

A kinurénsav termelődés anatómiai és funkcionális vizsgálata egér agyszövetben

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Herédi Judit



Témavezetők

Dr. Gellért Levente

egyetemi adjunktus

Dr. Kis Zsolt

egyetemi adjunktus

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged, 2018

1. Bevezetés

A triptofán (TRP) lebontásának fő metabolikus útvonala az agyszövetben az ún. kinurenin útvonal (KP), amely során számos neuroaktív metabolit képződik, amelyeket közösen kinurenineknek nevezünk. A neuroprotektív stratégiák szempontjából az egyik legfontosabb és leginkább vizsgált KP végtermék a kinurénsav (KYNA).

A KYNA széles spektrumú receptor moduláló hatása ismert. Fő receptor targetjei az agyszövetben az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor és az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin ($\alpha 7$ nACh) receptor, melyeken keresztül képes szabályozni az agy glutamát, acetilkolin, GABA, és dopamin szintjét is.

Más KP metabolitokkal együtt, a KYNA abnormális szintjét több neurodegeneratív és neuropszichiátriai megbetegedésben leírták, így a terápiás célú kinurenerg manipuláció intenzíven vizsgált rágcslókban. A KYNA szintje bizonyos kórképekben csökken (pl. Alzheimer-kór, Huntington-kór), míg más betegségek esetén kórosan megemelkedik (pl. skizofrénia, Down-szindróma), éppen ezért a KYNA termelés mindkét irányú modulálása potenciális terápiás stratégia lehet.

A KYNA L-kinurenin-ből (L-KYN) keletkezik irreverzibilis transzamináció során. A folyamatot a kinurenin aminosztransferázok (KAT) katalizálják, amelyeknek négy izoformája ismert (KAT-1-4). Az ember agyszövetében a KAT-2 a fő KYNA szintetizáló enzim, így a KYNA termelés kísérletes modulálása során a KAT-2-es izoforma a vizsgálatok fő célpontja. A KYNA szintézise, patkányokon végzett szövettani kísérletek alapján, asztrocita sejtekben zajlik, a KAT-2 neuronális jelenlétét csak szórványosan detektálták bizonyos agyterületeken.

A KYNA termelés genetikai és farmakológiai manipulációja széles körben vizsgált rágcslókban. A KAT-2 funkció genetikai módosítását leggyakrabban egerekben végzik. A kat-2 transzgenikus állatok limitációja azonban, hogy a kat-2 deléción az egész szervezetet érinti, így a vizsgálatok során a perifériás KYNA

funkció is érintett. **A folyamat idegszövet vagy akár sejttípus specifikus vizsgálata ilyen módon csak akkor lehetséges, ha a KAT-2 expressziós mintázata ismert az egér agyszövetben is. Az enzim expressziós profilja, illetve pontos funkciója azonban nem tisztázott egér központi idegrendszerben.**

Az L-KYN könnyen átjut a vér-agy gáton (BBB), míg a KYNA penetrációja gyenge, így a KYNA szint növelésének egyik legegyszerűbb farmakológiai módja az L-KYN alkalmazása, ami korábbi tanulmányok alapján jelentős KYNA szint növekedést eredményez az agyszövetben *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Az *in vitro*, akut agyszelet preparátumok előnye, hogy segítségével a kinurenerg manipuláció szövet specifikusan, a perifériás KYNA funkció befolyásolása nélkül vizsgálható.

Míg patkány akut agyszeletekben igazolt, hogy a szeletek intenzív KYNA termelésre és annak felszabadítására képesek, egér akut agyszeletek esetén nincs adat sem a bazális, sem az L-KYN indukálta KYNA termelésről.

A KYNA termelődés csökkentésének vagy növelésének további lehetséges farmakológiai módja a KP enzimeinek gátlása. A KYNA szint növelhető a kinurenin monooxigenáz (KMO) gátlása révén, ami főként Alzheimer-kór és Huntington-kór modellekben vizsgált. Ezzel szemben jelentős KYNA szint csökkenés érhető el KAT-2 specifikus gátlószerekkel, amelyek a kognitív károsodások terápiás kezelése céljából vizsgáltak. **A KAT-2 enzim gátlás hatása egerekben nem vizsgált.**

A terápiás stratégiák hatékonyságát nehezítik a kinurenin rendszerbeli eltérések a különböző laboratóriumi fajok között. A KYNA szintézisében résztvevő KAT izoformáknak például eltérő szerepük lehet a fajokban. Az ember és patkány agyban bizonyítottan a KAT-2 a fő KYNA szintetizáló enzim, míg egér esetén kérdéses a KAT-2 funkciója. **Éppen ezért célszerű a kinurenin rendszer karakterizálása és a különbségek tisztázása a különböző modell állatokban a hatékony terápiás kinurenerg manipulációkhoz.**

2. Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka fő célja a kinurenin rendszer karakterizálása volt C57Bl/6 egér törzsből. Az útvonalon belül, a neuroprotektív stratégiák egyik fő célpontjának, a KYNA termelődésének anatómiai és funkcionális vizsgálatát végeztük egér agyszövetben.

Célkitűzés 1:

A KYNA szintéziséért felelős enzim, a KAT-2 lokalizációjának vizsgálata egér agyszövetben mRNS és fehérje szinten, szövettani, citokémiai és biokémiai módszerekkel.

Célkitűzés 2:

A KYNA termelődés *in vitro*, egér akut túlélő agyszeleteken történő vizsgálatára alkalmas inkubációs rendszer kialakítása és az agyszeletek állapotának karakterizálása több órás inkubációt követően.

Célkitűzés 3:

A bazális és L-KYN indukált KYNA termelődés vizsgálata egér akut túlélő agyszeletekben.

Célkitűzés 4:

A KAT-2 gátlás KYNA termelődésre gyakorolt hatásának vizsgálata egy szelektív KAT-2 enzim inhibitorral egér akut túlélő agyszeletekben.

3. Anyagok és Módszerek

Kísérleteinkben 8-12 hetes hím C57BL/6 egereket (n=36) használtunk fel.

3.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata

3.1.1 Szövet preparálás a hisztológiai vizsgálatokhoz

Az állatokat intraperitoneális (i.p.) uretán injekcióval (1.6 g/ttkg) altattuk és transzkardiálisan perfundáltuk 0,1 M foszfát-pufferrel (PB), majd 4%-os paraformaldehiddel (PFA). Az RNS *in situ* hibridizációs kísérletekhez az oldatokat dietil-pirokarbonáttal kezeltük (DEPC) az RNáz szennyeződés megelőzése céljából. A perfundálást követően az agyszöveteket egy éjszakán át 4% PFA-ban posztfixáltuk.

3.1.2 RNS *in situ* hibridizáció

A *kat-2* mRNS expresszió vizsgálatára RNS *in situ* hibridizációt végeztünk. Posztfixációt követően a szeleteket DEPC kezelt, 0,2 % Tween-20-t tartalmazó PB-ben (PBT) mostuk, proteináz K-val emésztettük, majd 4%-os PFA-ban posztfixáltuk. Alapos mosást követően a szeleteket 1 órán keresztül 65 °C-on hibridizációs pufferben prehibridizáltuk. A hibridizációt egy éjszakán, át 65 °C-on ugyanebben az oldatban végeztük kiegészítve a DIG-jelölt szensz és antiszensz *kat-2* RNS próbákkal (300 ng/ml). Másnap a szeleteket kimostuk, 1%-os normál számár szérumban (NDS) blokkoltuk, majd alkalikus-foszfátáz konjugált anti-DIG antitestben egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. A következő napon a mintákat nitroblue-tetrazólium-5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát szubsztrátot (NBT-BCIP) tartalmazó oldatba helyeztük. Az enzimreakciót PB-vel leállítottuk, majd a metszeteket vizes alapú fedőanyaggal (ProLong Gold) lefedtük.

3.1.3 Fluoreszcens immunhisztokémia

A KAT-2 fehérje expresszió vizsgálatára indirekt immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Posztfixációt követően a metszeteket 0,4% Triton X-100 (Tx100) detergenst tartalmazó PB-ben mostuk, majd 1 órán át 1%-os NDS-ben blokkoltuk. Ezt követően a metszeteket a megfelelő elsődleges antitestekben egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a fluorofórral kapcsolt másodlagos antitestekben a szeletek 2 órát inkubálódtak. A sejtmagokat a protokoll végén 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festékkel jelöltük.

3.1.4 Sejt transzfekció és immuncitokémia

Az immunhisztokémiai kísérleteink során a KAT-2 jelölésére használt elsődleges antitestünk specifitását *kat-2* cDNS-sel transzfektált HeLa sejt kultúrán (HeLa ATCC®CCL2™) teszteltük.

A sejteket poli-lizinált felületen szélesztettük, majd 37 °C-on és 5% CO₂ koncentráció mellett, 80%-os konfluencia szint eléréséig növesztettük. A sejtekbe ezután 2 µg *kat-2*cDNS vektort jutattunk transzfekciós reagens segítségével (FuGENE® HD Transfection Reagent). 48 órás inkubáció után a sejteket PBS-sel mostuk, 4%-os PFA-val fixáltuk, majd 0,1% Tx100-zal permeabilizáltuk. A nem specifikus antitestkötődést 3%-os marha szérum albuminnal (BSA) blokkoltuk. Ezt követően a sejteket az elsődleges antitestben egy éjszakán át, majd másnap a másodlagos antitestben 2 órán át inkubáltuk.

3.1.5 SDS gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot

Az anti-KAT-2 elsődleges antitestünk specifitásának további vizsgálatához SDS-PAGE és Western blot analízist végeztünk HeLa sejt kultúra, illetve egér agyszövet homogenizátumon.

A HeLa sejt kultúrát és az egér agyszövetet homogenizátumból származó fehérje mintákat 8%-os gélen elválasztottuk, majd polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra blottoltuk. A blottolást követően a membránt 1X PBST-ben mostuk,

5%-os zsírimentes tejporthoz tartalmazó oldatban blokkoltuk, majd egy éjszakán át az elsődleges antitestben inkubáltuk. Másnap a membránt tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestben inkubáltuk 1 órán át. Az immunreaktív band-eket kemilumineszcens kit segítségével detektáltuk. A membránokat Li-Cor C-DIGIT Blot szkennelvel digitalizáltuk.

3.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata

3.2.1 Szövet preparálás az *in vitro* kísérletekhez

Vibratóm (Leica VT1200S) segítségével 350 µm vastagságú túlélő hippokampális agyszeleteket készítettünk. Annak érdekében, hogy a KYNA koncentráció nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (HPLC) detektálható legyen, a szeleteket kis térfogatú ACSF-et tartalmazó inkubációs kamrákba helyeztük (6ml ACSF/6szelet/lyuk). A szeleteket a KAT-2 optimális működéséhez 30 °C-on, folyamatos oxigenáltatás mellett, perfúzió nélkül inkubáltuk.

3.2.2 Az *in vitro* kísérletsorozat csoportjai

Az *in vitro* rendszerünkben inkubálódó agyszeletek anatómiai és funkcionális karakterizálása során két csoportot vizsgáltunk: normál térfogatú ACSF-ben (~200 ml) inkubálódó agyszeleteket (**NT kondíció**) és a kinurenin rendszer vizsgálatára szolgáló, kis térfogatú ACSF-ben (6ml/6 szelet) inkubálódó agyszeleteket (**KT kondíció**). Az NT kondíció kontroll csoportként szolgált a KT kondíció karakterizálása során

Ezt követően, a KT kondícióban a bazális (**kontroll csoport**) és L-KYN indukálta (**L-KYN csoport**) KYNA termelődést, illetve a KYNA megoszlását vizsgáltuk. Az indukált KYNA termelődés vizsgálatához a szeleteket 10 µM L-KYN-ben inkubáltuk. A KAT-2 gátlás hatásának vizsgálatára egy specifikus KAT-2 gátlószert (PF-04859989, Sigma) alkalmaztunk. A gátlószert 5 µM-os koncentrációban használtuk.

3.2.3 HPLC

Az inkubáció során termelődő KYNA szintjének meghatározásához HPLC méréseket végeztünk az ACSF és szöveti mintákon egyaránt. A méréseket fluoreszcens és UV detektorral kombinált Agilent 1100 HPLC rendszer segítségével végeztük. A KYNA koncentráció meghatározásához a fluoreszcens detektort 344 nm excitációs és 398 nm emissziós hullámhosszra, míg a belső standard (3-NLT) mérésére az UV detektort 365 nm-re állítottuk. A kromatográfiai elválasztást Kinetex C18 oszlopon végeztük egy Security Guard C18-as előtét oszloppal.

3.2.4 Krezil ibolya festés

A hippocampusz CA1 és CA3-as sejtjeinek morfológiai változásait krezil ibolya festéssel vizsgáltuk az akut agyszeletekből készült 20 µm vastagságú metszeteken. A metszeteket leszálló alkohol sorban rehidratáltuk, majd 0,001%-os krezil ibolya festőoldatban 5 percig inkubáltuk. Mosást és szárítást követően a metszeteket xilol alapú fedőanyaggal fedtük, majd fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

3.2.5 Fluoreszcens immunhisztokémia

A c-Fos fehérje expressziós mintázatának, illetve a hippocampusz CA1 és CA3-as régió strukturális integritásának vizsgálatához (NeuN immunjelölés) immunhisztokémiai festéseket is végeztünk az NT és KT szeletekből készült metszeteken. A festési protokollt ld. 3.1.3 fejezetben.

3.2.6. *In vitro* elektrofiziológia

A szinaptikus funkció vizsgálatára az NT és KT szeleteken input/output (I/O) görbe felvételeket és páros pulzus elvezetéseket készítettünk 4 órás inkubációt követően a hippocampuszban. A szeleteket Haas típusú regisztráló kamrába helyeztük, majd a regisztráció során karbogénnel folyamatosan oxigenáltattuk. Az ingerléshez egy rozsdamentes, titánium-íridium ötvözetből készült koncentrikus

bipoláris fém elektródot, míg az elvezetéshez 1,5-3 M Ω ellenállású üvegelektrodát használtunk. Az elvezetett serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálokat (fEPSP) erősítettük és szűrtük (WPI AMP-04). Az adatokat digitalizáltuk (10KHz, Axon Digidata 1320A), majd AxonCLAMP 10 szoftver (Molecular Device) segítségével regisztráltuk.

3.2.7 Laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

A sejtmembrán integritásának és permeabilitás változásának meghatározására LDH enzim aktivitás vizsgálatot végeztünk. Az LDH aktivitást 30 perc és 4 óra inkubáció elteltével vizsgáltuk az ACSF-ben az enzim aktivitásának meghatározására szolgáló reagens készlet segítségével. A minták abszorbanciáját Biolis 24i Premium System készülék (Siemens) segítségével 340 nm-en, 37 °C-on mértük. A maximális LDH felszabadulás meghatározására a 4 órás inkubációt követően 1%-os Tx100-zal kezeltük a szeleteket

3.2.8 Hexokináz (HK) aktivitás mérése

A szövetek számára elérhető glükóz mennyiség, illetve a glükóz fogyás meghatározására glükóz HK aktivitás vizsgálatot végeztünk. A HK aktivitást 30 perc és 4 óra inkubációt követően vizsgáltuk az ACSF-ben az enzim aktivitásának meghatározására szolgáló, kétlépéses reagens készlet segítségével. A minták abszorbanciáját Biolis 24i Premium System készülék (Siemens) segítségével 340 nm-en, 37 °C-on mértük.

4. Eredmények és tárgyalás

4.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata

4.1.1 A KAT-2 lokalizációja mRNS és fehérje szinten

A *kat-2* mRNS és KAT-2 enzim lokalizációját a hippokampusz, striátum, prefrontális kéreg és substantia nigra területén vizsgáltuk. Korábbi patkányokon végzett kísérletekkel megegyezően, mRNS és fehérje szinten is jelentős volt a KAT-2 gliális lokalizációja az egér agy teljes területén.

Az asztrociták mellett azonban kifejezett volt az enzim neuronális jelenléte is. A KAT-2-t tartalmazó neuronok eloszlása sporadikus volt a hippokampusz, a dorzális striátum és a mediális prefrontális kéreg területén, míg nagyszámú neuron jelölődött a substantia nigra területén. A KAT-2⁺ neuronok nagy része - a substantia nigra pars compacta területét kivéve- GABAerg gátló neuron mind a négy vizsgált struktúrában.

Az egér agyszövetben megfigyelt gliális és neuronális expressziós mintázatot találtuk patkány agyszövet esetén is, ami a KAT-2 expressziós mintázatának filogenetikai konzerváltságát mutatja rágcsálókban.

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a KYNA termelésében az asztrociták mellett, a gátló GABAerg idegsejteknek is jelentős szerepük lehet rágcsálókban. A két sejtpopuláció fiziológias és patológias KYNA termelésben betöltött funkciójának tisztázása fontos a jövőben.

4.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata

4.2.1 Az akut agyszeletek strukturális és funkcionális integritása

A funkcionális vizsgálatok során egy általunk kifejlesztett *in vitro* inkubációs rendszert használtunk, ahol az akut agyszeletek kis térfogatú ACSF-ben inkubálódtak annak érdekében, hogy a várhatóan kis koncentrációjú KYNA HPLC-vel detektálható legyen. Annak tesztelésére, hogy az *in vitro* rendszerünkben az agyszeletek az inkubáció során megőrzik-e anatómiai és

funkcionális integritásukat, és a kísérletek során megfigyelt KYNA felszabadítás nem csupán a sejtek degradációjának eredménye –azaz a kistérfogatú kamrák alkalmasak hosszabb idejű *in vitro* farmakológiai kísérletek kivitelezésére– elsőként a szeletek életképességét és működőképességét vizsgáltuk biokémiai, szövettani és elektrofiziológiai módszerekkel.

A glükóz szint mérése alapján elmondható, hogy az agyszeletek metabolikusan aktívak, a glükóz szint fokozatosan csökken a KT rendszerben, azonban a szövetek működéséhez szükséges glükóz mennyiség hozzáférhető a számukra az ACSF-ben 4 óra elteltével is.

Az LDH szint fokozatosan növekszik az inkubáció alatt a felülúszóban, amely alapján a sejtmembránok integritása fokozatosan sérül, permeabilitásuk fokozódik az inkubáció alatt a KT kondícióban, azonban ez a sérülés még 4 óra elteltével is kismértékű figyelembe véve a maximális LDH felszabadulást.

A szövettani festések (NeuN, krezil ibolya) során kismértékű szövet károsodást figyeltünk meg. A hippokampusz CA1-es régiójában nem látható különbség az NT és KT szeletek között, a régió piramissejtjei megtartották jellegzetes sejtformájukat és méretüket. Míg a CA3-as régióban a sejtek láthatóan zsugorodtak, illetve a sejtek citoplazmájában a NeuN pozitivitás jelentősen lecsökkent.

Az agyszeletek funkcionális integritásának vizsgálatakor nem találtunk jelentős különbséget a Schaffer kollaterális-CA1 piramissejt szinapszisok általános szinaptikus funkciójában, illetve rövid távú plasztikus sajátságaiban az NT és KT kondíciók esetén.

Annak vizsgálatára, hogy a neuronok és asztrociták -a KYNA fő forrásainak- működése eltér-e az inkubációs rendszerünkben c-Fos immunjelölést végeztünk az NT és KT szeleteken. Az NT kondícióban szórványos, de intenzív neuronális c-Fos expresszió látható. A KT szeletek esetén a neuronális expresszió nagymértékben lecsökken, míg a fehérje expressziója jelentősen megnövekszik asztrocita sejtekben. Mindezek alapján a neuronok és asztrociták működése

változik a KT kondícióban, azonban az akut agyszeletek metabolikusan aktívak, anatómiai és funkcionális integritásuk nagymértékben megőrzött 4 óra elteltével is.

4.2.2 A bazális és L-KYN indukált KYNA termelődés egér agyszeletekben

Annak vizsgálatára, hogy az egér agyszeletek képesek-e KYNA-t termelni, és azt felszabadítani az *in vitro* rendszerünkben, valamint hogy lehetséges-e a KYNA termelés fokozása L-KYN adminisztrációval, HPLC méréseket végeztünk a felülúszóból és az agyszövetből egyaránt.

A bazális és L-KYN indukálta KYNA termelődés is mérhető volt a rendszerünkben. A kontroll csoporthoz képest, az ACSF és a szövet KYNA tartalma is szignifikánsan megemelkedett az L-KYN-nel kezelt csoportban, 4 órás inkubációt követően. Az ACSF KYNA szintje ~6-szoros, míg a szövet KYNA szintje ~4-szeres növekedést mutatott

A KYNA megoszlása az ACSF és szövet között nem változott jelentősen az L-KYN adminisztráció hatására. Az KYNA mennyiség túlnyomó hányada a felülúszóba került a kontroll csoport (~97%) és L-KYN kezelt csoport (~98%) esetén is 4 órás inkubációt követően. Az teljes KYNA mennyiség csupán 2-3%-a maradt a szövetben mindkét csoport esetén.

A KAT-2 funkciójának vizsgálatára egy specifikus, irreverzibilis gátlószert alkalmaztunk. A PF-04859989 5 μ M-os koncentrációban szignifikánsan csökkentette az ACSF KYNA tartalmát 4 órás inkubáció alatt. Az L-KYN csoporthoz képest, a PF-04859989 csoport KYNA szintje ~37%-kal csökkent a KAT-2 gátlás hatására.

A funkcionális vizsgálatokat összegezve elmondható, hogy az *in vitro* inkubációs rendszerünkben az akut agyszelet preparátumok integritása nagymértékben megtartott több órás inkubáció után is, így alkalmas a kinurenin rendszer vizsgálatára. Elsőként vizsgáltuk a KYNA termelődést egér akut agyszeletekben, amelyek eredményeink alapján jelentős KYNA termelésre és annak

felszabadítására képesek a rendszerünkben. Továbbá a folyamat nagymértékben gátolható egy szelektív KAT-2 enzim gátlóval.

Eredmények összefoglalása

Az eredményeink tükrében a célkitűzésekben feltett kérdéseinkre az alábbi válaszokat adhatjuk, illetve az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1) Elsőként vizsgáltuk és írtuk le a KYNA termelésében fontos enzim, a KAT-2 lokalizációját mRNS és fehérje szinten egér agyszövetben. A hisztológiai vizsgálatok alapján a KAT-2 asztrocita sejtekben és neuronokban is jelen van, utóbbi sejtpopuláció esetén a KAT-2⁺ sejtek nagy része GABAerg gátló idegsejt.

2) Eredményesen alkalmaztunk egy kisebb térfogatú *in vitro* inkubációs rendszert egér agyszeletek vizsgálatára. Teszteltük az *in vitro* inkubációs rendszerünkben az agyszelet preparátumok anatómiai és funkcionális integritását, ami 4 órás inkubációt követően is nagymértékben megőrzött. Így az inkubációs rendszerünk alkalmas további farmakológiai vizsgálatok elvégzésére.

3) Igazoltuk, hogy az agyszeletek intenzív KYNA termelésre és felszabadításra képesek és ez jelentősen fokozható a KYNA előanyagával, az L-KYN-nel. Mindezek alapján az egér akut agyszelet preparátumok alkalmasak a KYNA termelődés folyamatának és annak terápiás célú manipulációjának vizsgálatára *in vitro*.

4) Végül kimutattuk, hogy egy specifikus KAT-2 gátlószer jelentősen csökkenti a KYNA termelődését egér agyszövetben.

Összességében elmondható, hogy az általunk végzett anatómiai és funkcionális vizsgálatok, illetve azok eredményei a KYNA termelődés folyamatáról egér agyszövet esetén hiánypótolóak a szakirodalomban, és nagyban segíthetik a jövőbeni kinurenerg manipulációs kísérleteket.