempontjából a máj meghatározó szereppel bír. Ahogy az előző fejezetben bemutattuk, a máj a takarmány energiatartalmának függvényében változtatja az elérhető T_3 mennyiségét. A máj egy úgynevezett hormonexportáló szerv, azaz a megtermelt hormonok nagy részét a keringésbe bocsátja, ezáltal befolyásolja mind a T_4 mind a T_3 szinteket. Olyan kísérletsorozatot terveztünk, ahol azt szeretnénk volna megmutatni, hogy a deiodáz enzimek aktivitásának a változása mérhető biológiai hatással rendelkezik az egész szervezet szintjén. Minthogy a pajzsmirigyhormonok egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy növelik az oxigénfogyasztást, respirációs kamrás kísérleteket terveztünk. Azt vizsgáltuk, hogy az etetett tápanyaggal tudjuk-e manipulálni a deiodáz aktivitásokat úgy, hogy ez az energiatermelésben is megjelenjen.

Kísérleti elrendezés

A kutatást a könnyű kezelhetőség érdekében patkányon végeztük. A kísérleteket átfogó jelleggel terveztük, azaz igyekeztünk minden lehetséges kérdést feltenni, illetve ezekre válaszokat keresni. A következő szempontokat érvényesítettük:

- Megvizsgáltuk az energia-felvétel mértékének hatásait. Ez a korábbi kísérletünk ismétlése, respirációs kamrás körülmények között.
- Vizsgáltuk, hogy van-e jelentősége annak, milyen (döntően zsír, vagy szénhidrát) formában veszi fel az állat az energiaszükségletét. Korábbi megfigyelések szerint a deiodáz enzimekre leginkább csak a szénhidrát formában felvett energia hat. A kísérleteink során kontroll tápot fogyasztó, visszafogottan takarmányozott, magas palmitát és magas fruktóz tartalmú takarmányt fogyasztó csoportokat alakítottunk ki.
- Minden csoportban figyeltük a deiodáz enzimek transzkripció (valós idejű PCR), valamint enzimaktivitás szintű szabályozását.
- Tekintettel voltunk az időfüggésre is. A deiodáz enzimek gyorsan (akár órákon belül) reagálnak az energiatartalom megváltozására. Hosszú távon viszont pajzsmirigyhormon szinten centrális szabályozásnak van fontosabb szerepe. Ezért 12 órás és 1 hónapos hatásnak kitett csoportokat alakítottunk ki.
- Néztük az életkori hatásokat is, mert rendelkezünk fiatal és idős patkányokkal. Minden egyes csoport legalább négy állatot tartalmazott.
- Értelemszerűen megmértük a szérum pajzsmirigyhormon szintjeit, valamint a TSH tartalmát is (a centrális szabályozás monitorozása érdekében). Mértük továbbá a szérum leptin szintjét, valamint a fruktózos csoport miatt szükségessé vált az inzulin szint mérése is (fruktóz etetés hosszú távon diabetogén hatású).
- A fentiekén kívül felvettük az állatok számos anyagcsere paraméterét is: a vérplazma glükóz, koleszterin, triglicerid, szabadzsírsav, ketonanyag tartalmát, továbbá a májfunkciót tesztelő enzimeket.
- A kísérleti elrendezésünkben a test és egyes szervtömegek mellett telemetriás módszerrel alkalmunk nyílt megmérni az állatok testhőmérsékletét és regisztrálni az aktivitásukat is.

Az átfogó kísérletek eredményei

Ahogy ez a kísérleti elrendezésből is látszódik, a munka akár önállóan kerek egészet alkot. Ez a megérzés igaz is. Jelen OKTA pályázat támogatta egy munkatársunk PhD témáját, amely munka gerincét a fenti téma adja. A PhD dolgozat védeése a 2008-as évben megtörténik. Minden egyes eredmény részletes diszkutálása a közel 100 oldalas dolgozat jelentős részét teszi ki, ezért itt a terjedelmi korlátok miatt csak a leglényegesebb összefüggésekre hívjuk fel a figyelmet.

Az energiahányos takarmányozás hatására csökken a vérplazma keringő aktív pajzsmirigyhormon tartalma. A változás 12 óra múltán is megfigyelhető, de egy hónap múlva a változás erősödik. A jelenség hátterében a csökkent hormonaktiválás áll, azaz a deiodázok működése. Patkány májában nincs D2 enzim, ezért a változásokért a D1 és D3 enzimek működésváltozása a felelős. A csökkent hormonaktiválás következtében kevesebb T_4 fogy, ami csökkenti a T_4 felezési idejét. A megemelkedett T_4 szint viszont csökkent TSH szinteket eredményez. A csökkenő zsírdepók miatt e csoportokban található a legalacsonyabb leptin és inzulin szinteket. Ezek a csoportok mutatják a legkisebb fizikai aktivitást, a legnagyobb testsúlycsökkenést és (ami számunkra a legfontosabb) ezek az állatok rendelkeznek a legkisebb oxigénfogyasztással.

A zsírban gazdag diétán tartott csoportok meglepetéssel szolgáltak. Az a korábbi megfigyelés, miszerint a szénhidrát szegény diétán tartott állatok D1 aktivitása csökken, kísérleteink során leginkább az egy hónapos csoportokban jelentkezett. Ehhez a csökkent D1 aktivitáshoz tartozóan azonban növekedett D1 expressziót mértünk. Értelmezésünk szerint a szénhidrátok a már megtermelt enzimek aktivitását emelik, de úgy tűnik, hogy nem hatnak a transzkripciós folyamatokra. A centrális szabályozást is visszafogja a zsír felvétele, ennek ellenére a T_3 nem változik, vagy enyhén emelkedik, aminek a következtében az állat oxigénfogyasztása nagyobb lesz a kontrollnál. Végül is a csökkent leptin és inzulin szintek, valamint a testtömeg vesztés azt mutatja, hogy a zsíretetés energiahányhoz vezet.

A fruktózban gazdag takarmány etetése csak a 12. órában mutat ellentétes hatást az energiahányással. Ekkor ugyanis transzkripciós és enzimaktivitás szintjén növeli a hormonaktiválás mértékét, aminek következtében megnöveli az oxigénfogyasztást, az aktivitást és a maghőmérsékletet is. Hosszú távon ez az egy takarmány hoz testtömeg növekedést, de ezt az emelkedett inzulinszintre vezetjük vissza. A növekvő zsírdepók emelik a leptin szintet, és az első hónap végére a megnövekedett szénhidrátból konvertált zsírmennyiség a pajzsmirigyhormon paramétereiket a palmitátos csoportéra kezdi emlékeztetni.

A fenti kísérletsorozatból látható, hogy az energiaháztartás szabályozása több hormon összehangolt működésének eredménye. A takarmány összetételének változtatása hosszabb távon befolyásolja az inzulintermelést, ami pajzsmirigytől független változásokat eredményez. A csökkentett energia-bevitel mutatkozott a legjobb módszernek a pajzsmirigyhormon háztartás működésének vizsgálatára, a deiodázok transzkripciós és poszttranszlációs szabályozására. E csoportban mért eredményeinken végig követhetjük az egyes lépéseket: a takarmány energiatartalma hat a májbeli enzim mRNS termelésre, a fehérje aktivitására, a hormonszintekre, ami befolyásolja az anyagcserét, legvégül oxigénfogyasztásbeli különbségeket eredményez (8).

Pajzsmirigyhormon és leptin interakciók

Eddigi eredményeink alapján olyan kísérleti elrendezést igyekeztünk kialakítani, amelyben egy adott élettani állapot következtében jön létre energiahiányos állapot, amit szénhidrátok etetésével kívántunk befolyásolni. Vizsgálatainkat frissen ellett szarvasmarhákon végeztük. A tejelés beindulása során az anyaállatok negatív energiaegyensúlyba kerülnek. A tejelés energiaigényének egy részét ugyanis ezek az állatok nem a takarmány energiataralmából, hanem a saját zsírdépeik felhasználásából nyerik. A zsírmobilizáció természetesen nagy megterhelést ró a májra, kritikus esetekben máj elzsírosodás is létrejöhet, és úgynevezett zsírmáj szindróma alakul ki (12).

Frissen ellett teheneket májvédő propliénglikollal (PG) kezeltünk. A PG a glükoneogenetikus folyamatok révén növeli a máj szénhidrát tartalmát. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a PG adagolás hatására hogyan változik a leptin és a pajzsmirigyhormonok háztartása. Az ellést követő 7-10 napon májbiopsziát vettünk. Gyors fagyasztás után a mintákat -75°C -on tároltuk. Ugyanakkor vérmintákat vettünk az ellést megelőző második héttől az ellést követő hetedik hétig, összesen hét alkalommal. A máj szövetminták gyűjtésekor mindenképpen vettünk vérmintát is. A vérmintákból meghatároztunk a pajzsmirigyhormonok szintjét, a májmintákból RNS-t izoláltunk, majd valós idejű PCR módszer segítségével meghatároztuk a pajzsmirigyhormonokat aktiváló egyes típusú deiodáz (D1), valamint a leptin, illetve a leptin receptorok expresszióját (4).

A pajzsmirigyhormonok tekintetében azt tapasztaltuk, hogy PG adagolás hatására szignifikánsan megnövekedett a keringő pajzsmirigy elő-hormon (T_4), valamint az aktív T_3 mennyisége. Ugyanakkor a máj D1 enzim transzkripciójának szignifikáns növekedését láttuk, amiből megnövekedett a májbeli hormonaktiválásra tudunk következtetni. Ezzel tehát megmutattuk, hogy PG adagolás mind pre-, mind poszttranszlációs szinten növelte a D1 enzim aktivitását. A megemelkedett T_3 szintet azért tartjuk fontosnak, mert negatív energia egyensúlyban a szervezet csökkent energia-metabolizmusra áll át, amelynek hátterében alacsonyabb T_3 -szintek állnak. A T_3 -szint kialakításában nagy jelentősége van a pajzsmirigyen kívül az úgynevezett perifériás szövetek hormonaktiválásnak. A legfontosabb hormonaktiváló szerv a máj, amely a takarmánnyal (elsősorban szénhidrátok formájában) felvett energia függvényében változtatja a hormonaktiválást. A megnövekedett T_3 -szint nagy valószínűséggel a felszívódó PG-nek köszönhető. Az ezáltal megnövekedett T_3 -szint egy kevésbé energiahiányos állapotnak megfelelő szintre áll vissza. A T_4 -szint növekedésért a pajzsmirigy hormonkibocsátása a felelős, ami a nagyobb T_4 -fogyást kompenzálja.

A korábbi fejezetekben kitértünk a lokális leptintermelés jelentőségére. A helyileg termelődött leptin általában lokálisan is használódik fel. Vizsgálataink során így megmértük a májbeli leptin és leptin receptorok termelődésének ütemét is. Elsőként tudtuk kimutatni, hogy mind a leptin, mind a rövid leptin receptorok (Ob-Ra) mennyisége szignifikánsan megnövekedett PG adagolás hatására. Leptin esetében a növekedés közel négyszeres, az Ob-Ra esetében több mint kilencszeres. A teljes méretű leptin receptor (Ob-Rb) esetében nem találtunk különbséget a kezelt és a kontroll csoportok között. Az irodalmi adatok szerint a leptin növeli a mitochondriumok zsírsav oxidációját. A lokálisan termelődő, valamint a helyszínen parakrin módon ható leptin valószínűleg ezen a hatásmechanizmuson keresztül csökkenti a májsejtek elzsírosodásának mértékét. A kevésbé elzsírosodott májsejtek ennek következtében hatékonyabban működnek, ami megemelkedett májbeli anyagcserezintet engedélyez. A nagyobb anyagcserét szolgálja a megnövekedett T_3 -szint is, amit a korábbiakban tárgyaltunk. Valószínűnek látszik továbbá, hogy a leptin hormon háztartás a

pajzsmirigyhormon háztartással szoros kapcsolatban áll, ahol a T_3 -hatásoknak fontos szerepe van. Érdekes megfigyelés, bár további vizsgálatokat igényel, hogy a nagyon jól körülhatárolt funkciókkal rendelkező Ob-Rb receptor miért nem vesz részt a fenti szabályozásban, illetve szintje PG hatására miért nem változik.

Eredményeik alapján úgy tűnik, hogy az ellés körüli PG adagolás hatással van a fontosabb energia-metabolizmust befolyásoló hormonok háztartására. Ezek eredményeképpen csökken a nagymértékű zsírmobilizálás májat terhelő hatása, ami a máj kóros elzsírosodásához vezethet. Adataink azt mutatják, hogy PG májvédő hatása részben a leptin és a T_3 által közvetített emelt zsírégetés révén érvényesül (5).

Leptin dromedár májában

A szarvasmarha eredmények azt mutatták, hogy a leptin védelmi funkcióval rendelkezik a májelzsírosodással szembeni védekezés tekintetében. A leptin lokális szerepének tisztázására olyan állatfajban terveztünk leptin vizsgálatokat, amely úgynevezett fiziológiai elzsírosodást mutat. Vizsgálataink célállatának a dromedárt, az egy púppal rendelkező tevét választottuk. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a leptin és a leptin receptor expresszió milyen szövettani eloszlást mutat. Megvizsgáltuk továbbá a púp zsírszövetének, valamint a tejmirigy leptin és leptin receptor termelését is. Korábban bemutatott módszereinkkel mRNS mennyiséget mértünk, illetve szövettani metszetekben láthatóvá tettük az mRNS és a fehérje termelődésének helyét.

A vártak megfelelően a dromedár púpjának zsírszövege termelte a legtöbb leptint. A tejmirigyben kapott eredményeink nagyon hasonlóak voltak a szarvasmarha tőgyben találtakhoz. A májban viszont azt találtuk, hogy az epeutak környékén megnőtt mind a leptin, mind a leptin receptorok mennyisége, illetve az élettanilag elzsírosodott májszövet azon részén emelkedett meg, ahol a szövet a zsírcseppekkel határos volt. Az eredmények értékelése során arra jutottunk, hogy a májszövet leptin termelése és lipogénikus aktivitása összefüggésben állnak egymással. A leptin fehérje és a leptin receptorok ugyanazon szövetben, még hozzá a szövet ugyanazon területén történő kifejeződése a leptin lokális anyagcsere-szabályzó hatásairól alkotott elképzelésünket támogatja (18).

Hízott libamáj előállítás élettani háttere

Vizsgáltuk a liba májának elzsírosodását is, mivel a liba egy olyan állatfaj, amelynek mája szintén mutat élettani elzsírosodást. A termelési kísérletnek csak marginálisan voltunk a részesei, mert mi feladatuk annak megállapítása volt, hogy az egyes hormonális paraméterek milyen módon befolyásolják a libamáj elzsírosodásának mértékét (10). Eredményeink azt mutatják, hogy a máj elzsírosodása pozitív összefüggést mutat az aktív pajzsmirigyhormon termelésével, illetve ennek mennyiségével. A májelzsírosodás tehát nem egy hypothyroid állapot következménye – éppen ellenkezőleg: a máj a megnövekedett metabolizmusa mellett, vagy ennek következtében zsírosodik el (6).

Liba amiloidózis

Érzékenységi reakció következtében kialakulhat ludakban amiloidózis. Bár leggyakrabban ez hosszantartó antigén-ellenanyag kapcsolat jelenlétére jön létre, vizsgáltuk, hogy a túlhaltott

metabolizmus mennyiben tehető felelőssé, vizsgáltuk a jelenség élettani hátterét. Eredményeinket (11) e zárójelentés kereteiben nem részletezzük.

A központi idegrendszer vizsgálata

Az általunk korábban klónozott D2 enzim madarakat leszámítva a központi idegrendszerben játszik jelentős szerepet. Az agyi pajzsmirigyhormon metabolizmus egyes részleteivel kutatócsoportunk kiemelkedő tagja, az azóta eltávozott Rudas Péter professzor foglalkozott behatóan. Az agyi pajzsmirigyhormon metabolizmus három részét vizsgálta, a hormonfelvételt, a hormon konverziót (D2), illetve a hormonleadás egyes szabályozott lépéseit. E nagyobb lélegzetű munkának csak a D2-hez köthető egyes kísérleteit támogatta a jelen OTKA pályázat (13).

Szövettenyésztet

A pályázatban vállalt idegszövet tenyésztet kialakítását Rudas professzor távozása ellenére elvégeztük. Létrehoztunk egy in vitro kisagyi szemcsesejt-tenyésztet. Az elérhető leírásokhoz képest a módszert úgy fejlesszük tovább, hogy kísérleti céljainkat e modellel a legoptimálisabb úton érjük el, valamint hogy a vizsgálati modell kivitelezhető módon illeszthető legyen a tanszékünk kutatási infrastruktúrájához. Kidolgoztuk és leírtuk a sejtek kiültetésének, a sejttenyésztet fenntartásának, kezelésének és a sejtek begyűjtésének metodikai lépéseit. Különös figyelemmel voltunk az egyes metodikai lépések mögötti biológiai megfontolásokra, illetve a lehetséges vizsgálati módszerekre, amelyeket az in vitro kísérleti modell esetében alkalmazhatunk. A sejtekkel való munka a tanszéki rutin részévé vált (21).

A hypothalamus

A hypothalamus a központi idegrendszer azon része, amelyben az összes hormonális és autonóm idegrendszeri információ összegződik. A hypothalamus irányítja az orexigén és anorexigén folyamatokat, összegzi a leptin hatásokat, irányítja a hőtermelési folyamatokat és a takarmányfelvételt. A leptin és a pajzsmirigyhormonok hatásain kívül ezen agyterület működésének irányításában igen jelentős szerepet játszik az ösztrogén (23). Központi idegrendszeri vizsgálatainkat kiegészítettük tehát az ösztrogének hatásaival. Erről összefoglaló cikkben számoltunk be (22).

A hormonális interakciók vizsgálatának technikai hátterét jelen pályázat segítségével megteremtettük. A továbbiakban a hypothalamus egyes idegsejtjeinek energetikai állapotát vizsgáljuk majd. Az idegszövet számára elérhető ATP mennyiségét befolyásoló enzim, az ekto-nukleozid trifoszfát difoszfahidroláz 3 (NTPDase3) vizsgálatát elkezdjük (9). A hypothalamus érdekessége, hogy az egyes idegsejtek energetikai állapotának szabályozása és a szervezet energiaegyensúlya egymással szoros összefüggéseket mutatnak. A kutatás ezen irányának folytatására OTKA pályázatot adtunk be és nyertünk el.

A témához kapcsolódó saját irodalmak

1. Bartha, T.: Thyroid hormone metabolism in broiler chickens as influenced by exogenous and endogenous factors. PhD thesis, Catholic University of Leuven, No. 233. 1993

2. Bartha T, Sayed-Ahmed A, Rudas P.: Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. *Domest Anim Endocrinol.* 2005 Jul;29(1):193-202. Epub 2005 Apr 22.
3. Gereben,B.; Bartha,T.; Tu,H.M.; Harney,J.W.; Rudas,P.; Larsen,P.R.: Cloning and expression of the chicken type 2 iodothyronine 5'-deiodinase. *J. Biol. Chem.* (1999) 274: 13768-13776
4. Gyórfy A, Keresztes M, Faigl V, Frenyó V. L, Kulcsár M, Gaál T, Huszenicza Gy, Bartha T Effects of peripartum propylene glycol supplementation on energy metabolism: real-time PCR investigations. *Acta Physiologica Hungarica* (2007) 94(4) 323-403
5. Gyórfy Andrea, Keresztes Mónika, Faigl Vera, Frenyó V. László, Kulcsár Margit, Gaál Tibor, Huszenicza Gyula, Bartha Tibor Az ellés körül alkalmazott propilén-glikol kiegészítés hatása az energiaháztartásra: real-time PCR vizsgálat. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló, SzIE ÁOTK, Budapest, 2007. január 22.
6. Gyórfy Andrea, Rónai Zsuzsanna, Áprily Szilvia, Zsarnovszky Attila, Frenyó V. László, Bogenfűst Ferenc, Rudas Péter, Bartha Tibor: A hízottmáj-termelés metabolikus és hormonális hátterének vizsgálata máj- és húshasznosítású lúdhibridekben. *Magyar Állatorvosok Lapja, közlésre elfogadva (megjelenik: 2008. március)*
7. Gyórfy, A., Rudas, P., Bartha, T.: Investigation of chicken hepatic type II deiodinase activity using real-time PCR. *Acta Physiologica Hungarica* (2006) 93(2-3), pp 155-246
8. Gyórfy Andrea, Rudas Péter, Guido Haschke, Bartha Tibor: Az energiaháztartás és a hormonális viszonyok vizsgálata a Sanofi-Aventis cégnél. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló, SzIE ÁOTK, Budapest, 2005. január 24.
9. Gyórfy Andrea; Zsarnovszky Attila; Bartha Tibor, Kirley, Scott; Michael Belcher; Hazai Diána; Sótonyi Péter; Frenyó V. László: Az NTPDáz3 központi idegrendszeri lokalizációjának ultrastrukturális jellemzése kifejlett patkányok agyában. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló, SzIE ÁOTK, Budapest, 2008. január 21.
10. Horváth Krisztina, Gyórfy Andrea, Frenyó V. László, Bogenfűst Ferenc; Áprily Szilvia, Bartha Tibor: A pajzsmirigyhormonok szerepe különböző termelési paraméterekkel rendelkező lúdhibridek anyagcseréjének szabályozásában, Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló, SzIE ÁOTK, Budapest, 2008. január 21.
11. Kovács BM, Toussaint MJ, Gruys E, Fábíán IB, Szilágyi L, Janan J, Rudas P.: Evaluation of goose serum amyloid A acute phase response by enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Vet Hung.* 2007 Sep;55(3):349-57.

12. Kulcsár M, Jánosi S, Lehtolainen T, Kátai L, Delavaud C, Balogh O, Chilliard Y, Pyörälä S, Rudas P, Huszenicza G. Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. *Domest Anim Endocrinol.* 2005 Jul;29(1):214-26. Review.
13. Rudas P, Rónai Z, Bartha T.: Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2005 Jul;29(1):88-96. Epub 2005 Apr 7. Review.
14. Salvatore, D.; Bartha, T.; Larsen, P.R.: The guanosine monophosphate reductase gene is conserved in rats and its expression increases rapidly in brown adipose tissue during cold exposure. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: (47) 31092-31096
15. Sayed-Ahmed A, Abd-Elmaksoud Ahmed, S Ebada Mohamed, Shoaib M B, Bartha T.: Localization of leptin and leptin receptor in the seminal vesicle and prostate gland of Adult rat. *Acta Vet Hung.* 2008, közlésre benyújtva
16. Sayed-Ahmed, A.; Elm, Elmorsy, S.; Rudas, P.; Bartha, T.: Partial cloning and localization of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the Egyptian water buffalo. *Domestic Animal Endocrinology*, (2003) 25: (3) 303-314
17. Sayed-Ahmed A, Kulcsár M, Rudas P, Bartha T.: Expression and localization of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow. *Acta Vet Hung.* 2004;52(1):97-111.
18. Sayed-Ahmed A, Rudas P, Bartha T.: Partial cloning and localization of leptin and its receptor in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Vet J.* 2005 Sep;170(2):264-7.
19. Sayed-Ahmed A, Rudas Péter, Bartha Tibor A leptin hormon expressziója különböző fajú kérődzők egyes szöveteiben. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2004 126. 589-597
20. Somogyi Virág, Gyórfy Andrea, Horváth Krisztina, Kiss Dávid, Zsarnovszky Attila, Frenyó V. László, Bartha Tibor: A májbeli pajzsmirigyhormon-aktiválás sajátosságai csirkében. *Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Debrecen, 2008. június 4-6.* (Absztract elfogadva)
21. Somogyi Virág, Zsarnovszky Attila, Gyórfy Andrea, Bartha Tibor, Frenyó V. László: Primer idegsejt-tenyészet létrehozása és tesztelése ösztrogén- és pajzsmirigy hormonok receptor-interakcióinak és kereszt-aktiválásának vizsgálatára. *Állatorvos-tudományi Bizottsága Beszámoló*, 2008. 35 (1) 8.
22. Zsarnovszky A, Földvári EG, Rónai Z, Bartha T, Frenyó LV. Oestrogens in the mammalian brain: from conception to adulthood--a review. *Acta Vet Hung.* 2007 Sep;55(3):333-47. Review.
23. Zsarnovszky Attila, Gyórfy Andrea, Bartha Tibor, Horváth Krisztina, Somogyi Virág, Kiss Dávid, Frenyó V. László Az NTPDáz3 morfológiai és funkcionális jellemzése nőivarú patkányok hypothalamusában *Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Debrecen, 2008. június 4-6.*