

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék

**KISMÉRETŰ AGYSZÖVET-MINTÁK MITOKONDRIÁLIS
METABOLIZMUSÁNAK VIZSGÁLATI MÓDSZERE, ÉS
ANNAK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE**

Készítette:

Knyihár Viktória

Témavezető:

Kiss Dávid Sándor, tanszéki munkatárs

Dr. Tóth István, tanszéki munkatárs

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
Irodalmi áttekintés	4
Homogenizálás	4
Sejtfractionálás centrifugálással	6
Differenciálfractionálás	6
Gradiensfractionálás	7
Gradiensfractionálás szacharózzal	8
Gradiensfractionálás Ficollal	10
Gradiensfractionálás Percollal	11
Mitokondriális légzésmérés	13
Problémafelvetés	14
Mintaméret	14
Szöveti összetétel	14
Homogenizálás	15
Percollgradiens létrehozása	15
A gradiensrétegek viselkedése a centrifugálás során	16
A centrifugálás paraméterei a gradiensfractionálás során	16
A gradiensfractionálás során létrejött frakciók láthatósága	16
A gradiensfractionálás során létrejött frakciók elkülönített kinyerése	17
A Percoll eltávolítása a mintákból	17
Az alfrakciók minőségének ellenőrzése	17
Célkitűzés	18
Anyagok és módszerek	19
Kísérleti állatok	19
Előkészületek, az agy eltávolítása, a minta kinyerése	19
Homogenizálás	21
A Percoll-törzsoldat elkészítése	21
A mitokondriumok izolálása, fractionálás	21
Mitokondriális légzésmérés	22
Elektronmikroszkópia	24
Eredmények és megvitatásuk	26
Mintaméret	26
Szöveti összetétel	26
Homogenizálás	26
Percollgradiens létrehozása	27
A gradiensrétegek viselkedése a centrifugálás során	27
A centrifugálás paraméterei a gradiensfractionálás során	27
A gradiensfractionálás során létrejött frakciók láthatósága	29
A gradiensfractionálás során létrejött frakciók elkülönített kinyerése	29
Percoll eltávolítása	29
A frakciók minőségének ellenőrzése	30
Elektronmikroszkópos vizsgálatok	30
Mitokondriális légzésmérés	31
Megbeszélés és munkánk tudományos értéke	35
Összefoglalás	36
Summary	37
Köszönetnyilvánítás	38
Irodalomjegyzék	39

Bevezetés

A hipotalamusz számos élettani folyamat szabályozásáért felelős agyterület. Ezen élettani szabályozó folyamatok közé tartozik többek között a homeosztázis fenntartása, az autonóm idegrendszer működésének ellenőrzése, az agyalapi mirigy hormontermelésének szabályozása, az oxitocin- és a vazopresszin szekréció, a testhőmérséklet, a táplálék és a víz felvételének szabályozása, továbbá hatással van a cirkadián ritmusra, a magatartásra, és az érzelmekre is. Az előzőek mellett fontos szerepet tölt be az egyes szaporodásbiológiai folyamatok irányításában is, melynek pontosabb megismerésében a jelen dolgozatban bemutatott módszer a későbbiekben sokat segíthet. Az Élettani és Biokémiai Tanszéken már régóta foglalkozunk az ivari ciklust befolyásoló egyes idegi tényezők kutatásával. Ezen kutatások során felmerülő technikai kérdések és problémák szükségessé tették a korábban is ismert módszerek finomításán és átdolgozásán keresztül egy új eljárás kidolgozását.

Szövetteni módszerekkel már régóta képesek vagyunk kisebbnél kisebb agyterületek, sőt egyes sejtek vagy akár sejtalkotók vizsgálatára is, azonban ez nem ad kielégítő választ a sejtek, illetve egyes agyi magvak működéséről. Ezzel szemben a működésekre irányuló élettani vizsgálatoknak gátat szabnak az egyes területek méretei, jelenleg például nem tudjuk az egyes sejtekben lezajló energiaháztartást befolyásoló mechanizmusokat kellő pontossággal modellezni. Ez a sejt szintű megismerés kiemelkedő fontosságú lenne különböző szabályozó folyamatok megismerésében, ugyanis a neuronok, és ezáltal az egyes agyi magok működése erősen függ a sejt aktuális energiaszintjétől. A jelen dolgozatban bemutatott módszer lehetővé teszi az eddigieknél kisebb méretű agyi minták egyedi vizsgálatát, és az így kapott eredményekből pedig következtetni tudunk az adott területen található sejtek illetve szinapszisok (szinaptoszóma frakció) energiaellátottságára. Az agyi magok szintjén meghatározott energiaszintekből pedig hasznos információkat tudunk levonni az anatómiai-szövetteni vizsgálatokkal meghatározott idegi pályák működéséről.

Irodalmi áttekintés

Az elmúlt évtizedekben az egyes sejtek energiaállapotának vizsgálatára több módszert is kidolgoztak. Egyik ilyen módszer az úgynevezett mitokondriális respirációs ráta (*mrr*) mérése. Az *mrr* segítségével megállapítható az adott mintában található mitokondriumok aktivitása, és mivel a mitokondriumok a sejt fő ATP (adenozin-trifoszfát) termelő sejtalkotói, az aktivitásuk összefügg a sejt aktuális energiaszintjével. Az említett módszer hátránya, hogy a mérés során viszonylag nagy mennyiségű és funkcionálisan is intakt mitokondriumra van szükség. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy mitokondriumban gazdagabb sejteknél (pl.: máj, agykéregből származó minta, ahol a fehérállomány nem jelentős) kisebb, míg mitokondriumban szegényebb sejteknél nagyobb szövetdarabra van szükség. A mitokondriumok épségéről nem elég mikroszkópos vizsgálatokkal meggyőződni, ugyanis több, a szervezetben is megtalálható anyagról is ismert, hogy károsítani képesek a mitokondriumokban lezajló energiatermelő folyamatokat. Ezek az anyagok a minta nem megfelelő előkészítése során károsítják az elektronmikroszkóppal egyébként épnek tűnő mitokondriumokat, így a mintánk *mrr* mérésre alkalmatlan lehet. Kiemelkedően fontos tehát a minta megfelelő előkészítése.

Az irodalmi előzmények, illetve saját előkísérleteink alapján a Percoll (GE) alapú tisztítás mellett döntöttünk. A következőkben összefoglaljuk a döntésünk meghozatalában szerepet játszó legfontosabb irodalmi háttérinformációkat, ami a folyamat pontosabb megismerésében nyújt segítséget.

Homogenizálás

Szubcelluláris sejtorganellumok kinyerése érdekében a szövetmintánkat először megfelelően homogenizálni kell. A homogenizálás során a nagyobb méretű szövetminta feldarabolásra kerül, ezt követően pedig a sejtmembránt és – amennyiben növényi sejtről van szó – a sejtfalat fel kell törni. Ez a lépés a sejt szöveti környezetétől függően erőteljes vagy kevésbé erőteljes eljárást igényel, és több módon kivitelezhető: mechanikai úton, ultrahangos kezeléssel, magas nyomás alkalmazásával, de egyéb módszerek is használhatók (detergensek, enzimatis bontás, hipoozmotikus sokk, fagyasztás-olvasztás) (Burden, 2008). Ezek a módszerek eltérően károsítják a sejtalkotókat, célunk a mérésünkhöz legmegfelelőbb módszer kiválasztása volt.

Az ultrahangos eljárás alapja a kavitáció jelensége. Az ultrahang gyorsan váltakozó nyomáscsökkenést és nyomásnövekedést hoz létre a folyadékban. A nyomáscsökkenés

következtében az intracelluláris folyadék felforr, benne apró gőzbuborékok képződnek, majd a nyomás növekedésével összeroppannak, eltűnnek. Az összeroppanó buborékok lokálisan igen nagy energiasűrűséget hoznak létre, és ezek a kis robbanások károsítják a sejtek burkát (Dunkley *et al.*, 1988; Zheng *et al.*, 1990).

Magas nyomással történő homogenizálás esetén a sejteket nagy erővel átáramoltatják egy nagyon szűk csatornán vagy nyíláson, így a sejtet mechanikus úton tárják fel. Ezt az eljárást több éve használják mikrobiális sejtek (pl. Gram-pozitív baktériumok) feltárására, továbbá magas hőmérséklettel együtt alkalmazva sterilizálást is lehet e módon végezni.

A mechanikai úton történő homogenizálás során mechanikusan mintegy felszakítjuk a sejthártyát, így szabaddá téve a sejtalkotókat. Ezen módszerek közül az egyik legegyszerűbb és legelterjedtebb az úgynevezett potteres feltárás. A Potter-Elvehjem típusú homogenizátor egy vastag falú üvegcsőből és egy üvegből vagy teflonból készült dugattyúból áll. A dugattyú kézzel vagy motorral forgatható az üvegcsőben, ezáltal a cső fala és a dugattyú közé kerülő szövetdarabok szétkenődnek, a sejtek szétroncsolódnak, így elérhetővé válnak a szubcelluláris organellek. A megfelelő méretű homogenizátor kiválasztásával lehetőség van a sejt roncsolására anélkül, hogy a számunkra fontos mitokondriális frakciók károsodnának (Kristian, 2006).

Ezen eljárás során a membránok többsége (beleértve a plazmamembránt és az endoplazmatikus retikulumot) darabokra törik, azonban ezek a membrándarabok hajlamosak azonnal összekapcsolódni egyéb közeli membránrészekkel. Ez a folyamat vezet ahhoz, hogy a feltöredezett membránok összezáródnak és vezikulákat képeznek, amibe bezáródhatnak az egyes sejtalkotók (mitokondriumok, a Golgi-készülék, lizoszómák és peroxisómák). Az idegsejtek homogenizálása során az axonvégek, amelyek mitokondriumban nagyon gazdagok, különösen hajlamosak ilyen vezikulák képzésére. Az így kialakult hólyagokat szinaptoszómáknak hívjuk. Az egyes szabad sejtalkotók (sejtmag darabok, endoplazmatikus retikulum, mitokondriumok, Golgi-apparátus), illetve a sejtmembrán kettőzettel körülvett sejtalkotók együtt egy sűrű, zavaros folyadékot alkotnak, amely számos sejtorganellel tartalmaz különböző mérettel, töltéssel és sűrűséggel. A megfelelő méretű homogenizátor, illetve megfelelő homogenizáló puffer használata esetén az egyes komponensek fizikailag intaktak maradnak, és javarészt megtartják eredeti biokémiai tulajdonságaikat (Raff *et al.*, 2002). Ezzel alkalmasak maradnak az általunk is elvégezni kívánt *mrr* vizsgálatra.

Sejtfractionálás centrifugálással

A homogenizálást követően kialakult különböző komponensek közül el kell különíteni a számunkra fontos részeket. Ezt legegyszerűbben a minta centrifugálásával érhetjük el. A mitokondriális frakciók (szabad és vezikulákba zárt) elkülönítésére több protokoll is ismert a szakirodalomban. Ezeket két fő típusba sorolhatjuk. Az első sűrűséggradiens kialakítása nélkül, pusztán a lépések közötti fordulatszám (rotation per minute; rpm) változtatásával különíti el az eltérő sűrűségű frakciókat (differenciálfrakcionálás). A másik módszer során a centrifugálási sorban egy vagy több helyen megjelenik egy sűrűség gradiens is, ami lehetővé teszi az egyes sejtalkotók precízebb szétválasztását. Ezt a módszert gradienscentrifugálásnak hívjuk. A sűrűséggradiens kialakítására több anyag is használható: pl. szacharóz, Ficoll, Percoll.

Fontos itt megemlíteni, hogy egyéb tisztítási módszerek is ismertek (pl immunaffinitáson alapuló frakcionálás), amelyek adott esetben nagyobb tisztaságú frakciót eredményezhetnek, azonban időigényességük és anyagköltségük miatt általunk nem használhatók (Richardson-Luzio, 1986). Itt most eltekintünk ezek ismertetésétől.

Differenciálfrakcionálás

Ez az eljárás a sejt összetevőit méret és sűrűség szerint választja szét: általában a nagyobb részek rendelkeznek a legnagyobb ülepedési rátával és mozognak a leggyorsabban. A nagyméretű összetevők, mint a sejtmagok, viszonylag alacsony sebességen lesüllyednek a centrifugacső aljára és üledéket formálnak, kissé magasabb sebesség esetén a mitokondriumok válnak ki, és még magasabb sebességgel és hosszabb ideig tartó centrifugálással először a kisebb vezikulák, majd a riboszómák gyűjthetők össze.

Az így kinyert frakciók nem tiszták, nagy mennyiségben tartalmaznak összetevőket más frakciókból, azonban elmondható róluk, hogy legnagyobb arányban a célzott sejtalkotók vannak bennük jelen. A szennyező elemek többsége eltávolítható az üledék újrassuszpendálásával és a centrifugálás többszöri megismétlésével (Raff *et al.*, 2002).

Korábban, amikor célul tűztük ki az *mrr* mérését idegsejteken, szükségessé vált egy megfelelő tisztaságú mitokondriális frakció kinyerése. Ennek érdekében a fent említett elv és korábbi szakirodalmi adatok (Rosenthal *et al.*, 1987) alapján kidolgoztunk egy módszert a mitokondriumok kinyerésére. A módszer nagyvonalakban a következő lépésekből épül fel. A homogenizálás után nyert mintát kis fordulatszámon lecentrifugáljuk, így megszabadulunk a nagyméretű törmelékektől (sejtmagok, membrándarabok, Golgi-készülékek, sima és durva felületű endoplazmatikus retikulum, egész sejtek). Ezután a felülúszót továbbcentrifugáljuk

nagyobb fordulatszámon, az üledéket megtartjuk, újraszuszpendáljuk, a centrifugálást megismétljük. Végül egy finomító centrifugálás után eldobjuk a felülúszót, az üledéket újraoldjuk, és ebben az oldatban megtalálhatók a számunkra szükséges mitokondriumok (Graham, 2001; Shaki *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009).

Az előkísérleteink során azonban kiderült, hogy ez az eljárás nem alkalmas az általunk tervezett *mrr* mérésekre, ugyanis a végeredményként kapott minta nem megfelelően tiszta, és az így nyert *mrr*-görbék a szakirodalomban leírtaktól nagymértékben eltértek, és az eredmények inkonzisztensek voltak. Ennek az lehetett az oka, hogy a korábbi protokollok a szakirodalomban nem idegi eredetű sejtekre, vagy viszonylag nagy sejtsűrűséggel rendelkező agykéregből származó mintákra voltak kidolgozva. A mi mintánk a hipotalamuszból származik, ahol nagy mennyiségű fehérállomány veszi körül az egyes magokat, így nagyobb mértékű a szennyezés. A differenciálcentrifugálással nyerhető úgynevezett „durva” mitokondrium frakció, ami a mitokondriumokon kívül az azokkal megegyező méretű alkotókat is tartalmazza, például peroxisómákat, lizoszómákat, szinaptoszómákat, mielin- és membrántörmelékeket. A módszer hátránya továbbá, hogy viszonylag nagy veszteséggel alkalmazható, amit a kiinduló mintaméret megválasztásakor figyelembe kell vennünk. A patkány hipotalamusza viszonylag kisméretű, szöveti összetétele pedig heterogén. Ezek az anatómiai tények tovább korlátozzák az egyszerű differenciálcentrifugálás használatát.

A megfelelő tisztaságú mitokondriális frakció elérése érdekében szükségessé vált a módszer finomítása, amely egyúttal kisebb agyi területek különálló vizsgálatát is lehetővé teszi.

Gradiensfrakcionálás

A széles körben alkalmazott differenciálcentrifugálással elkülönített durva frakciók a fent leírtak alapján olyan sejtalkotókat tartalmaznak, melyek ülepedési tulajdonságai (ülepedésük sebessége) megközelítőleg azonosak, minőségileg azonban különböznek. A legtöbb ma alkalmazott biokémiai és élettani vizsgálat azonban megköveteli a differenciálcentrifugálással nyert frakciók további tisztítását, azaz a sejtorganellumok és plazmafrakciók valóban minőségi elkülönítését. E tisztítási procedúra kivitelezhető az ún. gradiensfrakcionálással, melynek során a szeparálócsőbe egy adott vivőanyagból (gradiensképző) hígítással létrehozott különböző sűrűségű rétegeire viszik a szétválasztandó mintát. Az így előkészített centrifugálás során minden összetevő addig süllyed a szeparáló közegben, amíg el nem éri a sajátjával megegyező sűrűségű közeget. Ezen a ponton az adott sejtalkotók sűrűségüket tekintve egyensúlyba kerülnek a szeparáló közeggel (egyensúlyi ülepedés), ott „fennakadnak”

és lebegve maradnak a centrifugálást követően, ami lehetővé teszi elkülönített kiemelésüket. A differenciálcentrifugálással ellentétben tehát, a szétválogatódás alapja itt a sejtalkotók sűrűsége (azaz fajsúlya), nem pedig ülepedési karaktere vagy mérete.

A gradiensfrakcionálás két módon kivitelezhető: folyamatos vagy lépcsőzetes gradiens létrehozásával. A lépcsőzetes gradiens kialakítása során a szeparálóközeg eltérő sűrűségű oldatait rétegezzük egymásra, a legsűrűbbtől haladva a leghígabb (0%) felé. A centrifugálást követően a különböző sűrűségű rétegek határfelületén egy-egy élesen elkülönülő sáv jelenik meg, amelyet az adott réteg sűrűségétől kisebb fajsúlyú részecskék alkotnak.

A folyamatos gradiensre a sűrűség folytonos, finom változása jellemző, amely a csőben fentről lefelé növekszik. A folyamatos gradiens végtelen számú határfelülettel rendelkezik, a lépcsőzetes gradiens alkalmazása során előforduló néhány, jól elkülönülő határfelülettel ellentétesen. Ezáltal az azonos sűrűségű komponenseket magába foglaló sáv pontosan ott tűnik fel, ahol a sejtek sűrűsége a gradienst létrehozó médium sűrűségével megegyezik.

Gradiensfrakcionálás szacharózzal

A vizsgálni kívánt frakciók natív biokémiai és még inkább élettani tulajdonságainak megőrzése érdekében számos szeparálómédiumot fejlesztettek ki. A sejtfrakcionálás kidolgozásának hőskorából E. G. Gray és V. P. Whittaker nevéhez fűződik a sejtalkotók már igen hatékony elválasztását lehetővé tevő szacharóz alapú gradiensfrakcionálás (Gray-Whittaker, 1960). Eljárásuk lebecsülhetetlen előnye az egyszerű, gyors és speciális anyagokat nem igénylő kivitelezhetőség. Módszerük elméleti háttere máig alapját jelenti a neuronális mitokondriumokat és idegvégződéseket tartalmazó frakciók elkülönített kinyerésének (Gray-Whittaker, 1962), aminek okán azzal mi is részletesen foglalkoztunk.

A különböző mitokondriális frakciók kinyerése — ennek alapján — két lépcsőben történik. Első lépésben a durva mitokondriális frakció a 0,32 M-os szacharóz oldatban homogenizált minta fentebb leírt differenciálcentrifugálásval áll elő. Az így kapott, szomális és szinaptoszomális mitokondriumokat, valamint sejtörmeléket egyaránt tartalmazó heterogén 0,32 M-os frakciót egy 0,8 és 1,2 M-os szacharóz oldatból kialakított lépcsőzetes sűrűség-gradiensre ültetjük, majd asztali centrifugában centrifugáljuk. Ennek hatására a szacharózgradiensben a minta három rétege alakul ki:

A) a 0,32 és 0,8 M-os szacharóz oldatot tartalmazó rétegek határán, amely főként membrán és velőshüvely törmelékét (mielin) tartalmaz,

B) a 0,8 és 1,2 M-os szacharóz oldatot tartalmazó rétegek határán, amelyben túlnyomóan lefűződött idegvégződéses találhatók, valamint

C) az 1,2 M-os szacharóz oldatot tartalmazó réteg alatti üledék a mitokondriumokkal.

Gray és Whittaker eljárásnak további — esetünkben még fontosabb — hátránya az, hogy az egyes alfrakciók ozmotikusan szélsőséges viszonyokat teremtenek a centrifugálás során azokba megérkező sejtalkotóknak. Míg *in vivo* a mitokondriumokat körülvevő intracelluláris tér ozmolalitása megközelítőleg 280-300 mosmol/kg értékek között változik, addig Gray és Whittaker módszerében a 320 mosmol/kg-os oldatban homogenizált sejtalkotók azoknál jelentősen hiperozmotikusabb 800 és 1200 mosmol/kg-os rétegekbe kerülnek a preparálás során. Az ilyen mérvű ozmolalitás-változás elkerülhetetlenül megváltoztatja sejtorganellekumok térfogatviszonyait és ezzel élettani állapotát. A mi kutatásainkban kulcsfontosságú a szomális és szinaptoszomális mitokondriumok az azok izolálását megelőző állapotának megőrzése, élettani paramétereik mind pontosabb felderítése. Az ilyen mértékű ozmolalitás-változás okozta térfogatcsökkenés olyan nem kívánt folyamatokat indíthat el (Ernster-Schatz, 1981), melyek tökéletesen elfedhetik az általunk vizsgálni kívánt paramétereket. Gray és Whittaker módszere tehát egy az egyben nem nyújt lehetőséget a *mrr*-re alkalmas frakciók elkülönítésére.

E módszer alkalmazása tovább finomított és az adott kísérletekhez igazított formában évtizedeken át meghatározó volt a mitokondriális frakciók egymástól való elválasztását igénylő vizsgálatokban (Grove *et al.*, 1973; Bretz *et al.*, 1974; Goldberg, 1971; Babitch, 1973; Rosenthal *et al.*, 1987). A módszert továbbfejlesztve Hajós Ferenc 1975-ben kidolgozott egy olyan eljárást, amellyel patkány agykéregből nagy tisztaságú szinaptoszóma frakció vonható ki (Hajós, 1975). Ez a metódus még Gray és Whittaker módszerénél is gyorsabb (összességében hozzávetőlegesen 80 perc), szintén nem igényel ultracentrifugát, legnagyobb érdeme azonban, hogy igen kismértékű a kinyert frakciók más struktúrákkal való szennyezettsége.

A már említett előnyeivel szemben azonban, az élettani vizsgálatok szempontjából több alapvető kikötésnek nem tesz eleget. A szacharóz alapú gradiens rétegzése a később tárgyalt szeparáló médiumokétól elmarad. A réteghatárok a rétegzés és a centrifugálás során is viszonylag könnyebben elmosódnak, a rétegek részben egymásba csúszhatnak. Az ilyen gradiens mentén az alfrakciók elválása tökéletlen, azok kondenzálódása hiányt szenved, aminek következtében az általunk célzott *mrr*-mérést nagymértékben befolyásoló lipidtípusú sejttörmelék (Wojtczak-Schönfeld, 1993) maradhat a mérésre szánt alfrakciókban. E nem

kívánatos jelenséget elsősorban a minta méretének növelésével lehet arányosan csökkenteni, de elégséges mértékben még a legprecízebb rétegzéssel és a befolyásoló paraméterek (hőmérséklet, centrifuga beállítása) finomhangolásával sem lehet kiküszöbölni.

Gradiensfrakcionálás Ficollal

A szacharóz gradiens hátrányainak kiküszöbölésére az elmúlt évtizedekben számos alternatív módszert fejlesztettek ki, amelyek során speciális szintetikus anyagok segítségével választják szét az egyes frakciókat. Ezek a médiumok, mint például a Percoll és a Ficoll, kiválóan alkalmasak gradiensképzésre, segítségükkel lényegesen kisebb térfogatú gradiensrétegek is létrehozhatók és stabilan fenntarthatók. Ozmotikusan inaktívak és messzemenően vízdékonyak, ami lehetővé teszi a kívánt, a sejtalkotókat nem károsító ozmotikus viszonyú gradiensoldatok létrehozását. Használatukkal tiszta sejt- és szubcelluláris frakciók nyerhetők aránylag egyszerűen és gyorsan.

A szacharóz kiváltására elsőként a Ficoll elnevezésű, magas moláris tömegű, nem toxikus, töltéssel nem rendelkező hidrofil poliszacharid került bevezetésre (Abdel-Latif, 1966; Cotman-Matthews, 1971). A szacharóz és epiklorohidrin ko-polimerizációjával előállított szintetikus polimer a minőségét hosszú ideig megőrzi, közönséges laborkörülmények között sokáig tárolható, a gradiensfrakcionálási eljárásokhoz pedig a belőle készített 2-7 nm átmérőjű részecskék formájában kerül forgalomba.

A Ficollt leggyakrabban a vér alakos elemeinek, főként fehérvérsejtek (Noble-Cutts, 1967; Almeida *et al.*, 2000) és más immunsejtek (Williams *et al.*, 2012) elkülönítésére használják. A módszerrel sérülésmentes és kiváló minőségű limfociták nyerhetők (Bennett-Breit, 1994).

A szacharózzal szembeni előnyös tulajdonságai mellett (ld. fent) a Ficoll tartalmú gradiensoldatok elkészítése és egymásra rétegzése a szacharózból előállítottakhoz képest hosszabb időt vesz igénybe, a centrifugálási idő (bár kedvezően alacsony gyorsuláson történik) pedig lényegesen megnyúlik a polimer nagy viszkozitása miatt. Irodalmi adatok és szóbeli közlés alapján egyes laboratóriumok használnak Ficollt az általunk is tervezett *mrr*-re szánt mitokondriumfrakciók előállítására (Rossignol *et al.*, 2000; Starkov-Wallace, 2002), az így kapott frakcióminták azonban más tanulmányok szerint nem alkalmasak egyes szinaptoszomális funkciók mérésére (Whittaker, 1993).

Gradiensfrakcionálás Percollal

A Percoll egy olyan speciális szilikonkolloid, amely szintén lehetővé teszi a frakcionálás folyamán az egyes sejtalkotók sűrűség alapján történő szeparálását. Alkalmazásának alapja, hogy a frakcionáló médium sűrűség tartománya felöleli a minta minden alkotórészének sűrűségét, így az összes partikula a centrifugálás során addig süllyed a közegben, amíg a saját sűrűsége meg nem egyezik az azt körülvevő közeg sűrűségével, azaz amíg el nem éri az izopiknikus pontját. Ez a típusú frakcionálás mérettől függetlenül, kizárólag sűrűség alapján különíti el az egyes részecskéket. Mivel munkánk során a Percoll találtuk a számunkra legmegfelelőbb szeparálási médiumnak, a következőkben a többenél részletesebben elemezzük tulajdonságait.

A Percoll fizikai tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c).

Összetétel	szilícium kolloid nem dializálható polivinil-pirrolidinbe (PVP) csomagolva
Sűrűség	1,130 +/- 0,005 g/ml
Vezetőképesség	1,0 mS/cm
Ozmolalitás	<25 mosmol/kg H ₂ O
Viszkozitás	10 +/- 5 cP 20 °C-on
pH	9.0 +/- 20 °C-on
Refrakciós index	1,3540 +/- 0,005 20 °C-on
Részecskék átmérője	15-30 nm
PVP-tartalom	1-2%

1. táblázat. A Percoll fizikai tulajdonságai

A Percoll viszkozitását ionösszetételének állandósága biztosítja, és alacsonyabb a fiziológiás só koncentrációjú oldatokban (pl. 0,15 M NaCl), mint például vízben vagy 0,25 M-os szacharóz oldatban. Ennek hatására a gradiensek kialakulása centrifugálással sokkal gyorsabban végbemegy 0,15 M-os NaCl-oldat esetében, mint a 0,25 M-os szacharóz oldatban.

A Percollt 23% (w/w)-os, vízzel alkotott kolloid oldatban alkalmazzák, amelynek sűrűsége 1,130 +/- 0,005 g/ml. Segítségével 1,0-1,3 g/ml sűrűségű gradiensek nyerhetők ki, és minden 60 S érték feletti szedimentációs koefficienssel rendelkező részecske a Percoll gradiens szerint sávokba rendeződik (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c).

A Percoll pH-ja körülbelül 9, amely állítható pH5,5-től pH10-ig anélkül, hogy bármilyen változás állna be fizikai tulajdonságaiban. Ha a pH azonban 5,5 alá csökken, gél képződés léphet fel, amelyet ezen kívül eredményezhet divalens kationok jelenléte is. Az utóbbi folyamatot a hőmérséklet emelkedése fokozza (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c).

A Percollra nagyon alacsony ozmolalitás jellemző ($<25 \text{ mosmol/kg H}_2\text{O}$), ezért képes magával sűrűség-gradienst képezni jelentős ozmolalitás-gradiens létrehozása nélkül. Ez a tulajdonság lehetővé teszi, hogy izoozmotikus sűrűség-gradiensekkel dolgozhassunk fiziológiai körülmények között. Ez nagyon fontos, ha a preparáció során élő és ép sejtek vagy sejtalkotók kinyerése a cél (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c).

A szilícium maggal rendelkező Percoll részecskék igen nagy sűrűségűek ($2,2 \text{ g/ml}$) és egy átlagos hidratált részecske $29\text{-}30 \text{ nm}$ méretű $0,15 \text{ M}$ -os nátrium-klorid, és 35 nm $0,15 \text{ M}$ -os szacharóz oldatban. Így amikor a Percoll oldatot $10\,000 \times g$ felett, ferde fejű rotorban centrifugáljuk, a részecskék süllyedni kezdenek, ez azok egyenlőtlen eloszlását eredményezi és létrejön a sűrűség-gradiens. Mivel a Percoll egy polidiszperz kolloid, alkotórészei különböző mértékben süllyednek, ezzel létrehozva egy nagyon finom gradienst. E gradiens elektronmikroszkópos vizsgálatai kimutatták, hogy a cső alján helyezkednek el a nagyobb méretű részecskék. A gradiensek izometrikusan alakulnak ki (fent helyeződnek a kevésbé sűrű, alul a sűrűbb rétegek) és ez idővel meredekebbé válik. A Percoll magas g -erőn történő és az előírtnál hosszabb ideig tartó centrifugálása azt eredményezi, hogy a kolloidból üledék alakul ki. Fontos megjegyezni, hogy amennyiben kilengő-típusú rotort használunk a centrifugáláshoz, a kolloid gyorsan lesüllyed és üledéket alkot, és nem hozza létre a megfelelő gradienst, ezért fontos a fix rotorú centrifuga alkalmazása (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c).

A kolloid nem oszlik szét idővel, így nagyon stabil gradienseket biztosít, ezáltal mind a folyamatos és a lépcsőzetes gradiensek hetekkel a kísérlet előtt elkészíthetők (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c).

A Percoll használata számos előnnyel jár a régebbi, hagyományos frakcionálási módszerekkel szemben. Az alacsony ozmolalitás és az izotónia biztosítása hozzájárul mérésünk sikerességéhez. Továbbá, ez az eljárás igen gyors, így csökkenti a káros kémiai változások előfordulásának mértékét. Ezen kívül nincs szükség ultracentrifugára és az összes szennyező tényező eltávolításra kerül mintánkból.

A percollos frakcionálás vált a legalkalmasabb módszerré a mitokondriális méréseinkhez szükséges tisztaságú mitokondriális frakciók kinyerésére (Kristian, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Mitokondriális légzésmérés

Ahogy arról a bevezető részben röviden szót ejtettünk, kutatásaink célpontjában az endokrin hipotalamusz reprodukzív folyamatokat szabályozó működése áll. E neuroendokrin szabályozó működések a mediobasalis hipotalamusz idegsejtcsoportjainak, illetve ún. neuronköreinek összehangolt működését feltételezik (Naftolin *et al.*, 2007). E komplex idegi mechanizmusok hátterében a szóban forgó neuronok aktivitásának szinkronizált fokozódása áll, amely az idegsejtek nyúlványainak és a perikarion vázát alkotó mikrotubulus-aktin szerkezet átépülésében, neurotranszmitterek termelésében, valamint az idegsejtek általános működéséhez szükséges fehérjék szintézisben nyilvánul meg. Ezen folyamatok mind igen energiaigényesek, azaz tetemes mennyiségű ATP bontásával járnak. A sejtek energiaellátását elsődlegesen a mitokondriumok biztosítják, az ATP újratermelésének kulcsfolyamatai — így a citromsavciklus és a terminális oxidáció — a mitokondriális mátrixban, illetve a belső membránrendszerbe épült elektrontranszport és ATP-szintetizáló fehérjekomplexeken keresztül valósul meg. Általánosan elmondható tehát, hogy a neuronok fokozott működését a mitokondriális ATP-termelés megnövekedése arányosan követi. Az ATP termelésének záró lépéseként az ATP-szintázon keresztül a mitokondrium mátrixába jutó protonok (hidrogén ionok) oxigénnel vízzé egyesülnek. Az így mutatkozó oxigénfogyás jól reprezentálja a vizsgált mitokondriumok és az azokat magába foglaló idegsejtek aktivitását is (Zsarnovszky *et al.*, 2009).

Laborunkban a mitokondriális oxigénfogyasztást platinaelektróddal ellátott Clark-típusú oxigénelektróddal (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) vizsgáljuk. A készülék mérőkamrája egy olyan kapillárison keresztül közlekedik a külvilággal, amely lehetőséget nyújt a biokémiai vizsgálatokban közismert légzésmódosítók által a légzési rátára kiváltott változások nyomon követésére is (Kiss *et al.*, 2009).

Hangsúlyoznunk kell, hogy jelen munkánk során egy olyan eljárás kidolgozása volt a cél, mely az általunk követett, de más kutatócsoportok részéről még ki nem dolgozott, kifinomult vizsgálati rendszerben az *mrr*-re legalkalmasabb minőségű mitokondriális frakció idő- és költséghatékony előállítását teszi lehetővé.

Problémafelvetés

A kutatócsoportnak a megfelelő módszer kifejlesztése során számos nehézséggel kellett szembenéznie. A minta kis mérete és szennyezettsége, a centrifuga és a centrifugacső kiválasztása, a rétegezés kivitelezése és nyomon követése, a frakciók begyűjtése, és a kimosás véghezvitele úgy, hogy közben a mitokondriumok megőrizzék életképességüket – ezen tényezők leküzdése és lépések megoldása jelentették a legfőbb problémákat a kutatás során.

Mintaméret

Az előkísérleteink során kiindulási alapként szolgáló protokollt (Rosenthal *et al.*, 1987b) eredetileg egereken való mitokondriális légzőmérésre használták, ahol egy mérés alatt egyszerre több (5-10) egyed megfelelő agyterületét együtt vizsgálták. Laborunk a korábbi, ovariális ciklust vizsgáló kísérleteit patkányokon végezte, így a kutatás folytatóságossága és az eredmények összehasonlíthatósága megkövetelte, hogy továbbra is e fajon folytassuk a vizsgálatokat.

A neuroendokrin vizsgálatoknál figyelembe kell venni, hogy a patkány az egérrel szemben renyhébb agyi anyagcserével rendelkezik, ami megköveteli az érzékenyebb, a vizsgálni kívánt paraméterek változást elmaszkírozni tudó mind élettani, mind metodikai tényezők kiszűrését. Vizsgálati rendszerünket ezen túlmenően a hipotalamikus aktivitás egyedi változásainak nyomon követésére kívántuk kidolgozni, ami a szövetminták méretének jelentős csökkenését vonta maga után. A mérési egység egy állat hipotalamusza kellett, hogy legyen. Szükségtelen hangsúlyozni, hogy a mintaméret milyen nagy mértékben megszabja a vizsgáló módszerek kivitelezését, és hogy a minta méretének csökkentése lényegesen érzékenyebb mérési módszert tesz szükségessé, hiszen a kis mennyiségű mintával való munkát aránytalanul megnehezítik a mintavételi eljárás pontatlanságából eredő esetleges „szennyeződések” és a minta feldolgozása során fellépő veszteségek. Az általunk bevezetett protokollban e tekintetben felmerülő nehézségek megoldására a szakirodalomban mindezekig nem találtunk példát.

Szöveti összetétel

A hipotalamusz műtéti izolálhatósága más, gyakran kutatott központi idegrendszeri területekkel (agykéreg, hippokampusz) ellentétben — lévén határai nehezebben körvonalazhatóak — sokkal nagyobb körütekintést igényel. Kiemelése során alig elkerülhető, hogy mintánk a környező fehérállomány, a lágy agyburok, valamint az agyalapi mirigyhez

szorosan kapcsolódó gazdag érhálózat állományával ne „szennyeződjön”. Ezek a szövetelemek elsősorban foszfolipid összetételük miatt — mint ahogy erre előkísérleteink is rávilágítottak — jelentősen befolyásolják a mitokondriális légzési láncban lezajló biokémiai folyamatokat, elfedve a mitokondriumok valós élettani állapotát. Vizsgálómódszerünk kidolgozása során számba kellett vennünk azokat a módszertani lehetőségeket (a szövetminta kiemelésénél is, de elsősorban a frakcionálás során), melyek felhasználásával a leginkább csökkenthető a mitokondriális mintánk nem kívánt lipidstruktúrákkal való szennyeződése.

Homogenizálás

A kis méretű minták feldolgozásának első lépését jelentő homogenizálásra nagy figyelmet kellett fordítanunk a sejtek mind alaposabb feltárása és a homogenizálást követő visszanyerése érdekében. A homogenizálás folyamán fontos volt a minták kellően alacsony (4°C) hőmérsékleten tartása, hogy így megelőzzük az autolitikus folyamatok beindulását, és a lehető legalacsonyabb szintre csökkentsük a légzési lánc integritását befolyásoló enzimátikus és transzportfolyamatokat.

Percollgradiens létrehozása

A rétegzés kivitelezése során több kérdés is felmerült. Irodalmi adatokra és kísérletes eredményekre támaszkodva meg kellett állapítani az egyes sejtalkotók sűrűségét, hogy a gradiensrétegek sűrűségét ennek megfelelően beállítva az általunk vizsgálni kívánt mitokondriális frakciók megfelelően elkülönüljenek (Dunkley *et al.*, 1988; 2008). Figyelni kellett továbbá arra is, hogy a Percoll rétegek közötti sűrűségkülönbség elegendő-e ahhoz, hogy centrifugálás után azok egyben maradjanak. A Percoll-törzsoldat hígításával előálló oldatok sűrűségének pontos meghatározására korábban ún. markerrészecskék (Density Marker Beads, Sephadex™) voltak kereskedelmi forgalomban kaphatók. Ezek terjesztését azonban a közelmúltban jelentősen korlátozták, sajnos ma már gyakorlatilag nem beszerezhetők, ezért más módszerrel kellett meggyőződnünk a gradiensünk használhatóságáról.

A mintánk méretéből következően a Percollt a más kutatócsoportok által rutinszerűen használt 15-20 ml-es centrifugacsövek (Corning) helyett mikrocentrifuga-csövekbe (Eppendorf) kellett, hogy rétegezzük, így az egyes frakciók 2-3 ml helyett legfeljebb 0,5 ml-esek lehettek. Ennek kapcsán felmerült a kérdés, hogy a Percoll alkalmas-e gradiensképzésre ilyen kis mennyiségben, azaz, hogy nem nagyobb mérvű-e a keveredés, mint maga a réteg saját térfogata, valamint hogy kivitelezhető-e ilyen precíz rétegzés pipettával vagy pipettorral.

A rétegzéssel kapcsolatban továbbá kérdéses volt a rétegek felhordásának sorrendje: a sűrűbb rétegekre kerüljenek a mind hígabbak, avagy a hígabbak alá juttassuk be utólag a sűrűbbeket.

A Percoll-gradiens sikeres létrehozásához és visszanyeréséhez értelemszerűen nagy hangsúlyt kap a centrifugáláshoz használt centrifugacső formai kialakítása. Az általánosan elterjedt mikrocentrifuga-csövek vége egyenletesen kicsúcsosodó és lekerekített. Ez mindenképpen előnyös az oldatok vegyítése, illetve a (pipettával történő és ultrahangos) homogenizálás során. A gradiens létrehozása szempontjából – lévén a cső végében a térfogat a cső hosszával messze nem egyenletesen változik, illetve a cső fala e helyen változó vastagságú – nyilvánvalóan hátrányt jelent. Olyan mikrocentrifuga-csőre volt tehát szükségünk, melynek fala egyenes lefutású és arányosan rövid kúpos kialakítással csúcsban kihegyesedő. Elképzelésünk az volt, hogy ez a kialakítás majd lehetővé teszi egyrészt az egyes gradienseknek a térfogatukkal arányos felületű érintkezését, a jól nyomon követhető határfelületek létrehozását, másrészt a kúpos csúcsból sokkal könnyebben visszanyerhetők a várt kis mennyiségű frakciók.

A gradiensrétegek viselkedése a centrifugálás során

A gradiens létrehozásán túl a frakciók kinyerésének kulcsfontosságú záloga a gradiensréteg centrifugálás során való viselkedése, azok egymáshoz való esetleges elmozdulása, vegyülése. Mindebben a centrifugacső kialakításán kívül tekintettel kellett lenni a centrifuga működésére (gyorsítási és lassítási paraméterek változtatása, rotor kiképzése).

A centrifugálás paraméterei a gradiensfrakcionálás során

A Percoll-gradiens izometrikusan oszlik el, amennyiben megfelelő ideig és erősséggel (g-értékkel) végezzük a centrifugálást. Ha azonban túl hosszú ideig magas centrifugális erő hat rá, a kolloid kondenzálódik, és kemény üledéket formálva lesüllyed a centrifugacső aljára, lehetetlenné téve ezzel a frakciók elválását eredményező sűrűséggradiensek fennmaradását. Fontos megjegyezni, hogy abban az esetben, ha lengő rotorú centrifugában 10 000 x g fölött centrifugáljuk a Percollt, a kolloid szintén gyorsan lesüllyed, és nem alakítja ki a megfelelő gradienst. (Laurent *et al.*, 1980/a,b,c)

A gradiensfrakcionálás során létrejött frakciók láthatósága

A frakciók begyűjtésével kapcsolatban az a kétely merült fel, hogy ha ugyan a sejtalkotók a centrifugálást követően a megfelelő réteghatárra érkeznek, láthatóak és ezzel visszanyerhetők lesznek-e alfrakciók formájában kis mennyiségük ellenére.

A gradiensfrakcionálás során létrejött frakciók elkülönített kinyerése

Irodalmi adatokra nem tudván támaszkodni, próbakísérleteink során ki kellett dolgozni az egyes alfrakciók kinyerésének legeredményesebb módját. A frakciók kiemelése során elengedhetetlen fontosságú, hogy azok ne keveredjenek fel, és ne keveredjenek össze a szomszédos rétegek frakcióival. Ennek kivitelezésére szintén két módszert próbáltunk ki: (1) igyekeztünk eltávolítani a számunkra (sejttörmelékét tartalmazó) felesleges részt a mitokondriumokat és szinaptoszómákat tartalmazó rétegek tetejéről, vagy (2) a célfrakciót kiszívni a fölösleges felülúszó alól.

A Percoll eltávolítása a mintákból

Bár a Percoll az eddigi ismereteink alapján valamennyi forgalomban lévő gradiensképző szeparálóközeg közül a legkevésbé befolyásolja az élő rendszereket, a mintákból való eltávolításának fontosságához mégsem férhet kétség. A Percoll-kolloidok nagy fajlagos felületük, térkitöltő tulajdonságaik révén megakadályozhatják a *mrr*-mérés vizsgálatát azáltal, hogy gátolják a légzőmódosítók mitokondriumba történő bediffundálását és feltételezhetően a Clark-típusú elektród pontos működését (Garcia *et al.*, 2010), ezért a Percollnak mintáktól való elkülönítését a legkedvezőbb mérési feltételek biztosítása érdekében alapvetőnek tartottuk.

Az alfrakciók minőségének ellenőrzése

Vizsgálati rendszerünknek megfelelően a mintafeldolgozás teljes folyamatát olyan formában kellett elvégezni, hogy az annak révén kapott mitokondriális frakciók a lehető leginkább megőrizték életképességüket, illetőleg a minta kiemelését megelőző élettani állapotukat. Ennek ellenőrzésére elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk a gradiensfrakcionálással tisztított frakcióinkból, valamint próbaméréseket végeztünk az oxigénelektrod paramétereinek beállítása mellett. Mindkét esetben elmaradhatatlan volt a kapott eredmények más agyterületekről származó felvételekkel való összevetése. A frakcióminták elektronmikroszkópra történő feldolgozásával kapcsolatban egy további nehézség is felmerült: az általunk rutinszerűen *in vivo* szövetekből végzett procedúrát a frakcionálással kapott és állagában merőben eltérő tulajdonságú mintákhoz kellett igazítani.

Célkitűzés

Munkák során olyan módszert kívántunk kidolgozni, melynek segítségével megfelelő tisztaságú, *mrr*-mérésre alkalmas mitokondriális frakció nyerhető kisméretű agyszövet-mintákból. További munkánkhoz szükséges volt, hogy egy olyan protokoll álljon a rendelkezésünkre, melynek birtokában megbízhatóan vizsgálható a patkány, mint modellállat egyedenkénti hipotalamikus aktivitása a kutatási terveinknek megfelelően.

Az *mrr*-mérések mind hatékonyabb, az élő állapotnak leginkább hű kivitelezése érdekében a szakirodalomban ismerttetett eljárások szövetfeldolgozás szempontjából történő finomítása és az eljáráshoz szükséges idő lehető legrövidebbre való csökkentése alapkövetelményünk volt.

Továbbá célul tűztük ki, hogy az egyedi hipotalamuszokból kinyert, idegvégződésekhez kötött és a sejtestbéli mitokondriumok légzési tevékenysége szeparáltan vizsgálható legyen.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

A kísérleteinkben Wistar fajtájú, szabályos ivari ciklust mutató nőtény patkányokat használtunk. A standard laboratóriumi körülmények között tartott állatok *ad libitum* táplálék- és ivóvízellátásban részesültek 12 óra megvilágítást követő 12 órás sötét ciklusokban. Az állatok tartását és az azokon végzett kísérleteket tekintve a 22.1/3/003/2010 iktatószámú állatkísérleti keretengedélynek megfelelően jártunk el.

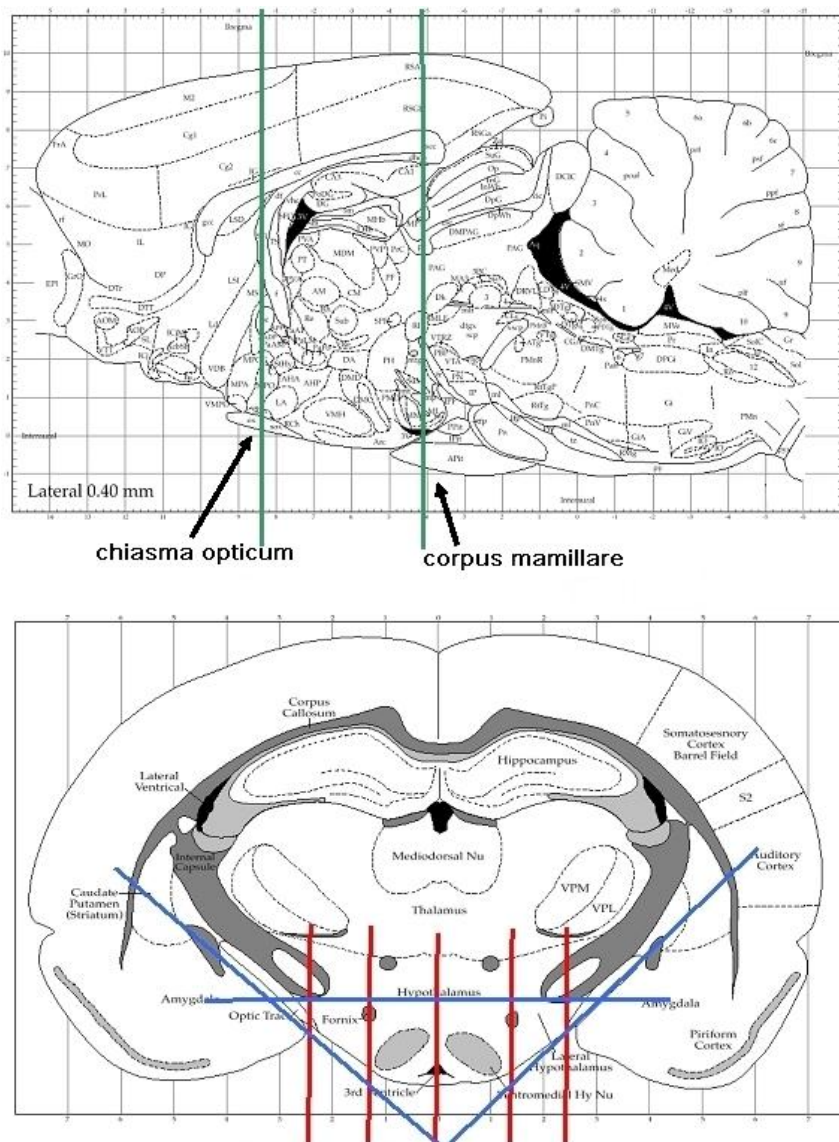
Előkészületek, az agy eltávolítása, a minta kinyerése

Közvetlenül a kísérletet megelőzően feljegyeztük az egyes egyedek súlyát, majd az agy kinyeréséhez gyors, guillotinnal történő dekapitációt alkalmaztunk. A guillotin előnye, hogy gyors, további méréseink eredményeit nem befolyásolja, emellett a lehető legkisebb fájdalom és stresszhatás éri az állatot. A dekapitációt követően vérsérumot gyűjtöttünk a további hormonális vizsgálatok számára, amely a hüvelycitológián alapuló ciklusdiagnosztikát egészíti ki. Erre azért volt szükség, mert a végleges protokollt a nemi ciklus hipotalamikus vizsgálatára dolgoztuk ki. Valószínűnek tartottuk ugyanis, hogy a nemi ciklus befolyásolja a mitokondriális rátákat, így az új protokollal nyert minta összehasonlítható marad az irodalmi adatokkal, továbbá így már a protokoll kialakítása során előzetes adatokkal rendelkezünk a további vizsgálataink előtt (Naftolin *et al.*, 2007).

A gyors dekapitálást követően eltávolítottuk a bőrt és az izomzatot a koponya occipitális és parietális területeiről. Az agy eltávolításához meg kellett nyitni a koponyát, melyhez a következő lépéseket alkalmaztuk: jobb és bal oldalon egy-egy horizontális metszést ejtettünk a foramen magnumból a külső hallójárat irányába, majd leemeltük a koponya alapi részét a bemetszéstől ventrálisan. Ezt követően mindkét oldalon bevágtunk a sutura lambdoidea mentén a fülektől kiindulva a koponya tetejéig. Ezután a saggitalis varrat mentén haladva átvágtuk a falcsont megmaradt részét és a homlokcsontot, és ezek kifordításával megnyitottuk a koponyát. Az agyat a cranialis végénél spatulával megemelve feltűntek a látóidegek, ezeket átvágva épségben, sérülésmentesen kiemelhetjük az egész szervet a koponyából. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy az általunk vizsgálni kívánt hipotalamusz ne károsodjon.

Ezt követően jégen lévő Petri-csészére helyeztük az egész agyat, és megtisztítottuk a hipotalamuszt a basalis részén található vértől, vérerektől és agyburok részekről. A hipotalamusz izolálásához több metszésre volt szükség. Két vertikális metszés (első a chiasma opticum caudalis része mögött, a második a corpus mamillarén keresztül) segítségével először

egy koronális agyszeletet készítettünk, amit a rostralis részével lefelé a Petri-csészére fektettünk. Ekkor eltávolítottuk az agykérget, a nucleus piriformist, valamint a thalamuszt (az agykamra felső szélénél a fornix felett metszve). Fontos volt, hogy az összes látható fehérállományt eltávolítsuk a hipotalamuszról, jelenléte ugyanis befolyásolja a mitokondriális mérést (1. ábra). Az így megtisztított mintát azonnal a jéghideg izolációs pufferrel (750 µl) töltött jelölt Eppendorf-csövekbe helyeztük.



1. ábra. A hipotalamusz kiemelése során alkalmazott metszési síkok

A folyamatot viszonylag gyorsan, ám precízen kellett végezni, és az autolitikus folyamatok beindulása előtt 4 °C-os pufferbe helyeztük a hipotalamusz részeket, ami gátolja a további enzimatisz aktivitást. Az autolízis csökkentése érdekében az agy kivételét követően folyamatosan jégen, illetve előre behűtött eszközökkel dolgoztunk, egészen az *mrr*-mérésig, amikor közvetlenül a mérés előtt 37 °C-os pufferben szuszpendáltuk a mintánkat.

Homogenizálás

A homogenizálást Potter-Elvehjem bordázatlan fejű motorizált kézi homogenizátorral végeztük, amely 600-800 fordulatot tesz percenként. A homogenizáló üvegcsövet 10 alkalommal határozottan fel-le mozgatva homogenizáltuk a mintánkat. Az első mozdulatot 5 másodpercen át, a többi 3-4 másodpercig kellett kivitelezni. Ezalatt egy jeges vízzel feltöltött főzőpohárba állítottuk a mintát tartalmazó homogenizáló csövet, hogy azt mindvégig hidegen tartsuk. A homogenizálást követően arra kellett törekednünk, hogy a lehető legtöbb, az immár homogenizált mintát tartalmazó puffert és habot gyűjtsük össze a homogenizáló csőből és juttassuk vissza az Eppendorf-csőbe, és a mintát jégen tartsuk a centrifugálási lépések elkezdéséig. A homogenizáláshoz használt eszközöket két minta között izolációs pufferrel tisztítottuk meg (Dunkley *et al.*, 2008).

A Percoll-törzsoldat elkészítése

A durva mitokondriális frakció tisztításához Percoll (GE, Healthcare) alapú sűrűséggradienst alkalmaztunk. A gradienst alkotó Percoll-rétegek létrehozásához először törzsoldatot kellett készíteni a kereskedelemben kapható szeparálómédiumból. A Percollt a szubcelluláris struktúrák elválasztásához alkalmazott 2,5 M-os szacharóz oldattal hígítottuk 9:1 arányban. Az így kapott izotóniás törzsoldatot ezt követően Millipore AP15 szűrő segítségével leszűrtük, így eltávolítottuk belőle a szabálytalan alakú vagy összetapadt részecskéket. A Percoll-törzsoldat fagyasztható, így hosszabb ideig, dozírozva is tárolható. A törzsoldatból a gradiensfrakcionáláshoz szükséges hígítások elkészítésére közvetlenül a szövetminták feldolgozása előtt került sor. (Dunkley *et al.*, 2008)

A mitokondriumok izolálása, frakcionálás

A frakcionálás során a korábbiakban tárgyalt gradienscentrifugálást alkalmaztuk. Ez azt jelenti, hogy legalább egy centrifugálási lépésnél egy sűrűséggradienst állítunk elő, amivel az egyes sejtalkotókat pontosabban el tudjuk különíteni. A frakcionálást előhűtött centrifugában, végig 4 °C-on végeztük. Első lépésként a gradiens alkalmazása előtt, egyszerű, a differenciálcentrifugálás elvein alapuló módszerrel egy úgynevezett durva mitokondriális frakciót állítunk elő. A durva mitokondriális frakció elérése érdekében először 4 percen át 1300 x g (3700 rpm) erővel centrifugáltunk minden mintát, ezután a felülúszót áthelyeztük egy üres csőbe, míg az üledéket újraszuszpendáltuk 750 µl EGTA-tartalmú izolációs pufferrel, majd megismételtük az első centrifugálási lépést. Az így kapott üledéket eldobtuk, így megtisztítottuk mintánkat a nagyméretű törmelékektől, míg a felülúszót az előző lépésben

nyert felülúszóval egyesítve 13 000 x g (11 800 rpm) erővel 11 percig centrifugáltuk. Ezután határozott mozdulatokkal eltávolítottuk a felülúszót, és a durva mitokondrium frakciót tartalmazó üledéket 500 µl izolációs pufferrel újraszuszpendáltuk.

Következő lépésként a Percoll alkalmazásával tovább tisztítottuk a mintánkat. Annak érdekében, hogy a rétegek megfelelően elkülönüljenek, illetve könnyen elválaszthatók legyenek, a szokásos Eppendorf csövek helyett egy módosított csövet kellett alkalmazni, amely egy 2 ml-es kúpos Eppendorf-cső volt. Ezt a csövet 500 µl 15%-os Percoll oldattal töltöttük meg, és erre tettük a mintánkat (0%-os Percoll oldat). A mintát nagyon óvatosan kellett a Percoll tartalmú rétegre helyezni, hogy a két réteg keveredését elkerüljük. Ezután a mintát 22 000 x g (15 400 rpm) erővel 7 perc 40 másodpercig centrifugáltuk. A centrifugálás során a gyorsítást 1-es fokozatra állítottuk, míg a rotorféket teljesen kikapcsoltuk (a ténylegesen 22 000 x g-val történő centrifugálás ideje 5 perc volt). Így elkerülhettük az egyes rétegek centrifugán belüli keveredését. Végeredményképpen a centrifugacsőben három frakcióréteg jelent meg: a felső a mielint, a középső a szinaptoszómákat, az alsó pedig a szabad mitokondriumokat tartalmazta. Ezek közül az alsó kettőt szívtuk fel nagyon óvatosan egy közepes méretű (200 µl-es) pipettával és egy új Eppendorf-csőben újraoldottuk EGTA-tartalmú izolációs pufferrel.

Utolsó lépésként a reszuszpéndált mintát két lépésben megtisztítottuk a Percoll oldattól. Először 22 000 x g (15 400 rpm) erővel, teljes gyorsulással és lassulással 11 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntése után az üledéket 1 ml EGTA-mentes (az EGTA befolyásolhatja a mitokondriális mérést) izolációs pufferrel újraszuszpendáltuk. Egy újabb 11 perces, 13 000 x g (11 800 rpm) erővel történő centrifugálást követően az üledékben található immár tisztított mitokondrium mintát a mérés megkezdéséig a felülúszóval együtt tároltuk.

Mitokondriális légzésmérés

A mitokondriális respirációs ráta megállapításához Hansatech Oxterm gépet (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) használtunk. Ez a műszer egy Clark-típusú oxigénelektród segítségével képes mérni a kamrában található aktuális oxigénkoncentrációt, és így egy görbével ábrázolható a mitokondriumok által felhasznált oxigénmennyiség (mitokondriális oxigénfogyasztás) (Li - Graham, 2012).

Az eszköz összeszerelését követően a kalibrációt oxigénnel telített desztillált vízzel és nátrium-ditionittal ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) végeztük, az előbbi oxigénre való telítettségét 100%-nak, az utóbbit 0%-nak tekintettük, a ditionit ugyanis megköti, és vízzé redukálja az oldatban lévő oxigént. A kamrát kimosása után feltöltöttük 450 µl 37 °C-os respirációs pufferrel. Ezután

elindítottuk a regisztrálást, és megvártuk, amíg a puffer stabil közeggé alakul, vagyis az oxigénfogyasztást jelző görbe vízszintessé válik. A következő lépésben leöntöttük mintánkról a felülúszót, majd a mitokondriumokat tartalmazó üledéket 50 μ l respirációs pufferben újrasszuszpendálva a kamrai oxigénkoncentráció állandósulása után, buborékképzés nélkül a kamrába helyeztük. Miután a mitokondriumok akklimatizálódtak új környezetükhöz, elkezdhattuk az egyes légzésmódosító vegyületek beadását Hamilton-pipetták segítségével, amelynek idejét a mérési görbén jelöltük. Hatásukat egy percig vizsgáltuk. Az egyes minták vizsgálatának végeztével a mérőkamrát alkohollal és desztillált vízzel alaposan kitisztítottuk, és a vákuum segítségével eltávolítottuk belőle az összes folyadékot. Az alkalmazási sorrend a következőképpen alakult:

1. Piruvát és malát (5 μ l + 2,5 μ l)
2. Frissen elkészített ADP (2,5 μ l)
3. Oligomycin (1 μ l)
4. FCCP (2,5 μ l)

A piruvát, amely a piruvát-dehidrogenáz komplex hatására acetil-koenzimA-vá alakul, valamint a malát a citromsav ciklusban oxidálódva az ATP-szintézist fokozzák, amely megnövekedett oxigénfogyasztással jár (Mandl *et al.*, 2002).

Az oxidatív foszforiláció elektron-, oxigén-, és anorganikus foszfát ellátáson kívül ADP-t (adenozin-difoszfát) is igényel, amelynek mennyisége attól függ, hogy a sejtek mennyi ATP-t használnak fel. Amennyiben az ATP/ADP arány az ADP javára tolódik el, ez jelzésként szolgál az oxidatív foszforiláció fokozására, ezáltal nő a mitokondriumok oxigénfogyasztása (Mandl *et al.*, 2002).

Az oligomycin a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő ATP-szintáz működését befolyásolja. Ez az enzim két alegységből épül fel: az F_1 -ből, amely az ADP foszforilációjáért felelős, és az F_0 -ból, amely egy négy peptidláncból álló protoncsatornát képez. Ez az egység oligomycinnel gátolható, így a protongradiens kiegyenlítődése és ezzel együtt az ATP-szintézis is (Mandl *et al.*, 2002).

Az FCCP (karbonil-cianid-4-metoxi-fenilhidrazon, $C_{10}H_5F_3N_4O$) egy protonofor vegyület, amely azáltal szünteti meg az ATP-szintézist, hogy a mitokondriumok belső membránját protonokra nézve permeábilissá teszi, így szétkapcsolja az elektrontranszportot és az oxidatív foszforilációt. Az FCCP hatására a mitokondriumok oxigénfogyasztása szabályozatlanul fokozódik (Mandl *et al.*, 2002).

Elektronmikroszkópia

A mintánk minőségét az előzőekben bemutatott élettani teszt mellett vizuálisan is ellenőriztük. Ehhez mintákat vettünk mind a differenciálfractionálással kapott durva mitokondriális frakcióból, mind pedig a különböző centrifugálási paraméterekkel beállított gradiensfractionálással nyert mitokondriális alfrakciókból. A frakciómintákat a centrifugálás után közvetlenül az Eppendorf-csövekben fixáltuk, majd elektronmikroszkópiára a kutatócsoportunk által korábban már közölt módszerrel dolgoztuk fel az Anatómiai és Szöveti Tanszékeken (Zsarnovszky *et al.*, 2001).

Az *mrr*-mérések során felhasznált oldatok

Izolációs puffer EGTA-val:

pH 7.2

	<u>100 ml</u>	<u>250 ml</u>
215 mM Mannóz	3.92 g	9.8 g
75 mM Szacharóz	2.56 g	6.4 g
0.1% BSA	100 mg	250 mg
1mM EGTA	200 µl	500 µl (500mM-os törzsoldatból)
20 mM HEPES	2 ml	5 ml (1M-os törzsoldatból, pH 7.2)

Izolációs puffer EGTA nélkül:

pH 7.2

	<u>100 ml</u>	<u>250 ml</u>
215 mM Mannóz	3.92 g	9.8 g
75 mM Szacharóz	2.56 g	6.4 g
0.1% BSA	100 mg	250 mg
20 mM HEPES	2 ml	5 ml (1M-os törzsoldatból, pH 7.2)

Respirációs puffer:

pH 7.2

	<u>100 ml</u>	<u>250 ml</u>
215 mM Mannóz	3.92 g	9.8 g
75 mM Szacharóz	2.56 g	6.4 g
0.1% BSA	100 mg	250 mg
2 mM MgCl	200 µl	500 µl (1M-os törzsoldatból)
2.5 mM KH ₂ PO ₄	250 µl	625 µl (1M-os törzsoldatból, pH 7.2)
20 mM HEPES	2 ml	5 ml (1M-os törzsoldatból, pH 7.2)

Az általunk használt reagentek: (Sigma-tól beszerezve)

Mannitol	M-9546	Mannóz (250 g) FW 182.2
Sucrose	S-7903	Szacharóz (1 kg) FW 342.3
BSA	A-7511	Albumin, Bovine (10g, szabadzsírsav-mentes)
HEPES	H-0527	Hepes káliumsó formájában (100g) FW 276.4
EGTA	E-3889 10g	Etilénglikol-bisz- (β -aminoetiléter)- N,N,N',N'- tetraecetsav (25g) FW 380.4
KOH	P1767-500G	
MgCl ₂ -oldat	M1028 10 x 1ml	

Légzésmódosítók

Piruvát (Sigma P-2256)

pH 7.2

550 mg/10 ml DW + 200 μ l 1M HEPES

275 mg/5 ml DW + 100 μ l 1M HEPES

Malát (Sigma M-7397)

pH 7.2

670,5 mg/10 ml desztillált víz + 200 μ l 1M HEPES

335,25 mg/5 ml desztillált víz + 100 μ l 1M HEPES

ADP (Sigma A-5285)

pH 7.2

128,2 mg/10 ml desztillált víz + 200 μ l 1M HEPES

64,1 mg/5 ml desztillált víz + 100 μ l 1M HEPES

Oligomycin (Biomol CM-111, FW: 791,1)

pH 7.2

1 mg/ml metanol

FCCP (Biomol CM-120, FW: 254,2)

pH 7.2

2,542 mg/10 ml 100% etanol

1,271 mg/5 ml 100% ethanol

3M KCl-oldat kalibrációhoz

Eredmények és megvitatásuk

Mintaméret

A fent említett, a mintánk kis méretére vonatkozó nehézségeket egy sajátos kialakítású, kisméretű centrifugacső segítségével tudtuk kiküszöbölni, amely egy 2 ml űrtartalmú, egyenes falú, kúpos csúccsal rendelkező Eppendorf-cső (Simport, Kanada), amely lehetővé teszi egyrészt az egyes gradienseknek a térfogatukkal arányos felületű érintkezését, a jól nyomon követhető határfelületek létrehozását, másrészt a kúpos csúcsból sokkal könnyebben visszanyerhetők a várt kis mennyiségű frakciók.

Szöveti összetétel

Mintánk szöveti szennyezettségének csökkentése érdekében a hipotalamusz kiemelése során a fehérállományhoz tartozó elemeket (pl. chiasma opticum), valamint a pia matert és az agyhoz futó ereket gondosan eltávolítottuk. A kiemelés során a hipotalamusz területét ért esetleges szennyeződések (pl. vér) jéghideg folyó vízszugárral lemostuk.

Homogenizálás

Munkánk során a motorizált kézi homogenizátor alkalmazása bizonyult a legalkalmasabb módszernek, ugyanis ez jó felbontóképességgel rendelkezik, és nem sérti fel az egyes organelumokat, szemben az ultrahangos és a nagy nyomású homogenizátorokkal, amelyek károsíthatják a mitokondriumokat. Az ultrahangos homogenizátor ezen túl kis mértékben ugyan, de megemelheti a minta hőmérsékletét, ami a kis mintaméretnél jelentős lehet (Dunkley *et al.*; 1988, Zheng *et al.*, 1990.). Saját tapasztalataink alapján a mitokondriumokat ért akár csekély hőmérsékletváltozás is (enzimaktivitás, membránpermeabilitás, illetve a sejtszervecskék integritásának változásán keresztül) megmásíthatja a mérés eredményeit. A legmegfelelőbb homogenizálási sebességnek az 500-800/perces fordulatszám bizonyult. Az ennél alacsonyabb fordulatszám elégtelen feltárást, az ennél nagyobb pedig a minta túlzott mérvű roncsolása és a súrlódásból fakadó hőhatás révén veszteséget okozott.

Az autolízis elkerülése érdekében a minta állandó hűtéséről gondoskodtunk, amelyet egy főzőpohárba töltött jeges víz segítségével valósítottunk meg a homogenizálás során, ebbe állítottuk a minta méretének megfelelően kis térfogatú homogenizáló csövet.

Kis mennyiségű homogenizáló puffer felhasználása és a buborékmentes feldolgozás növelte kísérletünk eredményességét.

Percollgradiens létrehozása

A rétegzési próbákat a kúpos kialakítású mikrocentrifuga-csővekben végeztük. A kézi pipetta alkalmazásával (pontosságát és egyben gyorsaságát tekintve ez bizonyult a legcélravezetőbbnek) egymásra rétegzett, egymástól 10-10%-ban eltérő koncentrációjú gradiensoldatok nem elegyedtek, határfelületüket mindenféle színezési eljárás nélkül, szabad szemmel is láthatóan órákon át megtartották (2. ábra).



2. ábra. 0 és 15% Percoll tartalmú oldat egymásra rétegezve

A gradiensrétegek viselkedése a centrifugálás során

A frakcionálás során azt tapasztaltuk, hogy az így létrehozott gradiensrétegek stabilan, jól látható határfelületet alkotva fennmaradnak, ha a centrifugálási paramétereket úgy állítjuk be, hogy a centrifugálás kezdetén a rotor a lehető legkisebb gyorsítással érje el a maximális sebességet, a művelet végeztével pedig a szabadon futó rotor tehetetlenségénél fogva lassuljon le és álljon meg. A rotor a célkitűzésekben leírtak alapján kizárólag fix kialakítású lehetett, ami megfelelőnek bizonyult.

A centrifugálás paraméterei a gradiensfrakcionálás során

Az irodalmi adatokat alapul véve előkísérleteink során kipróbáltuk a nagy mintaméretnél leggyakrabban alkalmazott gradiensleosztást (Dunkley *et al.*, 2008). Ezeknek megfelelően a mitokondriális mérésekre legnagyobb veszélyt jelentő lipidstruktúrák javarészt nem tudnak behatolni a 3%-nál sűrűbb Percoll-odataba, míg egy részük eléri a 10-15%-os Percollnak megfelelő sűrűséget. Vizsgálódásunk során bebizonyosodott, hogy a 15%-os gradiens a membrántörmelékkel képes maradéktalanul visszatartani. Ennek megfelelően a legfelső gradienslépcsőt a 0 (ebbe kerül a minta a differenciálcentrifugálást követően) és a 15%-os Percoll-oldatok között hoztuk létre .

A szinaptoszómák Dunkley és mtsai. (2008) tanulmánya alapján sűrűségüket tekintve a 15-18 %-os Percollal kerülnek egyensúlyba, és a 20%-nál nagyobb koncentrációjába már nem képesek behatolni. Az általunk beállított paraméterekkel (ld. Anyagok és módszerek) a szóban forgó frakció behatolt a 15%-os rétegbe, de nem érte el annak alsó határát, hanem egy jól körülhatárolt egységet alkotva, lebegve maradt. A szinaptoszómáknál nagyobb fajsúlyú szomális mitokondriumok ugyanezen paraméterek mellett a cső alján gyűltek fel.

Az előkísérletek során úgy állítottuk be mind a centrifugálás erősségét (g-érték), mind a gradiensfrakcionálás időtartamát, hogy az egyes frakciók minél láthatóbban elváljanak egymástól, és megérkezzenek a szakirodalomban megadott határfelületekre.

Először az optimális centrifugálási idő meghatározásán dolgoztunk. Ehhez olyan centrifugális erőt állapítottunk meg, amely kellően magas ugyan a gradiensfrakcionáláshoz, de a legtöbb asztali készülékkel elérhető. Ennek megfelelően az előkészített minták gradienscentrifugálását 22 000 g-n végeztük 5 és 20 perc között változtatva a centrifugálás idejét (nem számítva bele a gyorsítási és lassítási szakaszokat). A legmegfelelőbbnek a viszonylag rövid időtartamú, 5-8 perc közötti centrifugálás bizonyult. Amennyiben a procedura hosszabban tartott, az egyes rétegek egymásba csúsztak, a gradiensoldatok összekeveredtek, amit jól reprezentált a frakciók dekonzenzációja, esetleg együttes felúszása.

Ezt követően az 5 perces időtartamot megtartva a centrifugális erő hatását vizsgáltuk. A g-értéket 13 000 és 22 000 x g között változtatva azt tapasztaltuk, hogy a legmagasabb értéken történő centrifugálás eredményezi a legtokéletesebb frakciószétválást.

Tapasztalataink alapján a minta rétegzését megelőző alapos felszuszpendálás fontos, mert fellazítja a differenciálfrakcionálás során összezsapódott részecskéket, sejtalkotókat. A gondos szuszpendálás jelentősen növeli a kinyert frakciók hasznos mennyiségét, aminek magyarázata, hogy az egymástól szétválasztott sejtalkotók nagyobb arányban képesek sűrűségük szerint egymástól szétválni.

Bár a szövetfeldolgozást mindenképpen 4 °C-on kell végezni, a frakciók centrifugálás közbeni viselkedésének felderítése érdekében megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a sejtalkotók vándorlását a minta hőmérséklete. A szeparálási lépéseket jégen és szobahőmérsékleten is elvégezve azt kaptuk, hogy a hőmérséklet nem módosítja a frakciók szétválását.

Ugyanezt tapasztaltuk az EGTA tekintetében: mivel tudomásunk van róla, hogy az EGTA befolyásolhatja a frakciókon történő méréseket (így az *mrr*-mérést is), felmerült, hogy

módosítja-e magát a frakcionálás eredményességét. Az EGTA jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta az eljárás eredményességét.

A gradiensfrakcionálással kapott frakciók pontos összetételét, mivel az említett markerrészecskék (Density Marker Beads, SephadexTM) nem álltak rendelkezésre, elektronmikroszkópiával, életképességüket *mrr*-méréssel ellenőriztük.

A gradiensfrakcionálás során létrejött frakciók láthatósága

A differenciálfrakcionálást követően a felszuszpendált minta opálosan fehérre színezi az azt tartalmazó puffert. A gradienscentrifugálást követően az egyes frakciók ehhez hasonlóan láthatók maradnak, ami lehetővé teszi azok precíz kinyerését (3. ábra).



3. ábra. A gradiensfrakcionálás során kialakult, jól elkülönülő három réteg

A gradiensfrakcionálás során létrejött frakciók elkülönített kinyerése

A frakciók kinyerésére két lehetőség közül választhattunk. Az egyik, amikor a felső rétegek leszívásával kezdjük - ekkor azonban az alsóbb rétegekből is láthatóan bejuthatnak részecskék az eltávolítani kívánt rétegbe, ami esetünkben ezzel elvesz a kívánt minta egy része. Ha viszont a (200 µl-es) kézi pipettát az Eppendorf-cső csúcsába helyezzük, kisebb a szívóerő, így az alsóbb rétegek egyenletesebben eltávolíthatók a felső (nem kívánt) réteggel való szennyeződés elkerülésével.

Percoll eltávolítása

A gradiensfrakcionálást követően kinyert mitokondriális alfrakciók a határos gradiensrétegeknek megfelelő koncentrációjú Percollt tartalmaznak. A Percoll-tartalom eltávolítását kézenfekvően a kapott alfrakciók felszuszpendálásával és újbóli lecentrifugálásával, azaz kiülepítésével kell megoldani. A Percoll azonban, éppen szeparálóképességével összefüggésben, az adott centrifugális erő mellett, nem engedi

leülepedni a benn felszuszpendált állapotban lévő, kinyert alfrakciókat. A Percoll okozta felhajtóerő leküzdéséhez éppen ezért jóval nagyobb centrifugálási erőre (g-érték) lenne szükséges ahhoz, hogy az alfrakciókat kiülepítve, a fennmaradó felülúszót eltávolítva, percollmentessé tegyük mintánkat. Ehhez azonban olyan nagy gravitációs gyorsítás lenne szükséges, ami károsítaná a mitokondriumfrakciót (Dunkley *et al.*, 2008). A tisztító lépés hatásfokának növelése ezen túl megtörténhet a centrifugálás idejének emelésével is. Mivel egyik lehetőség megvalósítása sem kedvez a mérési feltételeknek, egy harmadik opciót kellett választanunk. A Percoll eltávolítására a minta kétszeri tisztító centrifugálási lépésen esik át, amelyek során a centrifugális erő nem haladja meg a gradiensfrakcionálsi lépésben alkalmazottét, a mintát pedig annyira hígítjuk fel, amennyire csak a centrifugacső mérete megengedi.

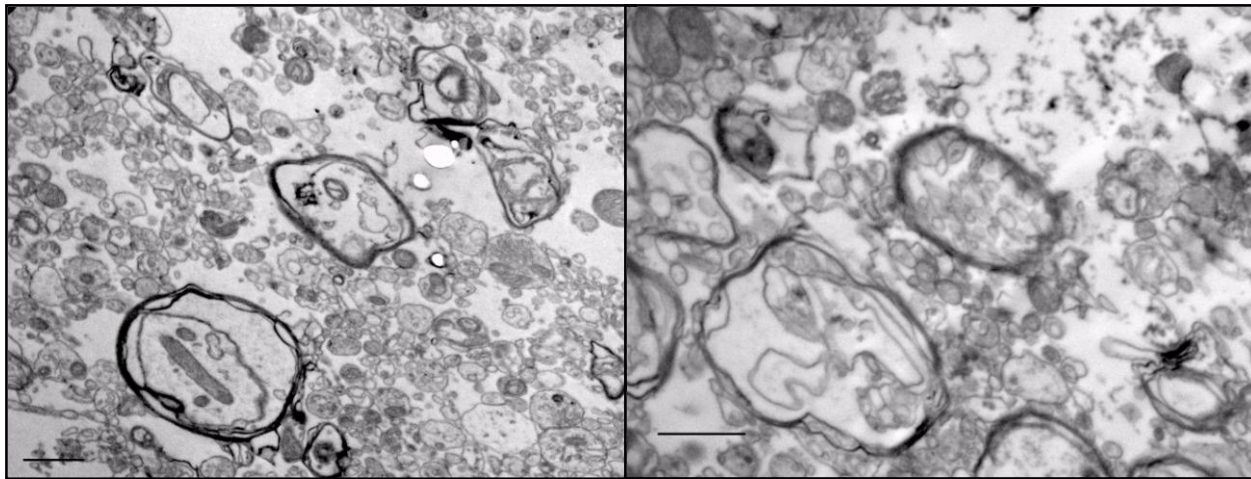
A frakciók minőségének ellenőrzése

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az üledék fixálása elektronmikroszkópia céljából a következőképpen történt: az üledéket spatulával óvatosan felkanalasztuk (így a fixáló minden oldalról eléri a mintánkat), a felülúszót leöntöttük, és fixálóra cseréltük 24 órára. Az így immerziós módon fixált üledék legkülső hányadából történt a mintavétel, és úgy került beágyazásra gyantába.

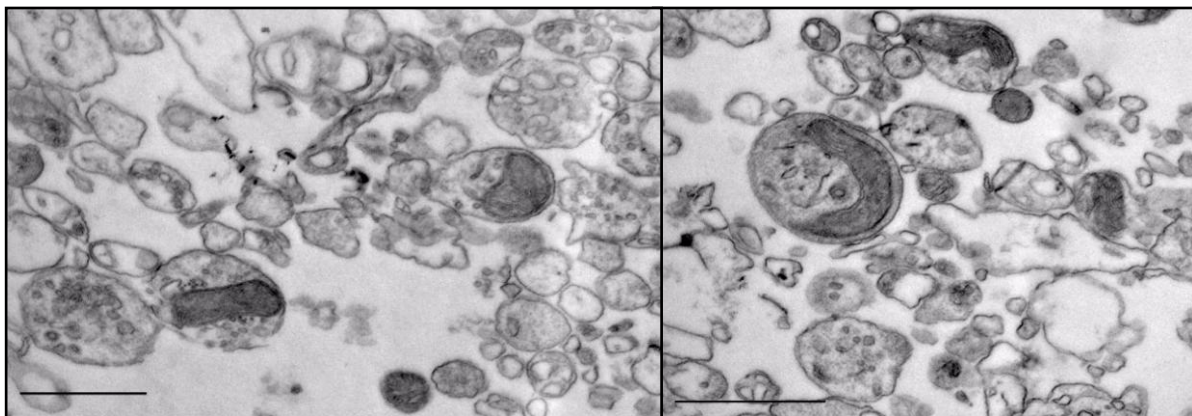
Módszerünk kidolgozása során számos esetben elvégeztük a frakciók elektronmikroszkópiás vizsgálatát. Mindezek bemutatása, a megfigyelések részletes leírása szükségtelenül hosszúra nyújtaná munkánkat. Ezért hadd álljon itt mindössze a mitokondriális frakció differenciálfrakcionálást követő állapotának (durva mitokondriális frakció) és a véglegesített protokoll segítségével kapott mitokondriális alfrakciók összehasonlítása.

A durva mitokondriális frakcióról (4. ábra) készült elektronmikroszkópos felvételeken azonnal szembe tűnik a frakciót alkotó struktúrák heterogenitása. A mitokondriumokon és szinaptoszómákon kívül nagy arányban láthatók nagyméretű, homogén citoplazmatartalmú membránlefűződéses, valamint kisebb, de a legkülönbözőbb méretben előforduló membrántörmelékek. A képeken gyakran, egymást több rétegben körülvevő koncentrikus lefutású membránstruktúrák, kétségtelenül mieleinhüvelyek keresztmetszetei tűnnek fel.



4. ábra. Durva mitokondriális frakció (az aránymérték 1 μm -t jelöl)

Az általunk kidolgozott gradiensfrakcionálással nyert frakciók összetétele nagyban hasonlít a tudományos metodikai munkákban közzétett, ugyanakkor arányaiban túlnyomóan kérgi területeket magába foglaló nagy mintamérettel dolgozó eljárások révén kapott mitokondriális, illetve szinaptoszomális frakciók minőségéhez. Míg a centrifugacső csúcsába leülepedő frakció túlnyomóan szabad (szomálisnak tekinthető) mitokondriumokat tartalmaz, addig az e fölött, a 15%-os rétegben lebegő zömében szinaptoszómák (bennük láthatóan mitokondriumokkal és vezikulákkal) találhatók (5. ábra).

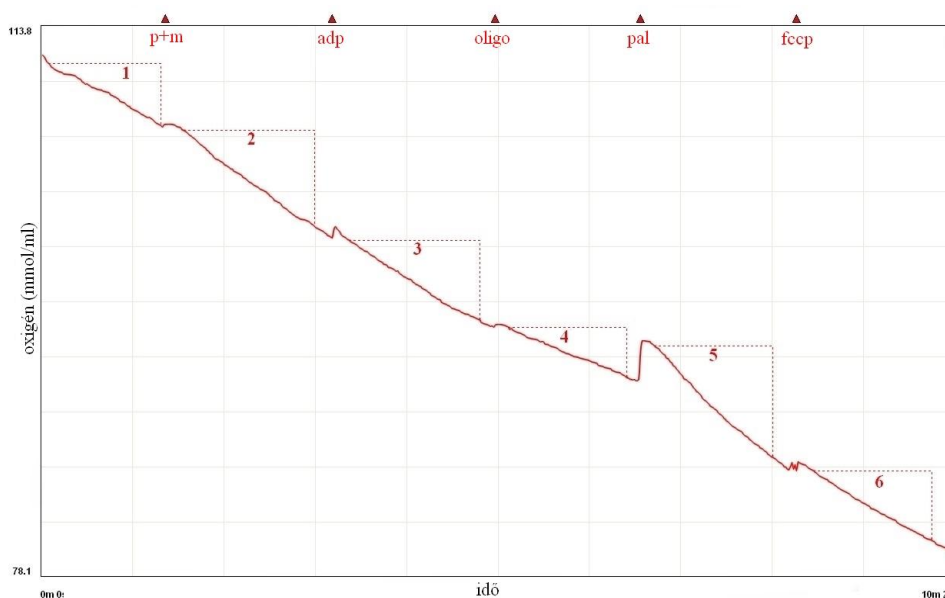


5. ábra. Szinaptoszóma tartalmú frakció (az aránymérték 1 μm -t jelöl)

Mitokondriális légzésmérés

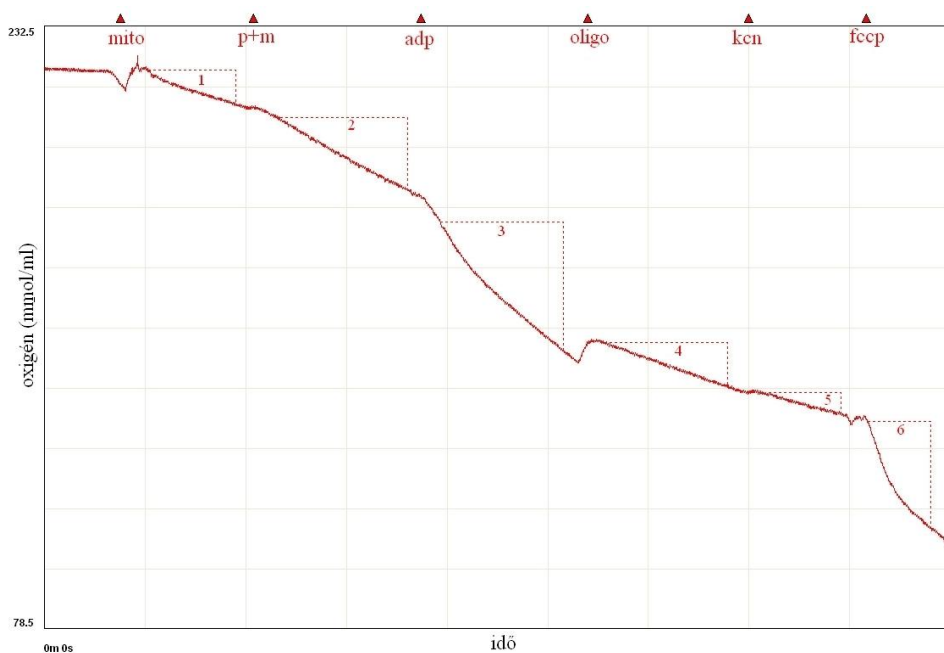
Lévén a jelen munkánkban bemutatott eljárást az *mrr*-mérésre dolgoztuk ki, elsődleges jelentőségű volt az elektronmikroszkópiával igazolt összetételű mitokondriális alfrakciók minőségének *mrr*-méréssel végzett ellenőrzése.

A 6. ábrán az általunk is kiindulópontnak tekintett, durva mitokondriális frakció felhasználásával rögzített légzési görbe látható. Elemezve a görbét, világos, hogy a piruvát és malát (2), majd az ATP-szintáz számára szubsztrátot jelentő ADP beadását (3) követően nem tapasztalunk jelentős növekedést az oxigénfogyasztásban. Az oxigén vízzé való redukálását tehát más mellékfolyamatok (alternatív oxidázok, a membrán szétkapcsoltsága) is nagy ütemben végzik, a légzési lánc támogatása nem jelenti az oxigénfogyasztás kizárólagos feltételét (Diano - Horvath, 2012). Ugyanerre a következtetésre vezet az oligomycin (4) alkalmazása: az ATP-szintáz gátlása nem jelenti az oxigénfogyasztás drasztikus csökkenését, a görbe változatlan meredekséggel halad tovább a piruvát és malát bontása nyújtotta energiától meghajtva. Az FCCP (6), amely a belső membrán protonokra való átjárhatóságának növelése révén szétkapcsoló ágensként hat, szintén nem eredményez a görbe hirtelen, nagymérvű letörésével járó lökésszerű vízképződést (Kalckar *et al.*, 1979). Biokémiai tanulmányok és saját mérési tapasztalataink alapján a légzési görbe ilyen jellegű lefutását a mitokondriális membránrendszer integritásának elvesztése, a légzési lánc szétkapcsoltsága okozza, okozhatja (Diano - Horvath, 2012; Villa, 1981). A különböző lipidstruktúrák (membrántörmelékek, mielin, szabad zsírsavak) mintabeli mennyisége jelentősen közrejátszik a mitokondriumok szétkapcsoltságában (Wojtczak-Schönfeld, 1993), lehetetlenné téve ezzel a mitokondriumfrakció natív légzési tevékenységének, aktivitásának regisztrálását.



6. ábra. *mrr*-felvétel hipotalamusz mintán, durva mitokondriális frakcióból

A gradiensfrakcionálással nyert alfrakciókkal szemben alapkövetelmény volt a műterméknek tartott mértékű szétkapcsoltság kiküszöbölése, elkerülése. Éppen ezért a minta feldolgozásának e finomító lépései elsősorban a fent nevezett lipidtermészetű szétkapcsolóstruktúrák eltávolítását célozták. Mindehhez összehasonlítási alapot jelentettek egyrészt az irodalomban fellelt mérési adatok, másrészt a jóval nagyobb szöveti homogenitást mutató (kötőszövetes struktúráktól és fehérállománytól jól elhatárolt, vagy azokban szegény) agyterületeken (elsősorban az agykéreg) általunk végzett mérések (7. ábra.).

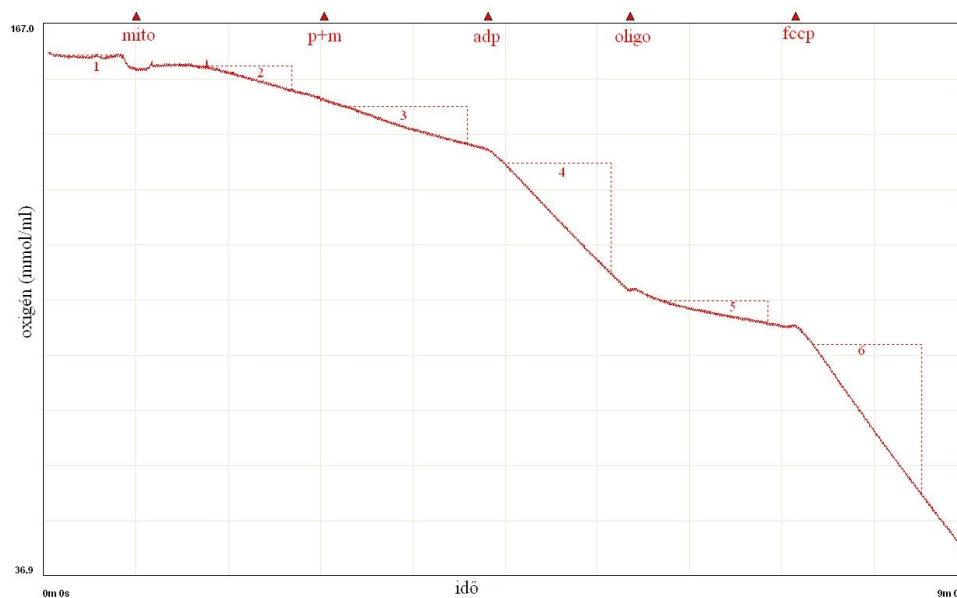


7. ábra. *mrr*-felvétel agykéreg-mintán

Itt kell megjegyezni, hogy míg a kortikális régióból származó minták *mrr*-mérésre történő felhasználásához — bizonyos korlátozásokkal — megfelelő lehet pusztán a durva mitokondriális frakció elérése (Villa, 1981), addig a jóval heterogénebb szöveti természetű hipotalamuszból kizárólag az általunk is vázolt gradiensfrakcionálás útján nyerhetők az élettani szempontból is releváns légzési tevékenységet mutató frakciók.

A 8. ábra az általunk kidolgozott gradiensfrakcionálási eljárással nyert szinaptoszómafrakció *mrr*-mérésével kapott légzési görbét mutatja. Meg kell figyelni az alacsony szőlősav-almasav beadást megelőző (2) alacsony alaprátát, majd az oxigénfogyás fokozatos emelkedését a citrátciklus indukálása (3) és az ADP-bejuttatást követően (4). Az oligomycin alkalmazásával (5) a vártan megfelelően alacsony szintre csökken a ráta (Pullman - Monroy, 1963), kizárólag a kis mennyiségű alternatív oxidációs utak működése feltételezhető élettaninak elfogadott mértékben. Az FCCP általi szétkapcsolás (6) —

minthogy a natív állapotot mutató légzési lánc további jelentős tartalékokat (elektrokémiai protongradiens) halmozott fel — hirtelen bekövetkező nagy oxigénfogyást eredményez, a membrán permeabilitásának megszüntetése által a mitokondriális mátrixba pillanatszerűen belépő protonok oxigénnel való egyesülése révén.



Megbeszélés és munkánk tudományos értéke

Összességében elmondhatjuk, hogy a kitűzött célok mindegyikét meg tudtuk valósítani, létrehozva ezzel egy olyan módszert, amelynek segítségével lehetőség nyílt a Tanszéken végzett szaporodásbiológiai kutatásokhoz szükséges *mrr*-mérések pontosabbá, eredményesebbé tételére.

Ezen eljárás alkalmazása biztosítja az *mrr*-mérések számára szükséges, megbízható tisztaságú mitokondriális minta kinyerését, ugyanis az új protokoll szerint a mintát szennyező szövetrészek eltávolítása precízebbé válik a korábban alkalmazott módszerekhez képest.

A mintánk méretével kapcsolatos nehézségeket is sikerült kiküszöbölnünk: ez a módszer lehetővé teszi, hogy igen kis méretű mintából (egy patkány hipotalamuszának feléből) az *mrr*-mérések számára elfogadható mennyiségű mitokondriumot tudjunk kinyerni.

Módszerünk további előnye, hogy a frakcionálásra fordított idő lerövidítésével a mitokondriumok nagyobb eséllyel intaktak maradnak és megőrzik életképességüket az *mrr*-mérés megkezdéséig, ezáltal a mérés hatékonyabbá válik és az élő állapothoz leginkább hű eredményeket kapunk.

Ez a módszer lehetővé teszi továbbá az egyedi hipotalamuszokból kinyert, idegvégződésekhöz kötött és a sejtestbéli mitokondriumok légzési tevékenységének szeparált vizsgálhatóságát.

Mindemellett új protokollunk más kutatások számára is teret biztosít: általa további lehetőségek nyílnak az eltérő agyterületek *mrr*-méréssel történő összehasonlítására, úgy a hipotalamuszon belül, mint más agyi régiókat tekintve.

Az általunk kidolgozott Percoll alapú szubfrakcionálási eljárás tehát általánosan lehetővé teszi az igen kis agyterületek, akár magcsoportok szeparált vizsgálatát, ezek mitokondriális aktivitásának összehasonlítást, továbbá az így nyert mintákból származó szomális és szinaptoszomális mitokondriumfrakciók elválasztását. Különleges felszerelés nélkül is kivitelezhető módszerünkkel rövid idő alatt *mrr*-mérésre alkalmas minőségű mitokondriumfrakció nyerhető.

Összefoglalás

A hipotalamusz a homeosztatikus folyamatok szabályozásáért felelős egyik legfontosabb agyterület, pontos élettani szerepe azonban számos aspektusból máig sem tisztázott. Az Élettani és Biokémiai Tanszék Neuromorfológiai-neuroendokrinológiai munkacsoportja a hipotalamusz által irányított reproduktív folyamatokat, valamint a táplálékfelvétel szabályozását vizsgálja az itt megtalálható éhség-jóllakottság központon keresztül. A szóban forgó hipotalamikus központok aktivitása jól nyomon követhető a neuronális energiafogyasztással, ez utóbbit pedig hűen reprezentálja a neuronok ATP-termeléséhez kapcsolt mitokondriális légzése. Az egyes agyterületek működésére tehát ezen organellek oxigén-felhasználásából következtetünk.

A kutatások során a mitokondriumok légzési aktivitását, valamint a biokémiai vizsgálatokban közismert légzésmódosítókkal kiváltott változását Clark-típusú oxigénelektóddal (Hansatech, Oxyterm) követjük nyomon. Mivel kísérleti modellállatként a szakirodalommal való összehasonlíthatóság érdekében és a legfrissebb állatvédelmi ajánlások alapján a patkányt választottuk, szükségessé vált egy olyan frakcionálási módszer kifejlesztése, amely lehetővé teszi, hogy a mérésekhez az egy állatból kiemelt hipotalamuszból, sőt akár azok külön magcsoportjaiból megfelelő tisztaságú, az élettanihoz legközelebbi kondíciójú mitokondriális mintát nyerhessünk. Az érintett agyterület kis mérete mellett a frakcionálással történő mintatisztításban további nehézséget jelent a vizsgált szűrkeállományt övező idegrostok, vaszkuláris és kötőszöveti elemek, melyek élettani tulajdonságaik révén igen negatívan befolyásolják a mitokondriális mérést.

Előkísérleteink során a biokémia mérésekhez hagyományosan alkalmazott szacharózos frakcionálással nyert ún. durva mitokondrium frakció paraméterei élettani szempontból elégtelennek bizonyultak. Az elégtelen tisztításból fakadóan a mintát szennyező lipidtípusú összetevők jelentősen módosították a vizsgált hipotalamikus mitokondriumok élettani állapotát, natív légzési tevékenységét. Mintanyerési eljárásunk finomítása céljából különböző gradiensfrakcionálási módszerek merültek fel. Az irodalmi adatok és személyes közlések során megismert módszerek érzékenysége — első sorban az általunk célba vett minta mérete és szöveti heterogenitása miatt — azonban elmaradt a szükségestől.

E munkánk célja, hogy bemutassuk az általunk kidolgozott Percoll (GE) alapú szubfrakcionálási eljárást, mely általánosan lehetővé teszi az igen kis agyterületek, akár magcsoportok szeparált vizsgálatát, ezek mitokondriális aktivitásának összehasonlítását, továbbá az így nyert mintákból származó szomális és szinaptoszomális mitokondriumfrakciók elválasztását. Rövid idő alatt és különleges felszerelés nélkül is kivitelezhető módszerünkkel *mrr*-mérésre alkalmas minőségű mitokondriumfrakció nyerhető.

Summary

Investigational method of mitochondrial metabolism in small brain tissue samples and its practical significance

The hypothalamus is one of the most important brain areas that are responsible for the regulation of homeostatic processes in the body; however, the exact physiological role of it is not clarified yet. Reproductive processes and food intake regulated by the hypothalamus are investigated by the Neuromorphological-neuroendocrin Research Group at the Department of Physiology and Biochemistry, as well. The neuronal energy consumption that is represented in mitochondrial respiration rates (*mrr*) are good indicators of the activity of hypothalamic centres. Thus, using this *mrr* method, conclusions can be made regarding to the function of certain brain areas.

In our study we examined the mitochondrial respiratory activity by a Clark-type oxygen electrode (Hanstech, Oxyterm). We measured the oxygen consumption of the mitochondria in respiration buffer solution alone and with additional respiratory modifiers. This method is well known for examination of mitochondrial activity for a long time. The examination was carried out on rats as an accepted experimental model. Regarding to the small samples that can be retrieved from rats and also considering the comparability with the previous data of literature, it became necessary to develop a fractionation method that fits our purposes. The requirements of the new method are the following: it should be possible to isolate the half of the hypothalamus or even smaller brain areas, and the sample should not be affected by uncoupling substances such as myelin and other cell debris.

Regarding to the big literature of the cellular and subcellular fractionation and after our preliminary experiments we decided to use the Percoll (GE) as our fractionation medium since it provides us a good opportunity for making a density gradient and it is not harmful on living cells and cell organelles.

The purpose of this work is to introduce the Percoll based subcellular centrifugation method which makes possible the separated examination of small brain areas or even nucleus groups. We will show that this method is good for measurement of mitochondrial activity, furthermore it is possible to separate the somal and synaptosomal mitochondrial fractions from the samples obtained with this method. Thus we can get a mitochondrial fraction with a suitable quality for mitochondrial respiration measurements without special equipments in a short period of time.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Kiss Dávid Sándornak és Dr. Tóth Istvánnak, hogy lehetővé tették számomra a kutatási munkába való bekapcsolódást, hálával tartozom a dolgozat elméleti háttérét nyújtó ismeretek türelmes és alapos átadásáért és a dolgozat megírásában nyújtott segítségükért.

Köszönöm Kinálné Szikora Zsuzsannának, hogy megosztotta velem a centrifugálással, anyagismerettel és az oldatkészítéssel kapcsolatos tapasztalatait, és hogy mindig kész volt segíteni labormunkámat.

Köszönet illeti Pető Klárát az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Frenyó V. Lászlónak, az Élettani és Biokémiai Tanszék vezetőjének azért, hogy dolgozatomat a Tanszéken elkészíthettem.

Munkánkat az OTKA 15004, OTKA 15002, NKB 15739, TÁMOP 4.2.2. B-10/1-2010-0011 pályázatok támogatták.

Nem utolsósorban köszönöm családom és barátaim dolgozatom elkészítése során tanúsított kitartó türelmét és támogatását.

Irodalomjegyzék

- ABDEL-LATIF, A.A. 1996: A simple method for isolation of nerve-ending particles from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 121. p. 403–406.
- ALMEIDA, M. C., SILVA, A. C., BARRAL, A., BARRAL NETTO, M. 2000: A Simple Method for Human Peripheral Blood Monocyte Isolation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95(2). p. 221-223.
- BABITCH, J. A. 1973: Synthesis of proteolipid by subcellular fractions from rat brain, *Brain Research*, 49. p. 135-150.
- BENNETT, S. & BREIT, S. N. 1994: Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J. Leukoc. Biol.*, 56(3). p. 236-40.
- BRETZ, U., BAGGIOLINI, M., HAUSER, R., HODEL, Ch. 1974: Resolution of three distinct populations of nerve endings from rat brain homogenates by zonal isopicnic centrifugation. *J. Cell Biol*, 61. p. 466-480.
- BURDEN, D. W. 2008: Guide to the Homogenization of Biological Samples. *Random Primers*, Issue No. 7. p. 1-14.
- COTMAN, C.W. & MATTHEWS, D. A. 1971: Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes: isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 249. p. 380–394.
- DIANO, S. & HORVATH, T. L. 2012: Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol. Med.*, 18(1) p. 52-8.
- DUNKLEY, P. R., HEATH, J. W., HARRISON, S. M., JARVIE, P. E., GLENFIELD, P. J., ROSTAS, J. A. 1988: A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.*, 441(1-2) p. 59-71.
- DUNKLEY, R, P., JARVIE, P. E., ROBINSON, P. J. 2008: A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat. Protoc.*, 3(11). p. 1718-28.

- ERNSTER, L. L. & SCHATZ, G. 1981: Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.*, 91. p. 227-255.
- GARCIA, J., HAN, D., SANCHETI, H., YAP, L-P., KAPLOWITZ, N., CADENAS, E. 2010: Regulation of Mitochondrial Glutathione Redox Status and Protein Glutathionylation by Respiratory Substrates. *J. Biol. Chem.*, 285(51). p. 39646–39654.
- GRAY, E. G., WHITTAKER, V. P. 1960: The isolation of synaptic vesicles from the central nervous system. *J. Physiol.*, 153. p. 35-37.
- GRAY, E. G., WHITTAKER, V. P. 1962: The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat. (Lond.)*, 96. p. 79-88.
- GOLDBERG, M. A. 1971: Protein synthesis in isolated rat brain mitochondria and nerve endings. *Brain Research*, 27. p. 319-328.
- GRAHAM, J. M. 2001: Isolation of mitochondria from tissues and cells by differential centrifugation. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 3, Unit 3.3.
- GROVE, V. E., JOHNSON, T. C., KELLY, P. T., LUTTGES, M. W. 1973: Qualitative and quantitative morphological changes in subcellular fractions from mouse cerebral cortex during postnatal development. *J. Cell Biol.*, 58. p. 676-688.
- HAJÓS F. 1975: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Research*, 93. p. 485-489.
- KALCKAR, H. M., CRISTOPHER, C. W., ULLREY, D. 1979: Uncouplers of oxidative phosphorylation promote derepression of the hexose transport system in cultures of hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(12) p. 6453-5.
- KISS, D. S., ZSARVOVSZY, A., HORVATH, K., GYORFFY, A., BARTHA, T., HAZAI, D., SOTONYI, P., SOMOGYI, V., FRENYO, L. V., DIANO, S. 2009: Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:31. doi: 10.1186/1477-7827-7-31.
- KRISTIAN, T. 2006: Isolation of mitochondria from CNS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 p. 1407-18.

- LAURENT, T. C., PERTOFT, H., NORDLI, O. J. 1980a: Physical chemical characterization of Percoll. I. Particle weight of the colloid. *Colloid Interface Sci*, 76. p. 124–132.
- LAURENT, T. C., OGSTON, A. J. G., PERTOFT, H. et al. 1980b: Physical chemical characterization of Percoll. II. Size and interaction of colloidal particles. *Colloid Interface Sci.*, 76. p. 133–141.
- LAURENT, T. C. & PERTOFT, H. J. 1980c: Physical chemical characterization of Percoll. III. Sodium binding. *Colloid Interface Sci.*, 76. p. 142–145.
- LI, Z. & GRAHAM, B. H. 2012: Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods Mol. Biol.*, 837. p. 63-72.
- MANDL J. 2002: Bioenergetika. Energiatermelés és –raktározás az anyagcsere során. In: Orvosi biokémia. ÁDÁM V., DUX L., FARAGÓ A., FÉSÜS L., MACHOVICH R., MANDL J., SÜMEGI B. Budapest, Medicina Könyvkiadó. p. 76-77.
- NAFTOLIN, F., GARCIA-SEGURA, L. M., HORVATH, T. L., ZSARNOVSZKY, A., DEMIR, N., FADIEL, A., LERANTH, C., VONDRACEK-KLEPPER, S., LEWIS, C., CHANG, A., PARDUCZ, A. 2007: Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod Sci.* 14(2). p. 101-16.
- NOBLE, P. B. & CUTTS, J. H. 1967: Separation of blood leucocytes by Ficoll gradient. *Can. Vet. Jour.*, 8(5). p. 110–111.
- PULLMAN, M. E. & MONROY, G. C. 1963: A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 238. p. 3762–3799.
- RAFF, M. 2002: Fractionation of Cells. In: ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York, Garland Science. ISBN-10: 0-8153-3218-1 ISBN-10: 0-8153-4072-9, (NCBI Bookshelf)
- ROSENTHAL, R. E., HAMUD, F., FISKUM, G., VARGHESE, P. J., SHARPE, S. 1987: Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 7(6). p. 752-8.

- ROSSIGNOL, R., LETELLIER, T., MALGAT, M., ROCHER, C., MAZAT, J.-P. 2000: Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem. J.*, 347. p. 45-53.
- SHAKI, F., HOSSEINI, M. J., GHAZI-KHANSARI, M., POURAHMA, J. 2012: Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta.*, 1820(12). p. 1940-50.
- SINGH, I. N., SULLIVAN, P. G., DENG, Y., Mbye, L. H., HALL, E. D. 2006: Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 11. p. 1407-18.
- STARKOV, A. A. & WALLACE, K. B. 2002: Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicol Sci.*, 66(2). p. 244-52.
- VILLA, R. F. 1981: Brain enzymes and ischemia. *Eur. Neurol.*, 20(3). P. 245-52.
- WANG, J., BAI, L., LI, J., SUN, C., ZHAO, J., CUI, C., HAN, K., LIU, Y., ZHUO, X., WANG, T., LIU, P., FAN, F., GUAN, Y., MA, A. 2009: Proteomic analysis of mitochondria reveals a metabolic switch from fatty acid oxidation to glycolysis in the failing heart. *Sci China C Life Sci.*, 52(11). p.1003-10.
- WHITTAKER, V. P. 1993: Thirty years of synaptosome research. 3. *Neurocitol.*, 22. p. 735-742.
- WILLIAMS, K. N., SZILAGYI, A., HE, L. K., CONRAD, P., HALERZ, M., GAMELLI, R. L., SHANKAR, R., MUTHUMALAIPPAN, K. 2012: Dendritic Cell Depletion in Burn Patients Is Regulated by MafB Expression. *J Burn Care Res.* [Epub ahead of print]
- WOJTCZAK, L. & SCHÖNFELD, P. 1993: Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1183(1). p. 41-57.
- ZHENG, X., SHOFFNER, J. M., VOLJAVEC, A. S., WALLACE, D. C. 1990: Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *Biochim.Biophys.*, 1019 p. 1–10.
- ZSARNOVSZKY, A., HORVATH T. L., GARCIA-SEGURA, L. M., HORVATH, B., NAFTOLIN, F. 2001: Oestrogen-induced changes in the synaptology of the monkey

(*Cercopithecus aethiops*) arcuate nucleus during gonadotropin feedback. *J. Neuroendocrinol.*, 13. p. 22-28.

ZSARNOVSZKY, A., BARTHA, T., FRENYO, L. V., DIANO, S. 2009: NTPDases in the neuroendocrine hypothalamus: possible energy regulators of the positive gonadotrophin feedback. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7 p. 63. doi: 10.1186/1477-7827-7-63.