

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

Összehasonlító Neurobiológia Program

Életmód vagy rokonság: a barna ásóbéka retinájának morfofunkcionális értékelése

PhD értekezés

Schäffer Dávid Antal

Témavezető:

Prof. Dr. Gábrriel Róbert

tanszékvezető egyetemi tanár

.....
Prof. Dr. Gábrriel Róbert
tanszékvezető egyetemi tanár

.....
Dr. Kerepesi Ildikó
a Biológiai Doktori Iskola titkára

PÉCS, 2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1 A barna ásóbéka (<i>Pelobates fuscus</i>) magyarországi elterjedése	5
1.2 A <i>Pelobates fuscus</i> életmódja.....	6
1.3 A szárazföldi békák látórendszerének szerkezete	8
1.3.1 A retina szövettana, sejttypusai és a retinális idegsejtek működési sajátosságai	8
1.3.2 A béka látórendszerének anatómiája: elsődleges és másodlagos központok	12
2. Célkitűzések	16
3. Anyag és módszer	17
3.1. Szövettani vizsgálatok	17
3.1.1 Fénymikroszkópos vizsgálati módszerek	17
3.1.2 Rutin elektronmikroszkópos vizsgálatok	17
3.1.3. Immunjelöléses kísérletek	18
3.1.4 A sejtek térbeli eloszlásának vizsgálata	20
4. Eredmények	22
4.1 A retina általános szerkezeti felépítése.....	22
4.2 Fotoreceptorok.....	22
4.2.1 A fotoreceptorok morfológiája és eloszlása	23
4.2.2 GABA tartalmú fotoreceptorok	25
4.3 Neurokémiai markerek, transzmitterek az amakrin sejtekben.....	29
4.3.1 GABA.....	29
4.3.2 Calretinin	29
4.3.3 Tirozin-hidroxiláz.....	31
4.3.4 Szerotonin.....	31
4.3.5 Substance P.....	31

4.3.6 Neuropeptid Y	31
4.3.7 Kolokalizációs vizsgálatok eredményei	33
4.3.7.1 Neuropeptid Y/Tirozin-hidroxiláz	34
4.3.7.2 Substance P/Substance K.....	35
5. Diszkusszió	38
5.1 A barna ásóbéka retinájának általános szerkezeti felépítése	38
5.2 A fotoreceptorok morfológiája és eloszlása	38
5.3 Neurokémiai markerek, transzmitterek az amakrin sejtekben.....	41
5.3.1 γ -amino-vajsav (GABA)	42
5.3.2 Calretinin	43
5.3.3 Tirozin-hidroxiláz.....	45
5.3.4 Szerotonin.....	46
5.3.5 Substance P.....	46
5.3.6 Neuropeptid Y	48
5.4. Életmód vagy rokonság?	49
6. Következtetések.....	51
7. Összefoglalás	52
8. Summary.....	53
9. Irodalomjegyzék.....	54
10. Saját közlemények	66
11. Köszönetnyilvánítás.....	68

1. Bevezetés

A kétéltűek osztályának három rendjébe (farkos-, farkatlan- és lábatlan kétéltűek) világszerte több, mint 6700 faj tartozik (Frost 2011). Az IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) legutóbbi felmérése szerint ezen fajoknak körülbelül 30%-a veszélyeztetett (IUCN 2011). Ezt erősítik meg az elmúlt évtizedek populációdinamikai és faunisztikai vizsgálatai is, melyek egyértelművé tették, hogy a kétéltűek egyed- és fajszáma világviszonylatban visszaszorulóban van, a kétéltűek száma a természetes élőhelyeken egyre kisebb (Wake 1991; Collins és Storfer 2003; Stuart és mtsai., 2004; Hayes és mtsai., 2010). Hazánkban e sajnálatos tényről kevés közlemény rögzíti (Puky 2000; Puky és mtsai., 2005), noha a kétéltűek és hullók vonatkozásában közfigyelmet kiváltó természetvédelmi erőfeszítések történnek (pl. békamentő akciók). Magyarországon a farkos kétéltűek rendjét 6, míg a farkatlan kétéltűek (békák) rendjét 8 faj képviseli, melyek mindegyike védelem alatt áll. A vizsgálataink alanyául választott barna ásóbéka (1. ábra) rokonsági viszonyait a dolgozatban megemlítésre kerülő többi békafajhoz képest a következő oldalon lévő kladogramon mutatjuk be. A kladogramot Cannatella (2008) munkája alapján készítettük.



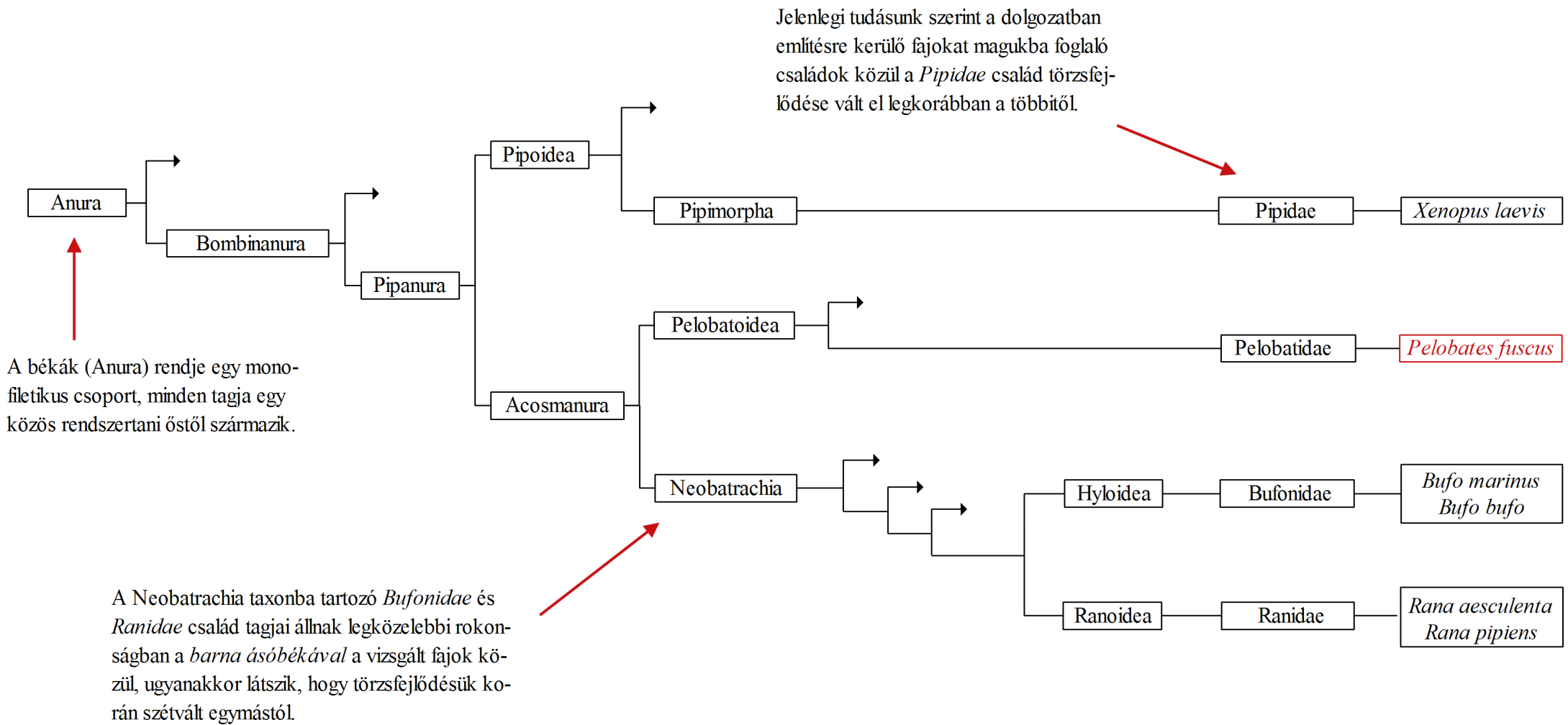
1. ábra. A barna ásóbéka (hím példány).

Rend

Rend alatti rendszertani kategóriák

Család

Faj



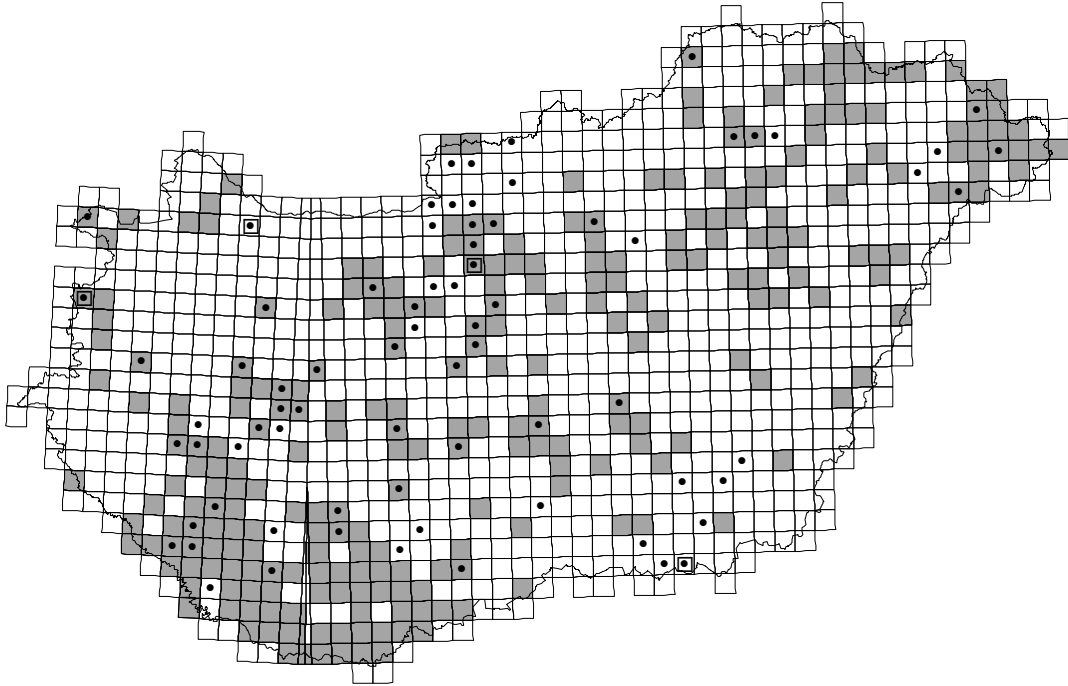
A békák (Anura) rendje egy monofiletikus csoport, minden tagja egy közös rendszertani őstől származik.

Jelenlegi tudásunk szerint a dolgozatban említésre kerülő fajokat magukba foglaló családok közül a *Pipidae* család törzsféjlődése vált el legkorábban a többtől.

A Neobatrachia taxonba tartozó *Bufonidae* és *Ranidae* család tagjai állnak legközelebbi rokonságban a barna ásóbékával a vizsgált fajok közül, ugyanakkor látszik, hogy törzsféjlődésük korán szétvált egymástól.

1.1 A barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) magyarországi elterjedése

A kisméretű, elegáns mintázatú, a természetben is csak ritkán megfigyelhető barna ásóbéka biológiájáról keveset tudunk. Földrajzi elterjedése Közép-, Kelet- és Délkelet-Európára terjed ki (Gasc és mtsai., 1997). Magyarországon főleg sík vidéken él, de néhány hegy- és dombvidéki lelőhelye is ismeretes (Korsós 1997). A Dél-Dunántúlon általánosan elterjedt, a Barcsi-borókás homokos területein nagy egyedszámban fordul elő. Rejtőzködő, éjszakai életmódja miatt azonban a pontos hazai elterjedési mintázatáról keveset tudunk. Az elterjedési adatok pontos dokumentációja azonban elengedhetetlen feltétele, hogy egy adott földrajzi egységben egy állatfaj helyzetét értékelni tudjuk (Gasc és mtsai., 1997). A kételtűek napjainkban történő rohamos visszaszorulása pedig tovább erősíti azt az igényt, hogy a fajok elterjedéséről hiteles képet alkossunk (Blaustein és Wake 1990). Fentiek miatt szakirodalomból, közgyűjteményekből és kutatóktól származó adatok alapján elkészítettük a barna ásóbéka magyarországi elterjedésének térképét (2. ábra). A térkép megrajzolásához felhasznált irodalmi adatok folyóiratokból, összefoglaló munkákból, könyvekből és egyéb kiadványokból származnak. Irodalmi adatnak tekintettük a Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium Természetvédelmi Hivatala (KvVM) könyvtárában fellelhető kutatási jelentésekből származó információkat is. Az adatokat Microsoft Acces (2002) adatbázisba rendeztük, és 10×10-es UTM négyzetek szerint rendszereztük. A lelőhely adatok nevezéktana és UTM rendszerű kódolása közben felmerülő kérdéses eseteknél Dévai és mtsai. (1997) munkáját tekintettük irányadónak. A rendelkezésünkre álló adatokból az ArcView 8.1 program segítségével megszerkesztettük a barna ásóbéka magyarországi elterjedését ábrázoló 10×10 kilométeres UTM (Universal Transverse Mercator) térképet (2. ábra). A térképen Gasc és mtsai. (1997) munkájához hasonlóan különböző módon jelöltük az 1900 előtti, 1900-1969 közötti és 1970 utáni adatokat. A 800 lelőhely adat 312 UTM négyzet területére esett, ami 29,6%-os lefedettséget jelent. A barna ásóbéka elterjedésére vonatkozó adatok többsége (~80%) az 1970 után végzett kutatások eredménye, ezért az elkészült térkép aktuálisnak mondható. A lelőhelyek eloszlása a lefedett terület nagyságától függetlenül arra utal, hogy a faj egyedei Magyarország egész területén előfordulnak. A kapott elterjedési mintázat alapján az előfordulási adatokat nehéz egyes régiókhoz, földrajzi egységekhez vagy talajtípusokhoz kötni. A térkép fehér foltjai a legtöbb esetben nem a faj, sokkal inkább a kutatottság hiányát jelzik.



2. ábra. A barna ásóbéka elterjedése Magyarország 10×10 km-es UTM-rendszerű hálótérképén.
(A szimbólumok a különböző időszakokból származó adatokra utalnak:
□: 1900 előtt, ●: 1900-1970 között, ■: 1970 után).

Rokonsági viszonyai szerint az ásóbékák családjának (*Pelobatidae*) még két fajtát kell kiemelnünk Európában. A Balkán-félszigeten honos szíriai ásóbékát (*Pelobates syriacus*) valamint az Ibériai-félszigeten honos zöld ásóbékát (*Pelobates cultripes*).

1.2 A *Pelobates fuscus* életmódja

A kifejlett barna ásóbéka testhossza 6-8 cm. Bőre sima. Az állat hátoldala olajzöld, világosbarna vagy szürkés árnyalatú, hosszanti foltokkal. A végtagok rövidek, a hátsó lábakon ásó alakú metatarzális tuberkulum található, melyet az állat az ásáshoz használ. A hímek mellső végtagjainak felső részén jól látható ovális mirigy figyelhető meg. A szemek nagyméretűek, a pupillák függőleges állásúak. Eddigi ismereteink alapján a *P. fuscus* aktivitása a naplementét követő órákban kezdődik, és körülbelül az éjfél követő néhány óráig tart, így az állat a nap nagy részét a talajba ásva tölti el, éjszaka aktív (Meissner 1983). Mivel általában a kétéltűek, és ezen belül a barna ásóbéka, napi aktivitását nagyban befolyásolja táplálékszükségletük, szaporodásuk, a búvóhelyek keresése, a predátorok elkerülése, megfelelő fiziológiai állapotuk

fenntartása valamint az időjárás is (Nöllert 1990), ezért a cirkadian aktivitást kísérleti körülmények között is igazoltuk. Ezt legegyszerűbben a mozgási, ezen belül is a táplálkozási aktivitással mérhetjük le a rejtőzködő életmódot folytató állatoknál. Kísérleteink arra irányultak, hogy az általános aktivitási mintázaton túlmenően a táplálkozás egyes mozgási fázisait is azonosítsuk. Ehhez egy 60x40 cm-es terráriumba helyeztük az állatokat, melyet tőzeg és homokos talaj 1:2 arányú keverékével töltöttünk meg 20 cm vastagon. A terráriumot természetes fényviszonyok között, szobahőmérsékleten helyeztük el. A terrárium közepére tettünk egy etetőt, amelyben mindig volt élő eleség. Erre a célra csontkukacot használtunk. Az állatok mozgását infrakamerával figyeltük meg, és videomagnóra rögzítettük. A felvételeken jól megfigyelhető volt, hogy a barna ásóbéka nem rendelkezik elől rögzített, kicsapható nyelvvel, mint a szárazföldi életmódot élő békák nagy többsége, ezért táplálkozási magatartása nagyban eltér a többi hazai békafajétól. A préda megszerzéséhez először közelebb kell kerülnie hozzá, majd a teljes testét koordinálva ráveti magát a táplálékra. A csontkukac szájüregbe juttatásában sok esetben a mellső végtagok is segítenek (ld. videomelléklet). Ezzel ellentétben a *Bufo* fajok táplálkozásuk során teljes sötétségben is nyelvüket használják a préda elejtésére (Aho és mtsai., 1993).

A vizsgálati időszakban a naplemente időpontja 19²⁵ és 19⁴⁰ közé esett, miközben a kísérleti állatoknál az első aktivitásokat 20³⁴ és 21⁴⁶ között, míg az utolsó aktivitásokat 1³⁰ és 2⁴⁰ között regisztráltuk. Ezen megfigyelések alapján elmondható, hogy a cirkadian aktivitás kísérleti körülmények között is hasonlóan alakult a természetben korábban megfigyeltekhez képest. Ellentmondásos azonban, hogy a nappali ragadozó kék vércse (*Falco vespertinus*) gerinces táplálékának mintegy 98 %-a barna ásóbéka, az egy-két hetes, pelyhes fiókák egyik legfontosabb tápláléka pedig szintén a barna ásóbéka (Purger 1998). A kék vércse táplálkozásbiológiájának megismerése alapján arra következtetünk, hogy a barna ásóbékának, legalábbis az év egyes szakaszaiban, nappal is lehet aktív időszak.

Ciklikus fény/sötét periódusokat átélő állatok esetében a cirkadian óramű legfontosabb bemenete a retinából érkezik. Emlősökben a retinohypothalamikus pályából az axonok a nucleus suprachiasmaticusba jutnak. A kétélűekben a látási információ feldolgozása a tectum opticumban történik, és direkt retino-hypothalamikus pályáról nem tudunk. Valószínűsíthető, hogy a kétélűek cirkadian ritmusának kialakításában a tobozmirigy és az általa termelt melatonin jelentős szerepet játszik. A barna ásóbékák migrációs aktivitására a csapadék mennyisége és a hőmérséklet

emelkedése hat serkentőleg a szaporodási időszakban. Ekkor a békák a vízben nappal és éjszaka is hallatják párzási hangjukat (Van Gelder és Hoedemaekers 1971). Gyomortartalom-vizsgálatokból származó adatok alapján arra következtettek, hogy a barna ásóbéka aktívan keresi táplálékát, mégis közvetlen bizonyíték arra, hogy e faj egyedei a szárazföldön is aktívak lennének a nappali órákban. Mindezen viselkedési tulajdonságok neurobiológiai hátteréről semmit sem tudunk, tehát ezen, természetes környezetünk szempontjából értékes faj védelmében sem tudunk érdemben tenni. Indokolt tehát e faj alaposabb kísérletes neurobiológiai vizsgálata.

Ismert adat, hogy a *Rana pipiens* fiziológiai látásélessége egyenes arányban nő a fényesség mértékével ($-3 \log \text{cd/m}^2$ és $+3 \log \text{cd/m}^2$ között; $2,5 \log \text{cd/m}^2$ -nél található a maximum felbontóképesség, Aho 1997). Hasonló adat nincs a barna ásóbékáról, mégis a rejtőzködő, éjszakai életmód miatt feltételezhető, hogy hamarabb eléri fiziológiai látásélessége maximumát.

1.3 A szárazföldi békák látórendszerének szerkezete

A fenti leírás alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a *P. fuscus* viselkedésmintázata megfejtésének egyik kulcsa a látórendszer – és ezen belül is a retina- szerveződésében keresendő. Mivel e faj tekintetében korábbi időkből egyetlen adat sem lelhető fel a szakirodalomban, úgy véljük, hogy a szárazföldi békák látórendszerének és ezen belül a retina általános szerkezetének ismertetése alapul szolgálhat az összehasonlító kutatások eredményeinek ismertetéséhez.

1.3.1 A retina szövettana, sejtípusai és a retinális idegsejtek működési sajátosságai

A béka retina felépítése jellegzetesen követi a valamennyi négylábú gerinces csoportra jellemző sémát. A retina a szemgolyó hátsó falához belülről hozzátapadt idegszövetből álló struktúra, ami a fényfelfogás és a fényfeldolgozás első elemi lépéseinek végrehajtására specializálódott. Sejtjei rétegekbe rendeződnek. Kívül, a retina pigment epitéljével szorosan összeszővődve található a fénytől elfordult fotoreceptorsejtek, amelyek sejttestjei alkotják a külső magvas réteget. A másodlagos neuronok (a bipoláris és horizontális sejtek), a harmadlagos neuronok egy része (az amakrin sejtek), valamint a retina fő gliaelemeinek (Müller sejtek) sejttestjei hozzák

létre a belső magvas réteget. A legbelső perikarionokat tartalmazó réteg a dúcsejtek rétege, amelyben ganglionsejtek és ún. “displaced” amakrin sejtek találhatóak. A magvas rétegekben helyet foglaló sejtestek nyúlványokat bocsátanak ki. A fotoreceptorok a bipoláris és horizontális sejtek nyúlványaival szinaptizálnak a külső rostos rétegben. A belső rostos rétegben a bipoláris és az amakrin sejtek a dúcsejtek nyúlványaihoz képest preszinaptikus helyzetűek, valamint az előző két sejtféleség mind pre-, mind posztzinaptikus is lehet egymáshoz képest. Ezen kívül az amakrin sejtek intenzíven szinaptizálhatnak egymással is (Dowling 1987).

A béka retina legnagyobb számban előforduló idegsejtjei a fotoreceptorok. Két alapvető fotoreceptor típus (csap és pálcika) lelhető fel: mindkét típus sötétben tonikusan bocsátja ki transzmitterét, a glutamátot. Ugyancsak mindkettő hiperpolarizál fény hatására, időszakosan csökkentve ezzel a kibocsátott transzmitter mennyiségét (Hensley és mtsai., 1993; Thoreson és Witkovsky 1999). A pálcikák békákban gyakran kétfélék (ú.n. major és minor pálcikák) melyek színanyaga legintenzívebben a zöld, illetve a piros hullámhossztartományban nyeli el a fényt (Witkovsky és mtsai., 1981a). A csapok minimálisan két típusa szinte minden eddig részleteiben vizsgált béka retinában fellelhető, még azokban a fajokban is, ahol a színlátás szerepe minimális pl. a táplálkozásban és a párkeresésben (Röhlich és mtsai., 1989; Wilhelm és Gábel 1999; Gábel és Wilhelm 2001).

A bipoláris sejteknek mintegy 10 féle variációja ismert gerincesekben (Kolb és mtsai., 1981), és ez a megállapítás a békákra is igaz. (Shkolnik-Yarros és Podugolnikova 1978). A bipoláris sejteknek funkcionálisan két alapvető típusát tudjuk elkülöníteni. Az ON bipoláris sejtek depolarizálódnak ha a receptív mezőjük közepét pontszerű fénnel megvilágítjuk, míg az OFF bipoláris sejtek ugyan erre a stimulusra hiperpolarizációval válaszolnak. (Stone és Schütte 1991). Ez attól függ, hogy mely glutamát receptort hordozza a sejt a fotoreceptorokkal alkotott szinapszisában. Ha a receptor alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionate (AMPA)- vagy kainsav-érzékeny glutamát receptor, akkor a fotoreceptor jelének polaritása konzerválódik, és a bipoláris sejt hiperpolarizáló, kikapcsolási sejt-ként (OFF sejt) viselkedik (Brandstätter és mtsai., 1997). E sejtek axonjai a belső rostos réteg külső 1/3-ában végződnek, és az ott található dúcsejtek dendritjeivel szinaptizálnak (Stone és Schütte 1991). Ha a bipoláris sejt glutamát receptora az ún. 2-amino-4-foszobutirát (APB) receptor -azaz a metabotrop glutamát receptor 6-os típusú- akkor a fotoreceptor jelének polaritása megfordul, és a bipoláris sejt depolarizáló, bekapcsolási sejt-ként (ON sejt) viselkedik

(Slaughter és Miller 1981). Ez esetben axonja a belső rostos réteg belső 2/3-ában végződik, és az ott lévő dúcsejtek dendritjeivel szinaptizál (Stone és Schütte 1991). A pálcikák ON bipoláris sejtekkel szinaptizálnak, míg a csapok ON és OFF bipoláris sejtekkel is létesítenek kapcsolatot.

A gerincesek többségében - így a békákban is - a dúcsejteket anatómiai tulajdonságaik alapján (dendritfa mérete, orientációja és elágazásainak száma, kapcsolatok a bipoláris illetve amakrin sejtekkel) mintegy 10-20 típusba soroljuk (Straznicky és Straznicky 1988). A dúcsejtek specializált típusai különböző jellegű információt (szín, kontraszt, orientáció, mozgás, tárgyméret) továbbítanak az agyi központokba (Maturana és mtsai., 1960; Miller és Dacheux 1976), mozaikjaik általában szabályosak (Tóth és Straznicky 1989), fényre adott válaszuk lehet ON, OFF vagy ON-OFF, mind tranziens mind tonikus jelleggel (Miller és Dacheux 1976). A retinában a fő információ-továbbító útvonal a fotoreceptor \Rightarrow bipoláris sejt \Rightarrow dúcsejt útvonal. E láncban csaknem valamennyi sejt transzmittere a glutamát (Thoreson és Witkovsky 1999). Egysejt elvezetési vizsgálatok megmutatták, hogy minden ganglion sejtnek van térbelileg jól meghatározható receptív mezeje, integrálási ideje és jellegzetes spektrális érzékenysége (Dowling 1987). Multielektrodás elvezetési kísérletek eredményeiből a kutatók azonban arra a következtetésre jutottak, hogy az egymás közelében elhelyezkedő ganglion sejtek tüzelési mintázata szoros összefüggést mutat (Meister és mtsai., 1995; Warland és mtsai., 1997). Az akciós potenciálok erőssége és időbeli szinkronizációja arra utal, hogy az egymás közelében lévő ganglion sejtek osztoznak a fotoreceptoroktól - interneuronok közbeiktatásával kémiai szinapszisokon keresztül - érkező információkon, valamint serkentő beidegzést kapnak elektromos szinapszisokon keresztül amakrin sejtektől és a szomszédos ganglion sejtektől is (Brivanlou és mtsai., 1998).

A retinális információfeldolgozás a két szinaptikus rétegben a horizontális illetve amakrin sejtek által generált jeleket is integrálja. E sejtek szintén a fotoreceptor illetve bipoláris sejtektől kapják a bemeneteiket, míg kimeneteik vagy visszacsatolnak arra a sejt típusra, amelytől a bemenet érkezett, vagy előrecsatolnak a bipoláris illetve ganglionsejtek dendritjeire (Dowling 1987). A horizontális és amakrin sejtek működése hozza létre a központ-környéki organizáció rendszerét. Nem tudjuk, hogy melyik sejt típus mivel járul hozzá ezen tulajdonság kialakításához, de annyi bizonyos, hogy elsősorban GABAerg, kisebb mértékben glicinerg szinapszisoknak van ebben szerepük (Frumkes és mtsai., 1981).

A horizontális sejtek a külső plexiform réteg síkjában laterálisan létesítenek összeköttetést a fotoreceptorokkal kémiai szinapszisokon keresztül, míg a horizontális sejtek egymáshoz elektromos szinapszisokon keresztül kapcsolódnak. A béka retinában a horizontális sejtek 2 morfológiailag és fiziológiailag elkülöníthető csoportba sorolhatók (Stone és mtsai., 1990). Az egyik horizontális sejttípus minden esetben rendelkezik axonnal (Gábrriel és Wilhelm 2001), és ez a sejtfeleség mindig GABAerg (Mosinger és mtsai., 1986).

Az amakrin sejteknek mintegy 20 különböző típusa ismeretes (Vígh és mtsai., 2000). Ezek a sejtek a retina jellegzetes axon nélküli interneuronjai, amelyek diverzitása felülmúlja az agykérgi interneuronokét. mtsai., mtsai., Fő transzmittereik a γ -amino-vajsav (GABA) (35-60%) és a glicin (25-40%), amelyek mindegyike számos sejttípusban előfordul (Pourcho és Goebel 1985; Mosinger és mtsai., 1986; Yang és mtsai., 1991). Több kisebb, funkcionálisan és/vagy neurokémiaailag jól körülírt sejtpopuláció is ismeretes. Monoaminokat, acetilkolin, nitrogén-monoxid szintázt és neuropeptideket tartalmaz az amakrin sejtek néhány százaléka (max. 10%), de ezek a transzmitterek/modulátorok általában GABA-val együtt fordulnak elő (Vígh és mtsai., 2000).

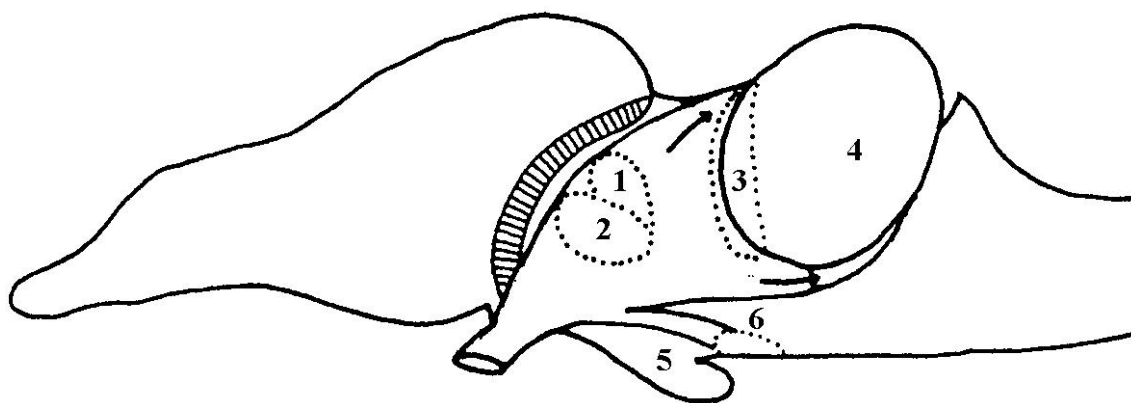
A gerincesek legtöbbet tanulmányozott amakrin sejttípusa a szűk dendritmezejű AII-es amakrin sejt, amelyet több emlős fajban sikerült azonosítani. Ez a sejt a pálcika bipoláris sejtekkel és a csap bipoláris sejtekkel szinaptizálva megteremti a kapcsolatot a pálcikákból és a csapokból kiinduló neuronális útvonalak között. Az AII sejtek glicinerg gátló neuronként viselkednek (Pourcho 1996; Menger és mtsai., 1998). Alacsony fényviszonyok mellett a pálcika bipolárisoktól érkező glutamát hatására depolarizálódnak és glicint szabadítanak fel. Ez az OFF csap bipolárisokon keresztül gátolja az OFF ganglion sejteket, miközben az AII sejtek réskapcsolatokon (gap junction) keresztül depolarizálják az ON csap bipoláris sejteket, és ezáltal az ON ganglion sejteket is, valamint az egymással létesített réskapcsolatokon keresztül az AII sejtek segítik a jel szétterjedését. Az OFF útvonal gátlása és az ON útvonal serkentése, illetve ezek egymással való összehangolása révén az AII amakrin sejtek egyedi szerepe alacsony fényviszonyok között mutatkozik meg leginkább, amikor a pálcikáktól érkező jelek átviteli sebességét és amplitúdóját is megemelik (Nelson 1982). Ezt a sejttípust kétélűekben - az eddigi ismereteink szerint - nem sikerült igazolni.

Egy másik speciális amakrin sejttípus a starburst amakrin sejt, amelynek dendritfája közel tökéletes sugaras szimmetriát mutat és acetyl-kolin mellett GABA-t is felszabadít. Ez a sejt kulcsszerepet játszik a látott kép mozgási irányának meghatározásában azáltal, hogy asszimmetrikus GABAerg gátlást fejt ki az irányszelektív ganglion sejteken (Zhou és Lee 2008).

Az amakrin sejtek egy speciális osztályaként foghatók fel az interplexiform sejtek. Dendritjeik a belső rostos rétegben vannak. Ezek fogadják a szinaptikus bemeneteket, de emellett maguk is adnak kimenő szinapszisokat. Egyetlen axonjuk a külső rostos réteg irányába halad, ahol gazdagon elágazhat. Transzmitter-tartalmuk szerint a békákban lehetnek dopamin (Witkovsky és mtsai., 1994), vagy glicin tartalmúak (Smiley és Basinger 1988) – ez utóbbiakban szomatosztatin is kolokalizálható. Fiziológiai tulajdonságaik nagyrészt ismeretlenek.

1.3.2 A béka látórendszerének anatómiája : elsődleges és másodlagos központok

A kétélűeknek nincs agykéreg, a legfőbb látóközpont a középagyi tectum opticum. A retina a tectum mellett a diencephalon elülső harmadába lévő thalamikus magvakba (nucleus Bellonci és corpus geniculatum thalamicum), az area pretectalisba és a nucleus basalis opticusba is küld rostokat (Pollák 1998, 3. ábra).



3. ábra: A látópálya részei békában. 1: nucleus Bellonci, 2: corpus geniculatum laterale, 3: area pretectalis, 4: tectum opticum, 5: hypothalamus, 6: nucleus basalis opticus.

A látórostok az említett struktúrák felszínéhez közel elhelyezkedő neuropil régióban végződnek. Ezeket a neuropil-területeket az alattuk csoportosuló sejtek dendritjei alakítják ki. A sejtek csak a tectumban helyezkednek el szabályos rétegekben, a többi

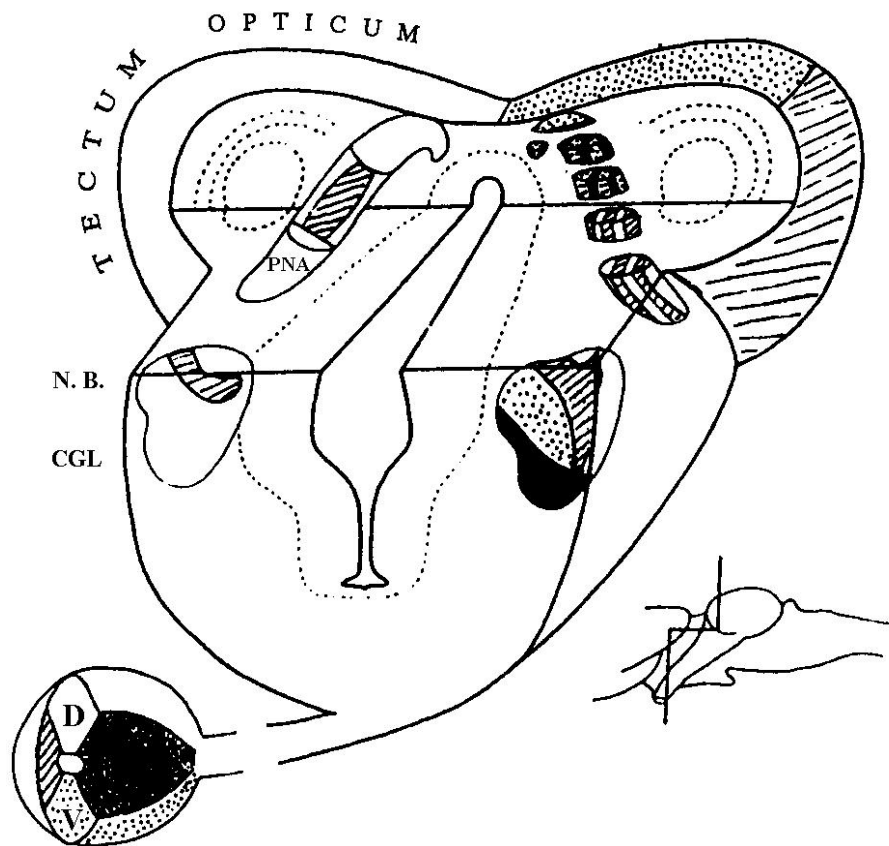
központban szabálytalan alakzatokba rendeződve láthatók. A nucleus Bellonci és a corpus geniculatum thalamicum kialakításában elsősorban a corpus geniculatum laterale, a nucleus postero-centralis és az area ventro-lateralis vesz részt. A pretektalis area neuropiljét a nucleus postero-lateralis és a nucleus magnocellularis pretektalis neuronjai hozzák létre (Lázár és Székely 1969; Lázár 1975; Scalia 1976; Wye-Dvorak és mtsai., 1992).

A látópályát a retinális ganglionsejtek axonjai alkotják, amelyek a diencephalon alapján csaknem teljesen kereszteződnek (ez a chiasma opticum), és csak ezután lépnek a központi idegrendszerbe. A tractus opticusból a látóideg-kereszteződés közelében válik ki a járulékos látópálya, a tractus opticus accessorius, amely elhagyva a látóideg-kereszteződést a hypothalamus dorsalis szegélyén halad hátrafelé és a nucleus basalis opticusban ér véget. A látópálya kereszteződés után a diencephalon lateralis felszínén fut, elhagyja a thalamus és az area pretektalis területét, majd a tectum ventro-lateralis szegélyét előlről elérve szétterülve hátra és felfelé halad tovább (Scalia 1976). A látópálya kapcsolata valamennyi látóközponttal bilaterális és a nucleus opticus basalis kivételével retinotopikusan rendezett. Így, bár a thalamikus és pretektalis retinotopikus organizáció nem olyan finom, mint a retina tectalis leképeződése, minden megnevezett neuropil teljes retinális térképet hordoz. Ez azt valószínűsíti, hogy ezek a régiók funkcionálisan is különböznek (Lázár 1971; Scalia 1976; Székely és Lázár 1976, 4. ábra).

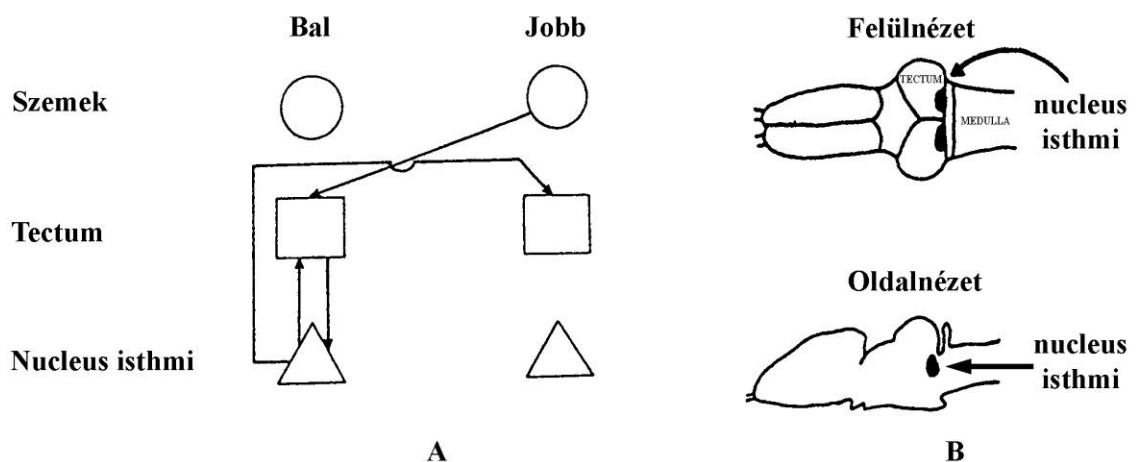
A retinális ganglion sejtek axonjainak projekcióját a látóközpontokba anterográdf vizsgálatokkal végezték. Ezen területekre mindkét szemből érkeznek optikus rostok, azonban az ipsilaterális projekciók száma lényegesen kisebb (kb. 4%) a kontralaterális retinából érkezőknél (Wye-Dvorak és mtsai., 1992). Neurotranszmitter tartalmukat tekintve ezen rostok nagy többsége glutamaterg (Gábrriel és Straznický 1995), míg 2-3%-uk GABAerg immunreaktív ganglion sejtekből származik (Gábrriel és mtsai., 1992).

A retino-tectalis pálya békákban több mint 99%-ban keresztezett. Azon állatokban, ahol a szemek nem a fej két oldalán helyezkednek el, az ipsilateralis vetület kialakulásával együtt megjelenik a binokuláris látás (Beazley és mtsai., 1972). Az ipsilateralis retino-tectalis kapcsolat kialakításában a caudalis mesencephalonban lévő nucleus isthmi játszik döntő szerepet. Ez továbbítja az azonos oldali tectumfélből származó vizuális információt az ellenkező oldali tectumba a postopticus commissurán keresztül (Grobstein és mtsai., 1978, 5. ábra). A nucleus isthmi kontralaterális

projekciót adó neuronjainak morfológiája, száma, a sejtek szerveződése fajoként különböző, ami összefüggésben lehet a vizsgált fajok eltérő viselkedésével (Tóth és mtsai., 1994).



4. ábra: A retina és a látóközpontok kapcsolatai békában topografikusan rendezettek. CGL: corpus geniculatum laterale, NB: nucleus Bellonci, PNA: pretektalis neuropil area, D: dorsalis-, V: ventralis retina quadráns. A kicsinyített képen a vonal a metszés síkjait jelöli (Lázár és Székely 1969).



5. ábra. A: a nucleus isthmi és a tectum kapcsolatai (Glasser és Ingle 1978; Gruberg és Lettvin 1980; Fisher és Udin 1988). **B:** a nucleus isthmi anatómiai helyzete (Caine és Gruberg 1985).

A látórendszer legfontosabb feladatai közé tartozik a préda felsimerése és elfogásának koordinálása, valamint a predátorok felismerése és a menekülési folyamatok inicializálása. Elsősorban *Rana* fajokon végzett vizsgálatok igazolják, hogy a nisztagmus vizsgálata segít megérteni a fontos viselkedési mintázatokat. Ezen módszertan alapján mi is megkíséreltünk sztereotíp viselkedéseket azonosítani a barna ásóbékánál. A vertikális nisztagmus vizsgálatokat egy 30 cm átmérőjű, 4 cm széles fekete-fehér sávzású forgó dob apparátussal végeztük, melynek forgási sebessége $13^\circ/s$, így egy fehér sáv áthaladási ideje 1,2 másodpercnek adódott. A megfigyelt sztereotíp viselkedési formák túlnyomó többségükben azonosak a *Rana* fajoknál tapasztaltaknál, azonban az ásást csak a barna ásóbéka esetében figyeltük meg. További különbség még, hogy a fejforgatás és a fordulás sokkal kevésbé kifejezett a barna ásóbéka esetében, valamint a nisztagmus létrejötte is hosszabb latenciaidővel jelentkezik, mint a *Rana* fajoknál. Ez is bizonyítja, hogy a látórendszer működési paramétereiben jelentős eltérések tapasztalhatók.

2. Célkitűzések

Hipotézisünk szerint a speciális életkörülmények és a környezethez való alkalmazkodás tükröződnek a *Pelobates* retina szerveződési és élettani sajátásaiban, ezért a többi fajtól jelentősen eltérő retinaszerkezet feltárását vártuk vizsgálatainktól. A retinavizsgálatok során két kiemelt sejttípusra, a fotoreceptor sejtekre és a retinán belüli legdiverzebb sejtfeleségre, az amakrin sejtekre fókuszáltunk. Ennek tekintetében célkitűzéseink a következők voltak:

- a *barna ásóbékára* jellemző neurobiológiai sajátágok összehasonlítása a lényegesen jobban tanulmányozott békafajokkal (*Bufo*, *Xenopus* és *Rana*) a retinaszerkezet és neurokémia tekintetében
- a fotoreceptor sejtek retinán belüli eloszlásának, morfológiájának és neurotranszmitter tartalmának vizsgálata
- az amakrin sejtek morfológiájának, neurotranszmitter tartalmának vizsgálata

A kérdések megválaszolásához mikroszkópos anatómiai megfigyeléseket és immunhisztokémiai jelöléseket alkalmaztunk, melyeket rutin elektronmikroszkópos vizsgálatokkal egészítettünk ki.

3. Anyag és módszer

3.1 Szövetani vizsgálatok

Vizsgálataink során mindkét nemből származó, 12 darab kifejlett ásóbékát (*Pelobates fuscus*) használtunk fel. Az egyedeket a Duna-Dráva Nemzeti Park engedélyével gyűjtöttük be, és az NIH (National Institutes of Health) valamint az ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) állatetikai standardjait betartva használtuk fel kísérleteinkben. Uretán altatás után az egyedeket dekapitáltuk, a szemeket jéghideg foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS, pH 7,4) gyorsan kiboncoltuk, az üvegtestet és a szemlencsét eltávolítottuk és szemserleg (eye-cup) preparátumokat készítettünk. A GABA kimutatását célzó vizsgálatok némelyikében ezeket 1 mM-os GABA oldatban (béka ringerben oldva), O₂/CO₂ 95%/5%-os keverékének folyamatos adagolása mellett inkubáltuk 30 percig.

3.1.1 Fénymikroszkópos vizsgálati módszerek

Az általános retinaszerkezet tanulmányozásához a *Pelobates* retinákból nappali fényviszonyok mellett készített szemserleg preparátumokat 4%-os pufferelt paraformaldehid oldatban fixáltuk egy éjszakán keresztül, 4°C-on. Felszálló alkoholsorban történő dehidráció után a szövetdarabokat Durcupan ACM oldatba ágyasztuk be és egy MT 7000-es típusú ultramikrotommal 2 µm vastag félvékony metszeteket készítettünk, melyeket 1%-os toluidinkék oldattal festettünk meg.

3.1.2 Rutin elektronmikroszkópos vizsgálatok

A szemserlegekből kisebb szövetdarabokat vágunk ki és elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára 2,5% glutáraldehid és 2% paraformaldehid, foszfát-pufferben (PB) feloldott keverékében 4°C-on egy éjszakán át rögzítettük. A további folyamatokat standard hisztotechnikai protokollok alapján végeztük (Molnár és Gábrriel 2001). Először 6x10 perc mosás következett PB-ben, majd utórögzítés 0,5% OsO₄-ban 1 órán át. A mintákat dehidráltuk felszálló etanolsorban, majd tiszta propilén-oxidban tartottuk 15 percig. Ezután propilén-oxid és műgyanta (Durcupan ACM) 1:1 arányú keverékében inkubáltuk 2 órán át, ezután tiszta gyantába helyeztük az anyagokat éjszakára. Friss

gyantát kevertünk a beágyazáshoz, majd 56°C-on 36 órán keresztül polimerizáltuk az anyagokat. A metszés MT 7000 ultramikrotómmal történt (70-80 nm-es ultravékony metszetek), majd ólom-citrátos kontrasztolás után JEOL 1200 EX elektronmikroszkópban vizsgáltuk meg az anyagokat.

3.1.3 Immunjelöléses kísérletek

Az eye-cup és teljes retina (wholemout) preparátumokat 4 %-os paraformaldehidben és - csak a GABA immunreaktivitás kimutatásához használt preparátumokat - 0,2%-os glutáraldehidben fixáltuk 4 órán keresztül 4 °C-on, majd PBS-ben mostuk. A fixált preparátumokat 30 %-os szacharóz oldatban tartottuk minimum 4 óráig, majd kriosztáttal 14-16 µm vastag keresztmetszeteket készítettünk - 20 °C-on. A metszeteket zselatinos tárgylemezre vittük fel, amelyeket felhasználásig - 20 °C-on tároltunk. Ezeket 0,3 %-os tritonos PBS-el kezeltük, majd 30 percig antitest hígítóval (ABS) előinkubáltuk. Az ABS 0,1 M-os foszfát pufferben feloldott 1%-os bovin szérin albumin, 0,1%-os Triton-X 100 és 1%-os Na-azid keverékéből állt, amelyhez közvetlenül az előkezelések megkezdése előtt 3-5% normál kecske szérumot adtunk. Az immunjelöléses kísérleteket az 1. táblázat szerinti összeállításban végeztük el. Számos specificitáskontrollt is beiktattunk (primer antitestek kihagyása az inkubációs sorból, a másodlagos antitestek keresztreaktivitásának kizárása, egyes esetekben előabszorpciós kísérletek). A primer antitesteket szobahőmérsékleten 15-18 óráig hagytuk a metszeten, majd a fluoreszcens jelöléshez a primer antitestnek megfelelő, fluoroforhoz kapcsolt szekunder antitesteket alkalmaztuk kb. 4 órán keresztül, melyeket 1:200 arányban hígítottunk ABS-ben. Ezután a metszeteket PBS-el mostuk. A preparátumok fedéséhez VectaShield-et (Vector Laboratories) használtunk, majd a kész metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

Néhány esetben teljes retinapreparátumokat készítettünk, a szemserleg preparátumok rétegekre való szétbontásával. Ezeken az anyagokon GABA, COS-1 és Neuropeptid Y (NPY) immunjelöléseket hajtottunk végre, az avidin-biotin módszer alkalmazásával. Röviden, a primer antitest alkalmazása után a biotinilált szekunder antitestet helyeztük a kísérleti anyagokra (általában 1:100 hígításban (Jackson Immunochemicals), amelyet az Extravidin komplex (Sigma) követett, 1:200 hígításban. Az immunreakciót 0,03% -os diaminobenzidin és 0,01%-os H₂O₂ alkalmazásával hívtuk elő.

1. táblázat: A kísérletekben használt antitestek összefoglalása.

FITC: fluorescein isothiocianát, TRITC: tetramethylrhodamin- isothiocianát, TR: Texas Red

A. Antitestek az általános neurokémiai markerek vizsgálatához

Előabszorpciós kísérlet	Elsődleges antitestek	Másodlagos antitestek
Neuropeptid Y MP Biomedicals	NeuropeptideY (nyúl), SIGMA (1:1000)	Szamár anti-nyúl FITC
Nem volt	Tirozin-hidroxiláz (TH) (egér), SIGMA, (1:1000)	Szamár anti-egér TRITC
Nem volt	Calretinin (nyúl), Chemicon (1:1000)	Kecske anti-nyúl FITC
Nem volt	Szerotonin (nyúl), SIGMA (1:1000)	Kecske anti-nyúl FITC
Nem volt	Szomatosztatin (nyúl), Chemicon (1:1000)	Kecske anti-nyúl FITC
Nem volt	COS-1 (egér, Prof. Dr. Szél Ágoston ajándéka, 1:1000) (Szél és mtsai., 1989)	Kecske anti-egér FITC

B. GABA kimutatása

Előabszorpciós kísérlet	Elsődleges antitestek	Másodlagos antitestek	Jelölés
Nem volt	Nem volt	Szamár anti-nyúl FITC, Szamár anti-egér TR	Nincs jel Nincs jel
Nem volt	GABA (nyúlban termelt; Sigma; 1:1000-5000)	Szamár anti-egér TR	Nincs jel
Nem volt	GABA (egérben termelt; Sigma; 1:3000-10000)	Szamár anti-nyúl FITC	Nincs jel
Nem volt	GABA (nyúlban termelt; Sigma; 1:1000-5000)	Szamár anti-nyúl FITC	Erős jel
Nem volt	GABA (egérben termelt; Sigma; 1:3000-10000)	Szamár anti-egér TR	Erős jel
GABA-glutaraldehyd- BSA komplex	GABA (nyúlban termelt; Sigma; 1:3000)	Szamár anti-nyúl FITC	Nincs jel
	GABA (egérben termelt; Sigma; 1:3000)	Szamár anti-egér TR	Nincs jel
Nem volt	GABA (nyúlban termelt; Sigma; 1:3000) és GABA (egérben termelt; Sigma; 1:3000)	Szamár anti-nyúl FITC és szamár anti-egér TR	Erős jel mindkét szűrőn keresztül

C. Substance P és Substance K egymás melletti kimutatása

Előabszorpciós kísérlet	Elsődleges antitestek	Másodlagos antitestek	Jelölés
Nem volt	Nem volt	Szamár anti-patkány FITC Szamár anti-nyúl TR	Nincs jel Nincs jel
Nem volt	Substance P (patkányban termelt; BD-Pharmingen, 1:1000)	Szamár anti-patkány FITC Szamár anti-nyúl TR	Erős jel Nincs jel
Nem volt	Substance K (nyúlban termelt; Calbiochem, 1:400)	Szamár anti-patkány FITC Szamár anti-nyúl TR	Nincs jel Erős jel
Substance K (MP Biomedicals)	Substance K (1:400) Substance P (1:1000)	Szamár anti-nyúl FITC Szamár anti-patkány TR	Nincs jel Erős jel
Substance P (MP Biomedicals)	Substance K (1:400) Substance P (1:1000)	Szamár anti-nyúl FITC Szamár anti-patkány TR	Erős jel Nincs jel
Nem volt	Substance P és Substance K	Szamár anti-patkány FITC és szamár anti-nyúl TR	Erős jel Erős jel

A wholmountokat glicerinen fedtük és tároltuk, míg néhány kisebb darabot Durcupan ACM gyantába ágyasztunk és azokból 2 µm-es metszeteket készítettünk, amiket Permout-ban fedtünk le.

Digitális fotókat Nikon Eclipse 80i mikroszkóp segítségével készítettünk, amelyet egy hűtött CCD kamerával szereltek fel. A képeket a Spot szoftver segítségével rögzítettük, és Adobe Photoshop 7.0 programmal dolgoztuk fel. A feldolgozás során csak a kontrasztot változtattuk meg; ezen kívül elrendeztük, táblákba rendeztük és jelölésekkel láttuk el a képeket.

3.1.4 A sejtek térbeli eloszlásának vizsgálata

Neurolucida 3.23 (MicroBrightField, Inc.) program segítségével rekonstruáltuk az összes NPY pozitív sejt térbeli elhelyezkedését egy wholmount preparátumon. A sejtek eloszlási mintázatának meghatározásához a Neuroexplorer 3.03a programmal számoltuk ki a sejtek közötti átlagos legközelebbi szomszéd (nearest neighbour) távolságot, míg az analízist az alábbi formula alapján végeztük:

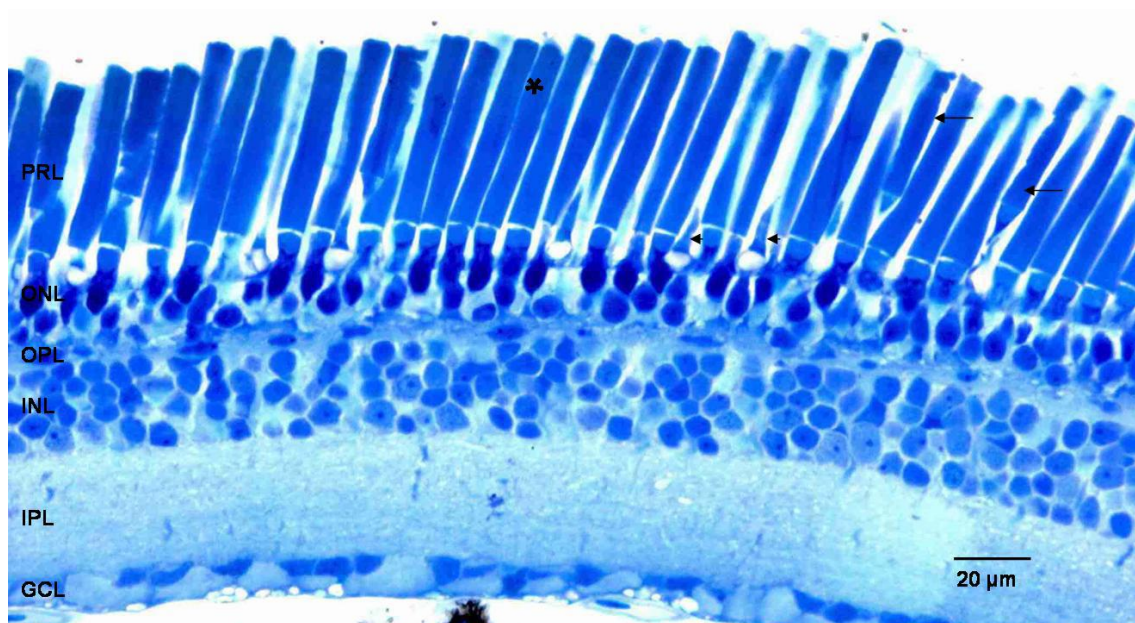
$$Rn = \frac{\overline{D(Obs)}}{0,5\sqrt{\frac{a}{n}}}$$

ahol **Rn**: a nearest neighbour érték, **D(Obs)**: a megfigyelt legközelebbi szomszéd távolságok átlaga, **a**: a vizsgált terület nagysága, **n**: az összes mért pont száma. **Rn** értéke 0 és 2,15 között egyenletesen változhat, ahol a 0-hoz közeli értékek a sejtek nagyfokú csoportosulására, az 1-hez közeli értékek a sejtek véletlenszerű eloszlására, míg a 2,15-höz közelítő értékek a sejtek egyenletes térbeli eloszlására utalnak.

4. Eredmények

4.1 A retina általános szerkezeti felépítése

A *P. fuscus* retinaszerkezete nem tér el jelentősen az eddig vizsgált négy lábú gerinces fajokétól. Az összes szövettani réteg azonos az emlősökével, és finomabb szövettani szerkezet tekintetében a *Xenopus*, a *Bufo* és a *Rana* fajokhoz nagyon közel áll (6. ábra). A retina szövettani rétegei (fotoreceptor réteg: photoreceptor layer, PRL; külső sejtes réteg: outer nuclear layer, ONL; külső rostos réteg: outer plexiform layer, OPL; belső sejtes réteg: inner nuclear layer, INL; belső rostos réteg: inner plexiform layer, IPL; dúcsejt réteg: ganglion cell layer, GCL) jól megfigyelhetők, vastagságuk egymáshoz viszonyított aránya szintén hasonlít a többi, fent említett békafajéhoz (Gábrriel és Wilhelm 2001).



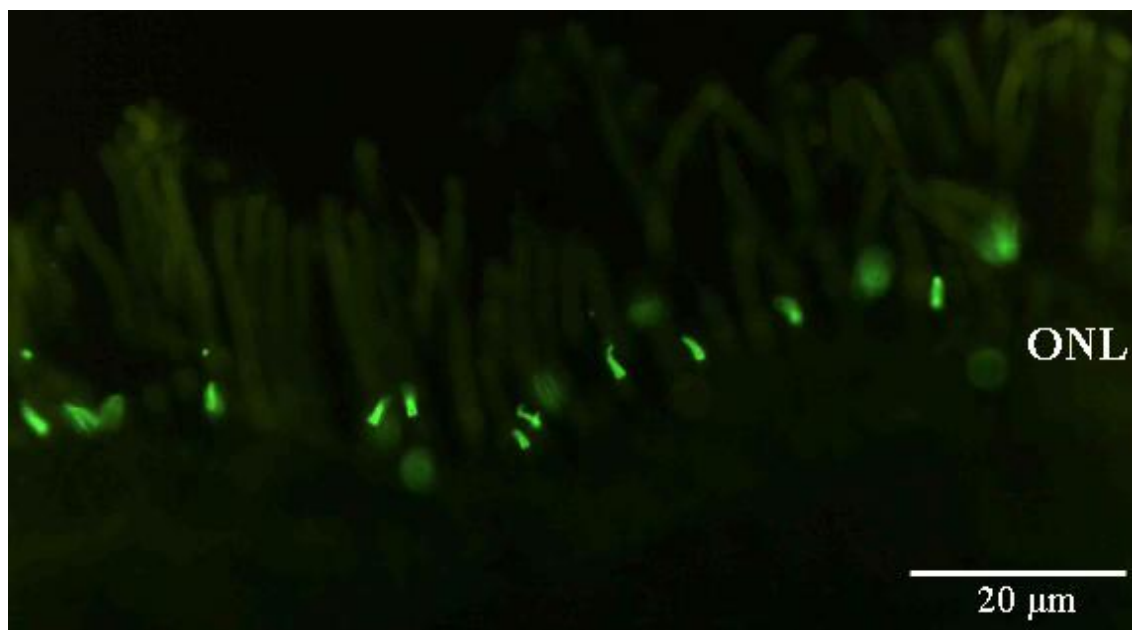
6. ábra. Toluidinkékkel festett félvékony metszet a barna ásóbéka retinájából (nyílhegy: csap, nyíl: minor pálcika, csillag: pálcika).

4.2 Fotoreceptorok

A fotoreceptor sejtek helyzete és alapvető morfológiai sajátosságai a keresztmetszeti képen a békáknál szokásos helyzetet tükrözi. Részletesebb analízis azonban feltár néhány, e fajra jellemző eltérést az általános mintázattól.

4.2.1 A fotoreceptorok morfológiája és eloszlása

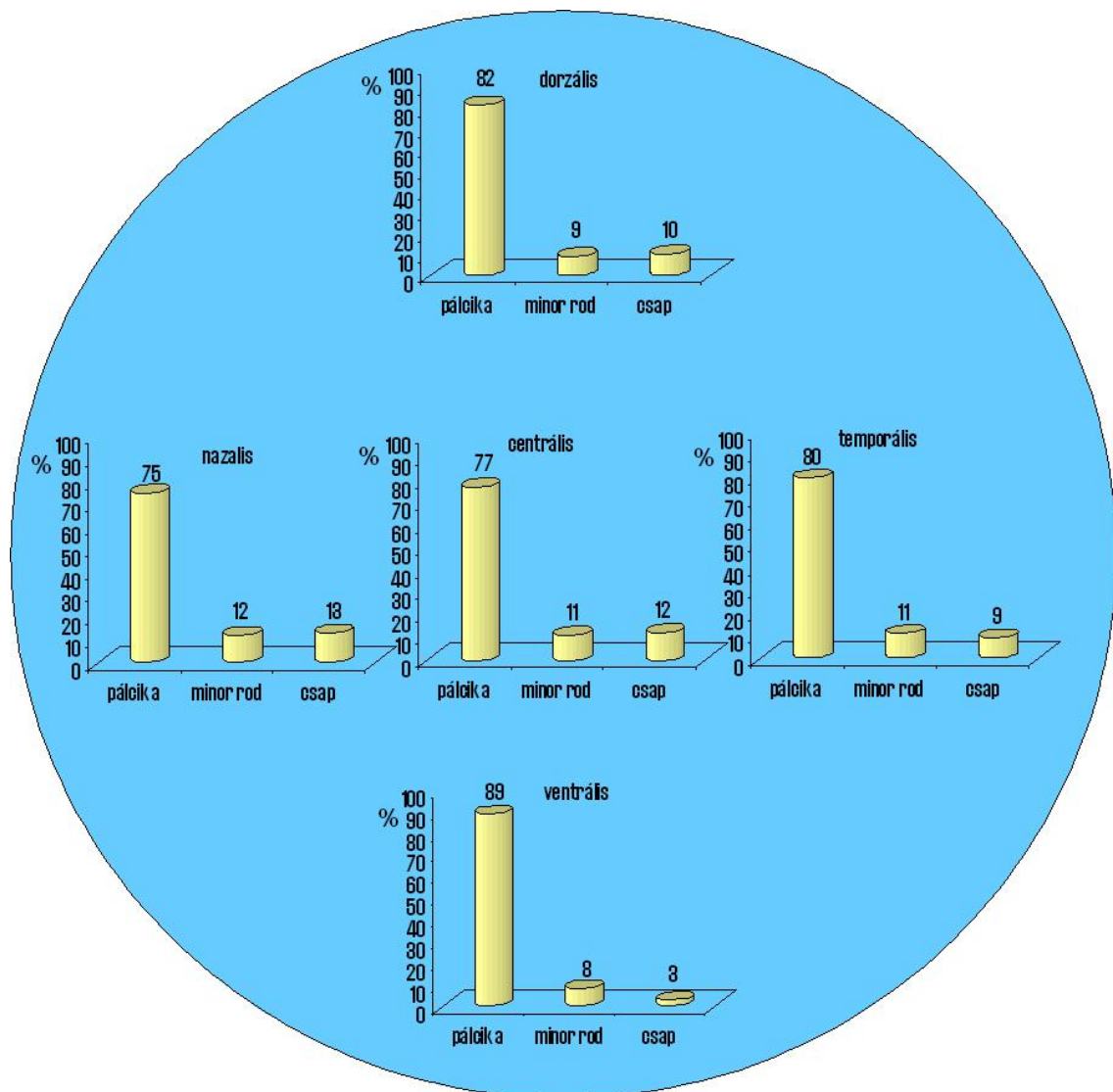
A toluidinkékkel festett félvékony metszetek alapján kétféle pálcika (minor és major) és egyféle csap különíthető el (6. ábra). A minor pálcikákat rövidebb külső szegmensük alapján tudtuk azonosítani, amit a nagymértékben elvékonyodó belső szegmens köt össze a sejttesttel. A csapok egyértelmű jelenlétét immuncitokémiai vizsgálatokkal, csap-opszin ellen termelt antitest alkalmazásával (COS-1) bizonyítottuk (7. ábra).



7. ábra. A fluoreszcens mikroszkópos felvételen egyértelműen azonosíthatóak a csap opszinhez kötődött antitestek.

Összesen 1975 fotoreceptort számoltunk meg a retina 5 különböző területéről (dorzális, nazális, ventrális, temporális, centrális) készült, toluidinkékkel festett félvékony metszeteken. Meghatároztuk a csapok és pálcikák arányát. A csapok az összes fotoreceptornak csak körülbelül 10 %-át teszik ki, ami az eddig vizsgált béka fajokhoz képest nagyon alacsony érték. Eredményeink azt mutatják, hogy a centrális és a nazális oldalon nagyobb, míg a ventrális oldalon kisebb a csapok aránya a pálcikákéhoz képest (8. ábra). Azért, hogy pontos képet kapjunk a csapok retinális eloszlásáról COS-1 antitesttel kezelt teljes retina preparátumokat is készítettünk (9. ábra). Mind az öt kitüntetett retinaponton elvégeztük a csapok számolását manuálisan és az ImageJ 1.32 program segítségével is. Összesen 11355 csapot számoltunk meg és a területi eloszlásukat vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a csapok denzitása a

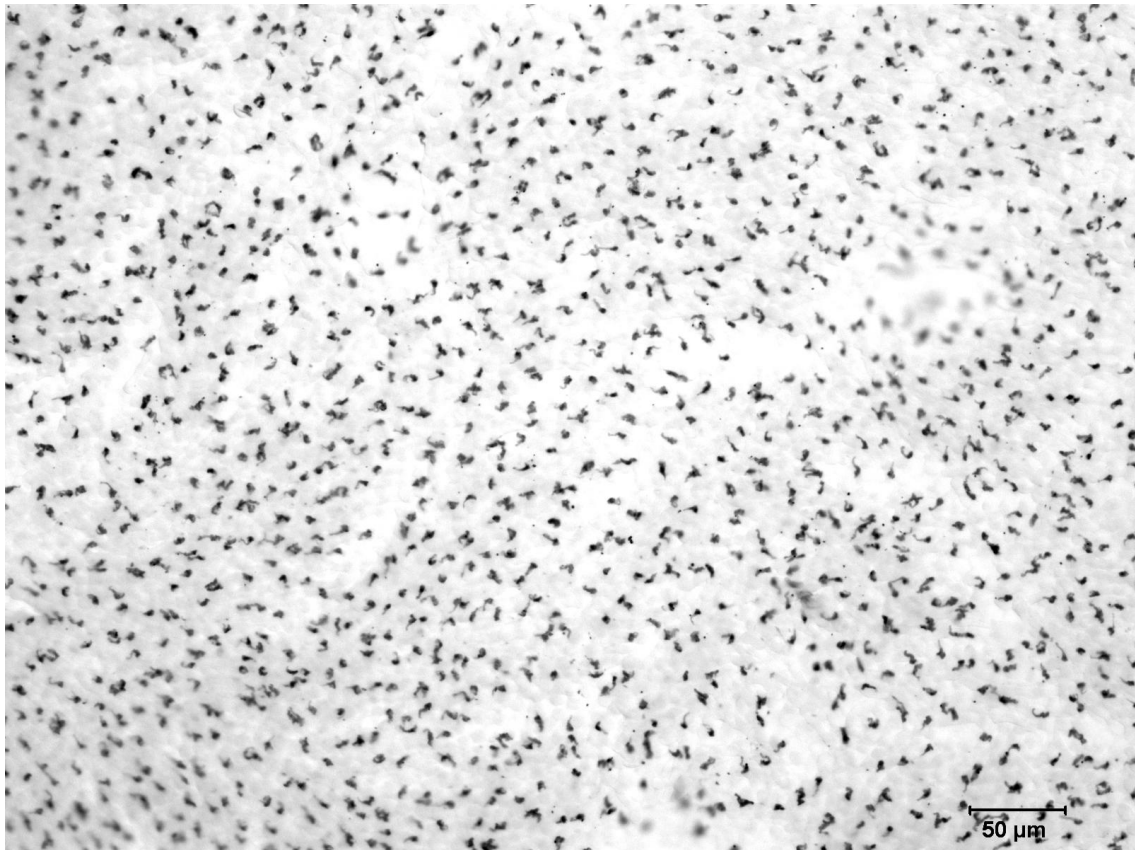
retina centrális részén a legnagyobb, míg a ventrális részen a legkisebb (2. táblázat), ami alátámasztja a toluidinkéssel festett metszetek vizsgálatából származó eredményeket.



8. ábra: A fotoreceptorok százalékos eloszlása a különböző retina felszíneken.

2. táblázat: A csapok denzitása a retina különböző területein.

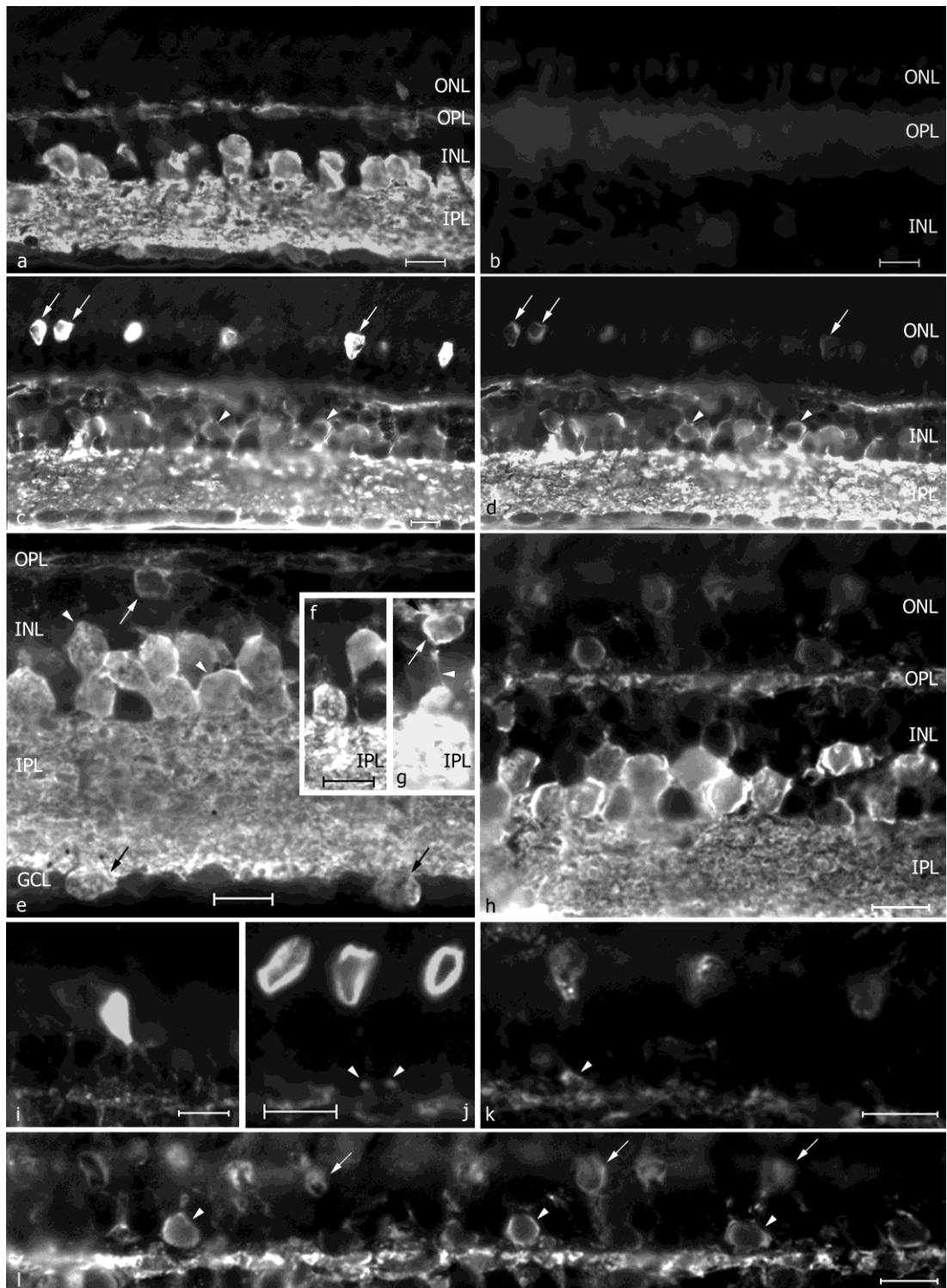
	dorzális	temporális	nazális	centrális	ventrális
denzitás (db/mm ²)	4860	4180	5566	7612	3908



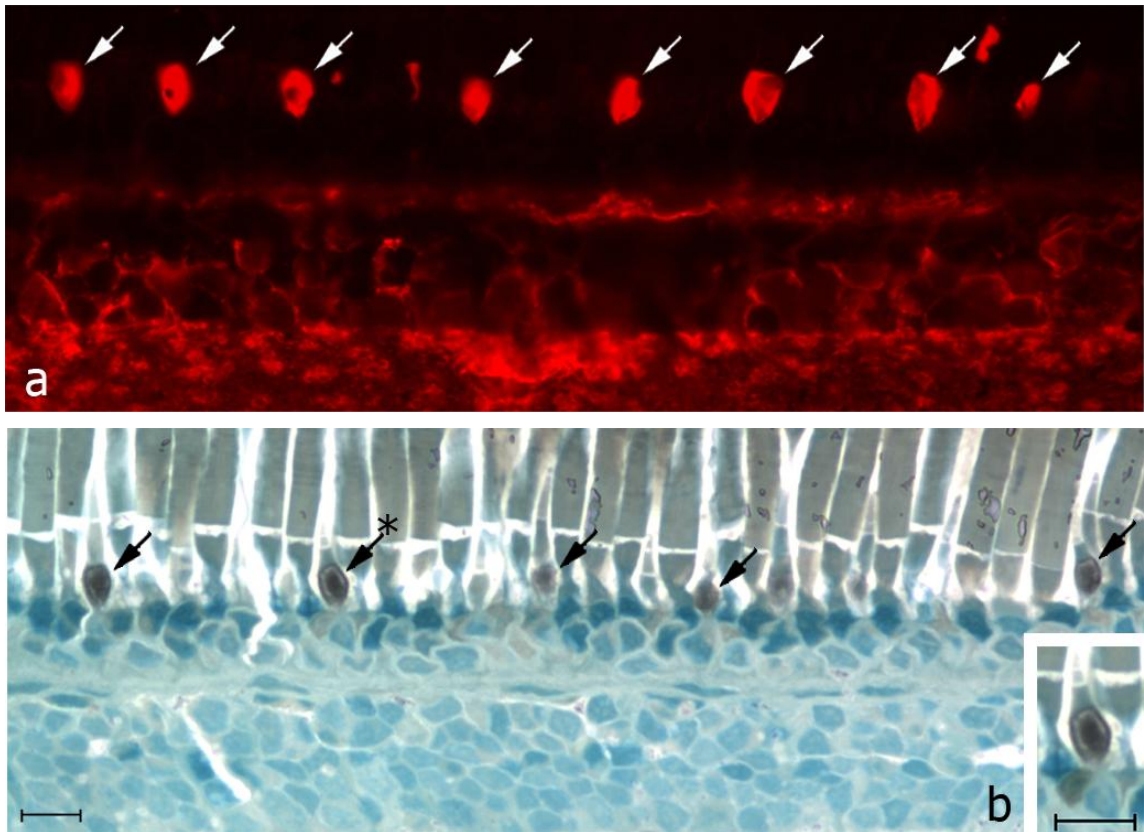
9. ábra. Fénymikroszkópos felvétel a COS-1 antitesttel jelölt wholemount preparátumból, amelyen a sötét foltok jelölik a csapokat.

4.2.2 GABA tartalmú fotoreceptorok

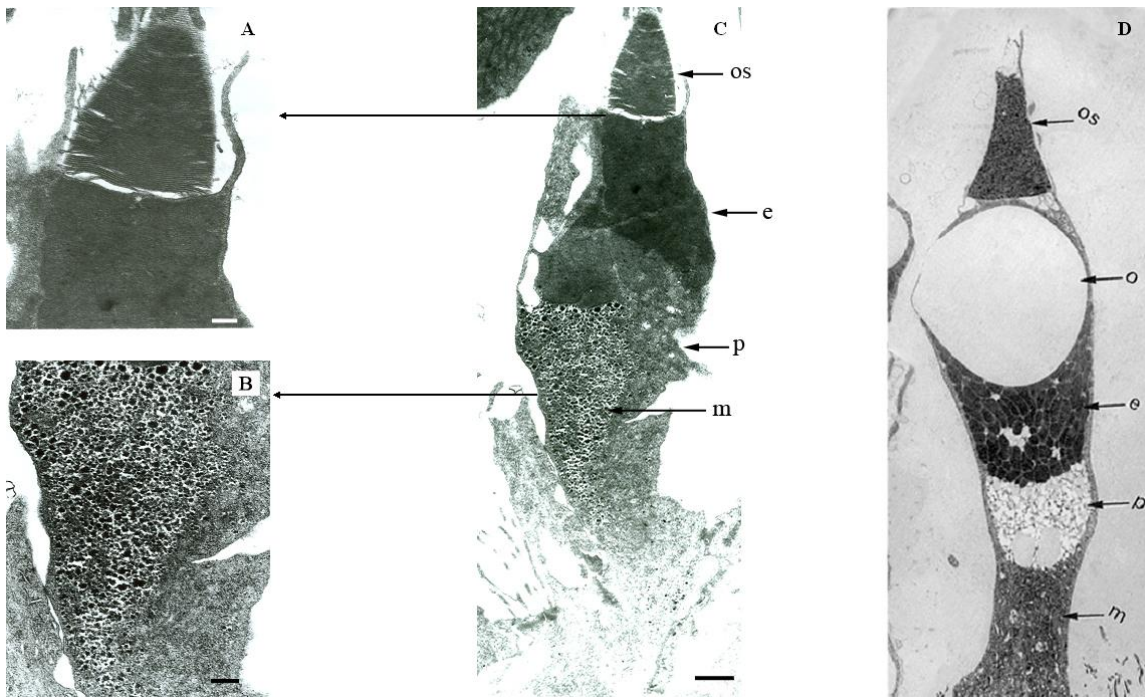
Amikor a *Pelobates* retina GABA-immunreaktivitást mutató elemeit vizsgáltuk (10. ábra, a kép), felfedeztük, hogy a más kétlétű fajoknál szokásos GABA-eloszlási mintázat mellett, egyes struktúrák a fotoreceptorok rétegében (ONL) is rendszeresen jelölődnek GABA-val (10. ábra, c, d, és i-l képek). A GABA immunjelölést preabszorpciós kísérletekben gátolni tudtuk (10. ábra, b kép), ha az elsődleges antitestet egy éjszaka GABA-glutaraldehyd-BSA komplexben előkezeltük (tízszeres antigéntöménység mellett, függetlenül attól, hogy poliklonális vagy monoklonális antitestet alkalmaztunk). A fotoreceptor rétegben jelölődött sejtestek átmérője 5-6 μm volt, a külső szegmensekre a jelölés nem terjedt ki (10. ábra, a kép). Gyantába ágyazott preparátumon a GABA-pozitív sejtek, mint csapok voltak azonosíthatók a ritkás eloszlásuk és rövid, kúpszerű külső szegmensük alapján (11. ábra, b kép). A GABA-pozitív csapok számát összevetve a toluidinkékkel festett és a fluoreszcens mintákkal úgy tűnik, hogy minden csap GABA-pozitív. A henger alakú külső szegmessel rendelkező pálcikák egyike sem bizonyult GABA-immunreaktívnak.



10. ábra. GABA-immunreaktivitás a *Pelobates fuscus* retinájában. ONL: külső sejtés réteg, OPL: külső rostos réteg, INL: belső sejtés réteg, IPL: belső rostos réteg, GCL: dúcsejtréteg. Aránymérték: 10 μ m. (a) GABA-immunreaktivitás a retinában. (b) Preabszorpciós kísérlet. (c, d) Monoklonális és poliklonális szérum jelölésmintázata (nyilak: sejtek az ONL-ben, nyílhegyek: sejtek az INL-ben). (e) GABA-pozitív horizontális (fehér nyíl) és amakrin (fehér nyílhegy) sejtek, továbbá neuronok a GCL-ben (fekete nyilak). (f) Két, különböző pozíciójú GABA-immunreaktív amakrin sejt az INL-ben. (g) GABA-immunreaktív bipoláris sejt (sejttest: fehér nyíl, dendrit: fekete nyílhegy, axon: fehér nyílhegy). (h) GABA-pozitív struktúrák a retina külső rétegeiben, 1 mM GABA-val történt preabszorpciót követően. (i–k) Jelölt sejtek a fotoreceptor rétegben preabszorpció nélkül (i és j) és preabszorpció után (k). Néhány esetben a belső szegmensek erősen jelölődtek (j). Az OPL-en lévő immunreaktív pontokról (nyílhegyek a j és k ábrán) feltételezzük, hogy a GABA-pozitív fotoreceptorok terminálisai. (l) Sejttestek (nyílhegyek) és belső szegmensek (nyilak) is jelölődtek preabszorpció után. (i–l) Immunreaktív sejtek a fotoreceptor rétegben (nyilak és nyílhegyek).



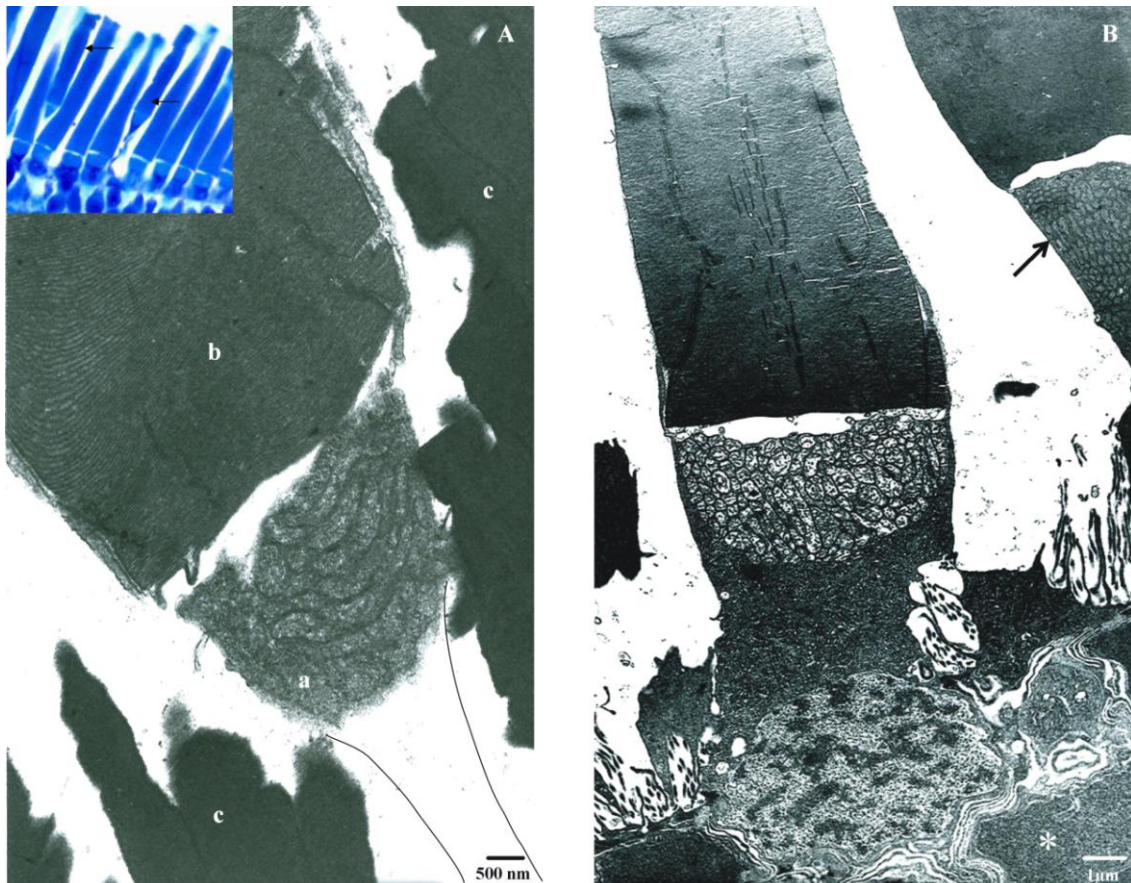
11. ábra. GABA-immunreaktív fotoreceptor sejtek a *Pelobates* retinában. Aránymérték: 10 μ m. **(a)** GABA-immunreaktív fotoreceptor sejttestek (nyilak). **(b)** a GABA-immunreaktív fotoreceptorok (nyilak) félvékony metszetekben könnyen azonosíthatóak külső szegmensük alapján. Az inzerten egy immunreaktív sejt (csillag) nagyított képe látható.



12. ábra. A *Pelobates fuscus* és *Xenopus laevis* csap szerkezetének összehasonlítása. **A:** kinagyított rész a csap külső szegmenséből, **B:** szemcsés struktúra a belső szegmens alján, **C:** csap a *P. fuscus* retinájából, **D:** csap a *X. laevis* retinájából (forrás: Röhlich és Szél 2000). os: külső szegmens, o: olajcsepp, e: ellipszoid, p: paraboloid, m: myoid. Aránymérték: A, B kép: 200 nm, C kép: 1 μ m.

A fotoreceptorok ultrastruktúráját megvizsgálva megállapítottuk, hogy a csapok egyértelműen azonosíthatóak (12. ábra, a kép), de eltérnek a *Xenopus* csapoktól (12. ábra, d kép) abban, hogy nincs bennük olajcsepp, hanem annak helyén egy szemcsés, elektrondenz mátrix figyelhető meg.

A pálcikák vizsgálata is meglepő eredményre vezetett. A fénymikroszkópos metszeteken azonosított major és minor pálcika mellett azonosítani tudtunk egy olyan fotoreceptor sejtet, ami minden tulajdonságában a major pálcikákra emlékeztetett, kivéve, hogy sejttestjében a sejtmag a szokványostól eltérő, laza kromatinszerkezetet mutat (13. ábra, B kép). Ezek a sejtek mindig a fotoreceptorok legkülső sejt sorában foglaltak helyet. Ultravékony metszetekben egész metszetszíneket áttekintve arányuk alacsony volt, a pálcikákon belül 1-3% között ingadozott.



13. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a barna ásóbéka retinájában található pálcika típusokról. **A:** minor pálcika; **(a)** belső szegmens (a belső szegmens proximális folytatását a könnyebb áttekinthetőség érdekében sematikusan berajzoltuk), **(b)** külső szegmens, **(c)** major pálcika külső szegmens. **B:** az általánostól eltérő magyszerkezetű major pálcika (nyíl: normál pálcika belső szegmens, csillag: normál pálcika magjának részlete). **inzerit kép:** minor pálcikák (nyilak) fénymikroszkópos képe.

4.3. Neurokémiai markerek, transzmitterek az amakrin sejtekben

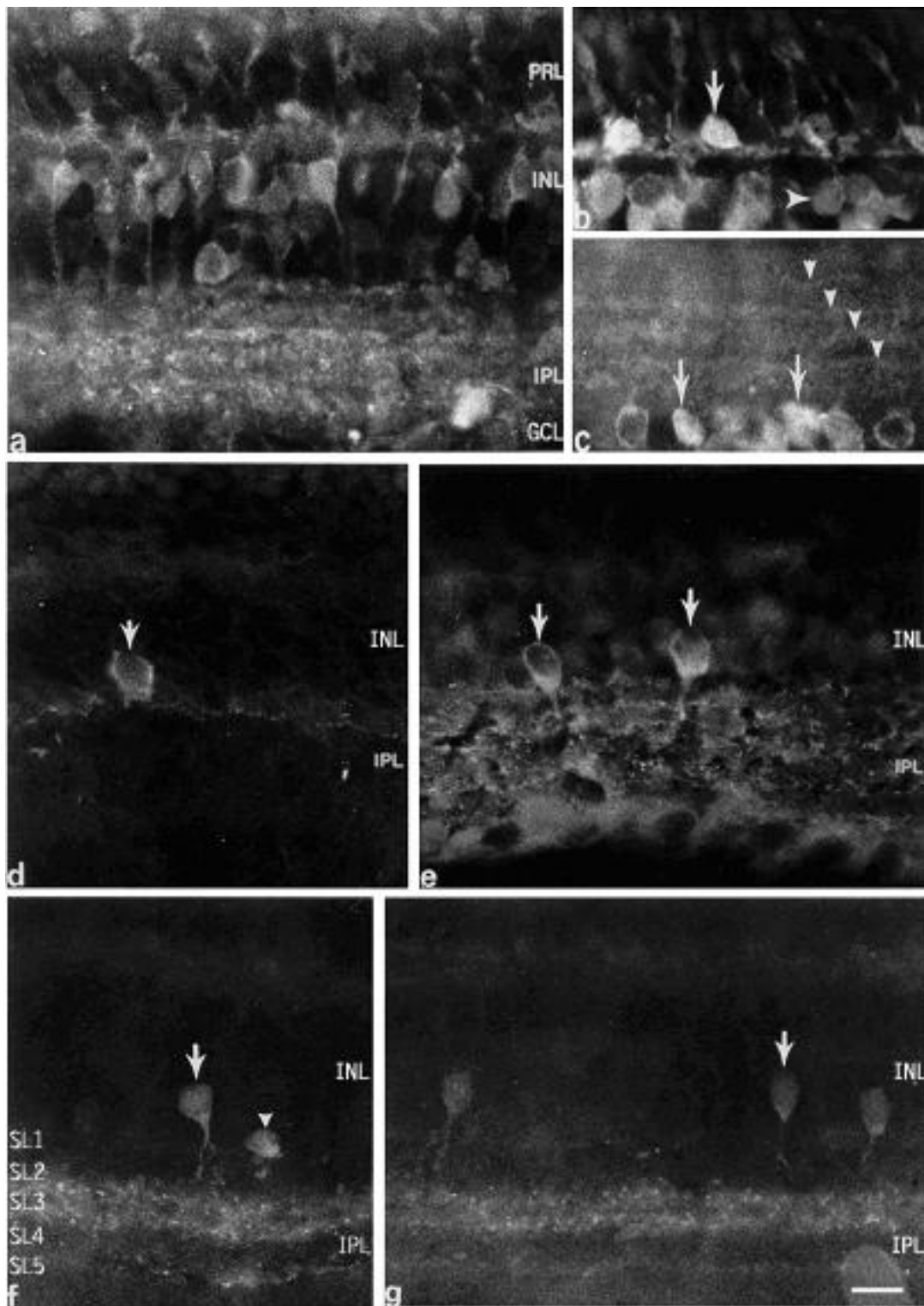
Az amakrin sejtek a retina harmadlagos interneuronjai, amelyek nyúlványait a belső rostos rétegbe juttatják. A retina legdiverzebb sejtcsoportja. Békákban mintegy 20 típust sikerült eddig azonosítani, melyek közül több mint egy tucat sejt neurokémiai kódrendszere is ismert (Vígh és mtsai., 2000). Kíváncsiak voltunk arra, hogy az egyes típusok mennyire konzerváltak a békák csoportján belül, ezért vizsgáltuk ezen sejtek morfológiáját és transzmittertartalmát, majd összehasonlítottuk eredményeinket a már korábban vizsgált más béka fajokban leírtakkal (Smiley és Basinger 1988; Hiscock és Straznicky 1989a,b; Zhu és Straznicky 1990a,b; 1991; Gábrriel és mtsai., 1998). A módszertani részben felsorolt összes antitesttel sikerült értékelhető jelölést kapni, kivéve a szomatosztatin elleni antitesteket, amikkel egyetlen sejt vagy rost sem mutatott immunpozitivitást preparátumainkban.

4.3.1 GABA

Az előző fejezetben leírt fotoreceptor-jelölés mellett a belső sejtes rétegben horizontális (10. ábra, e kép), amakrin (10. ábra, f kép) és bipoláris (10. ábra, g kép) sejtek is jelölődtek. Morfológia alapján legalább kétféle amakrin sejtet sikerült azonosítani. Az egyik hosszú dendrittel rendelkezik, ovális sejttestje az IPL-től távolabb helyezkedik el, míg a másik kerek, nagy sejttesttel rendelkezik és az IPL-en ül. Az amakrin sejtek mintegy fele bizonyult GABA-immunreaktívnak.

4.3.2 Calretinin

Sok sejt jelölődött a *P. fuscus* retinában a calretinin elleni antitestekkel (14. ábra, a kép). A belső rostos réteg mind az öt alrétegében láthatók jelölt struktúrák. Csapok, és a sejtek morfológiája alapján, feltehetőleg „displaced” bipoláris sejtek, valamint dúcsejtek nagy számban jelölődtek, főleg a retina perifériáján (14. ábra, b c képek). Morfológiájuk és elhelyezkedésük alapján két calretinin-pozitív amakrin sejtpopulációt lehetett megkülönböztetni. Az első típus sejttestje közvetlenül a belső sejtes és rostos rétegek határán helyezkedett el, míg a másiké e réteghatártól kifelé volt, és egy erőteljes nyúlványt bocsátott ki a belső rostos réteg felé, ami sokszor már az első alrétegben elágazott (14. ábra, a kép).



14. ábra. Calretinin, tirozin-hidroxiláz, szerotonin és Substance P eloszlása a retina különböző rétegeiben. IPL: belső rostos réteg, PRL: fotoreceptor réteg, INL: belső sejtes réteg, SL1-SL5: az IPL alrétegei, aránymérték: 20 μ m. **(a-c)** Calretinin immunreaktivitást mutató elemek, **(a)** keresztmetszet. **(b)** Bipoláris- (nyílhegy) és „displaced” bipoláris sejtek (nyíl) a retina külső részén. **(c)** Ganglion sejtek (nyilak) és erősen immunreaktív rostok (nyílhegyek). **(d)** Tirozin-hidroxiláz immunreaktivitást mutató neuron (nyílhegy) elágazásokkal az IPL-ben. **(e)** Szerotonin immunpozitivitást mutató sejtek (nyílhegyek) és nyúlványaik az IPL-ben. **(f, g)** A kétféle Substance P immunreaktivitást mutató neuron (nyilak és nyílhegy) eltérő elhelyezkedése az INL-ben. Az IPL-ben egy vastag és egy vékony immunreaktív sáv látható.

4.3.3 Tirozin- hidroxiláz

A tirozin-hidroxiláz a békákban is a dopaminerg sejtek kimutatására alkalmas markermolekula. A *Pelobates* retinában is sikerült kimutatnunk ezeket a sejteket a belső sejtes rétegben és nyúlványaikat a belső rostos réteg első alrétegében (14. ábra, d kép). Az immuncitokémiai vizsgálatok alapján a kimutatott sejtek egységes dendritmorfológiával rendelkeztek.

4.3.4 Szerotonin

Nagyméretű (12-15 μm) szerotonin-tartalmú sejteket találtunk a belső sejtes rétegben, melyek nyúlványai a belső rostos réteg teljes szélességében ágaztak szét. A legkiterjedtebb ágrendszer a második és harmadik alrétegben figyelhetők meg (14. ábra, e kép). A szerotonin-immunreaktív sejttestek mérete alapján a barna ásóbéka retinájában nem eldönthető, hogy a más fajokban leírt kétféle szerotonin immunpozitív sejt megtalálható-e?

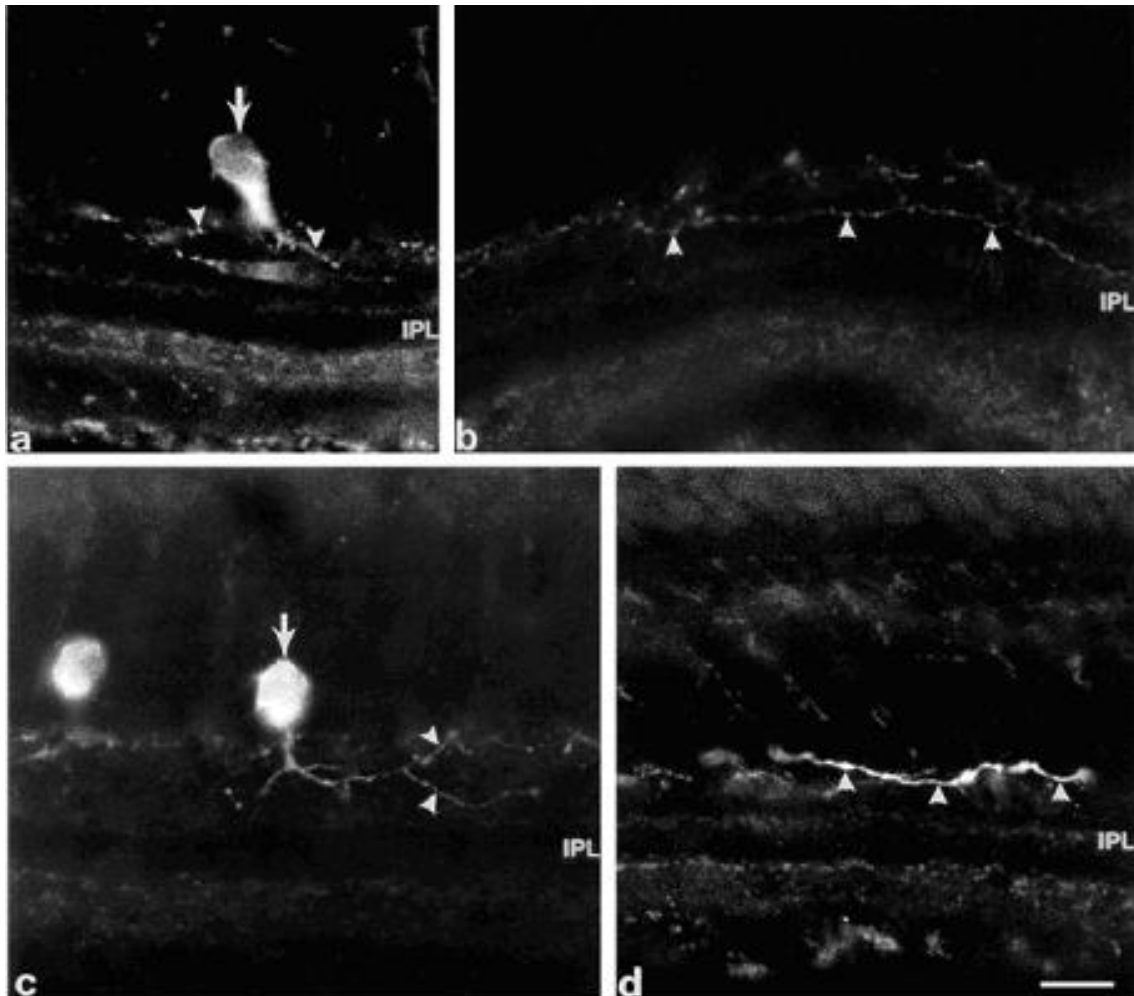
4.3.5 Substance P

Substance P immunreaktivitást tudtunk megfigyelni a belső rostos réteg 1, 3/4 és 5 alrétegében. Két sejt típus biztosan elkülöníthető ezeken a preparátumokon. Az egyik típus dendritjei elágazás nélkül lefutnak a 3. alrétegbe, míg a másik típus esetében a nyúlványok rögtön az első alrétegben szétsugároznak, a teljes elágazódásuk azonban csak az alsóbb alrétegekben figyelhető meg (14. ábra, f és g képek).

4.3.6 Neuropeptid Y

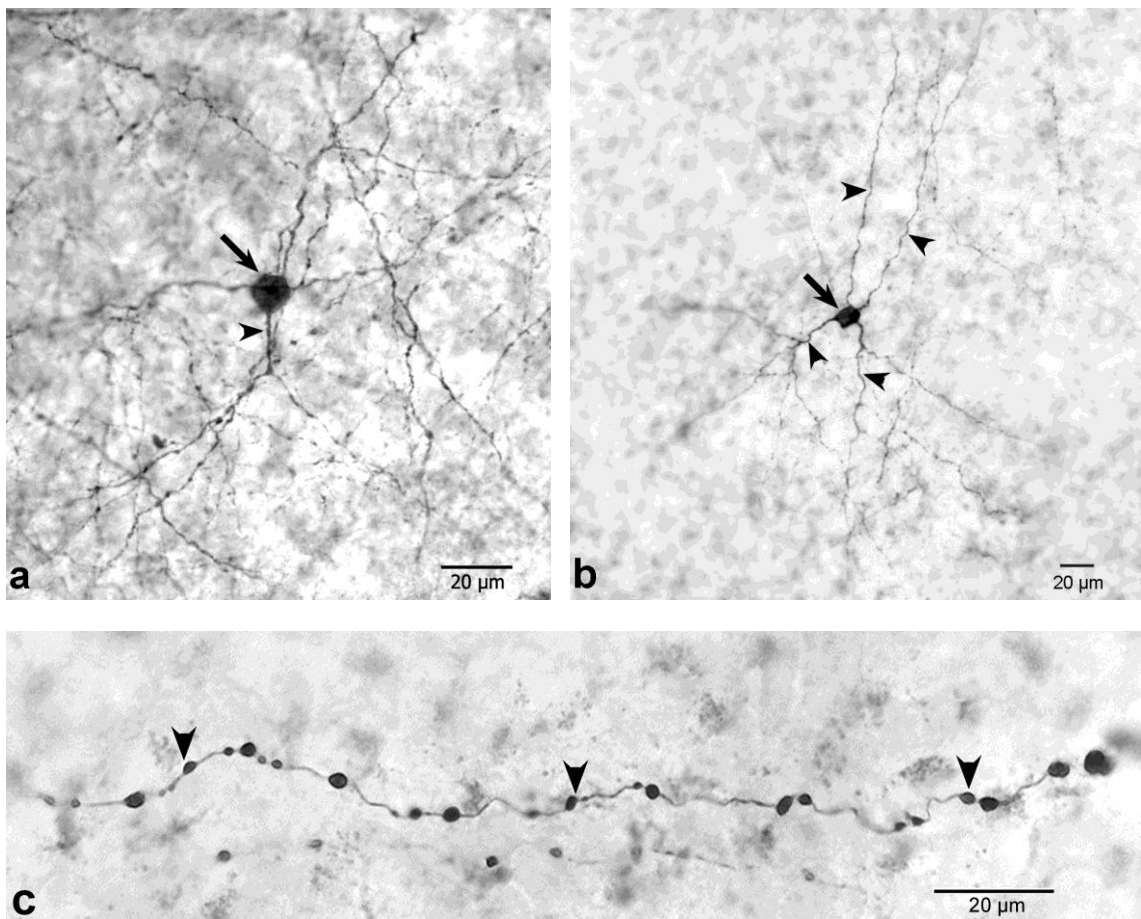
A neuropeptid Y immunreaktivitást mutató neuronok a belső sejtes rétegben elhelyezkedő amakrin sejtek voltak. Morfológiailag két típust tudtunk elkülöníteni. Az egyik típus sejttestje közvetlenül a belső plexiform réteg (IPL) proximális felszínén ült, és annak 1. alrétegébe juttatott rostokat (15. ábra, a kép), míg a másik sejttestje az IPL-től távolabb volt található és nyúlványait főleg az 1. és 2. alrétegbe küldte (15. ábra, c kép). Mindkét sejt típus kerek sejttesttel és széles dendritmezővel rendelkezett. Az amakrin sejtek mellett centrifugális rostokat is megfigyelhettünk, melyek főleg a belső rostos réteg első alrétegében futottak, de kisebb szakaszokat a 2. és 5. alrétegben is

láttunk (15. ábra, b és d képek). Néhány gyengén immunreaktív Müller-sejtet is megfigyelhettünk, de ezt a jelölést preabszorpciós kísérletekkel sem sikerült eltüntetni, ezért aspecifikusnak tekintettük.



15. ábra. Neuropeptid Y immunreaktivitás a *Pelobates fuscus* retinájában. IPL: belső rostos réteg. Aránymérték: 20 μm . **(a)** Immunpozitív amakrin sejt (nyíl), nyúlványokkal (nyílhegyek) a szublamina. **(b)** Nagy kiterjedésű neuropeptid Y immunreaktív rost (nyílhegyek). **(c)** NPY pozitív sejt (nyíl), mely az IPL mélyebb rétegeibe küld rostokat (nyílhegyek). **(d)** Erősen immunpozitív centrifugális rost (nyílhegyek) az IPL első szublamínájában.

Az immunfluoreszcens vizsgálatokban megfigyelt kétféle amakrin sejtet és a centrifugális rostokat a wholemount preparátumokban is sikerült azonosítani (16. ábra). Az amakrin sejtek törzsdendritjei kb. 200 μm távolságot fednek le. A varikózus centrifugális rostok igen hosszan húzódva behálózzák a retina egész területét.

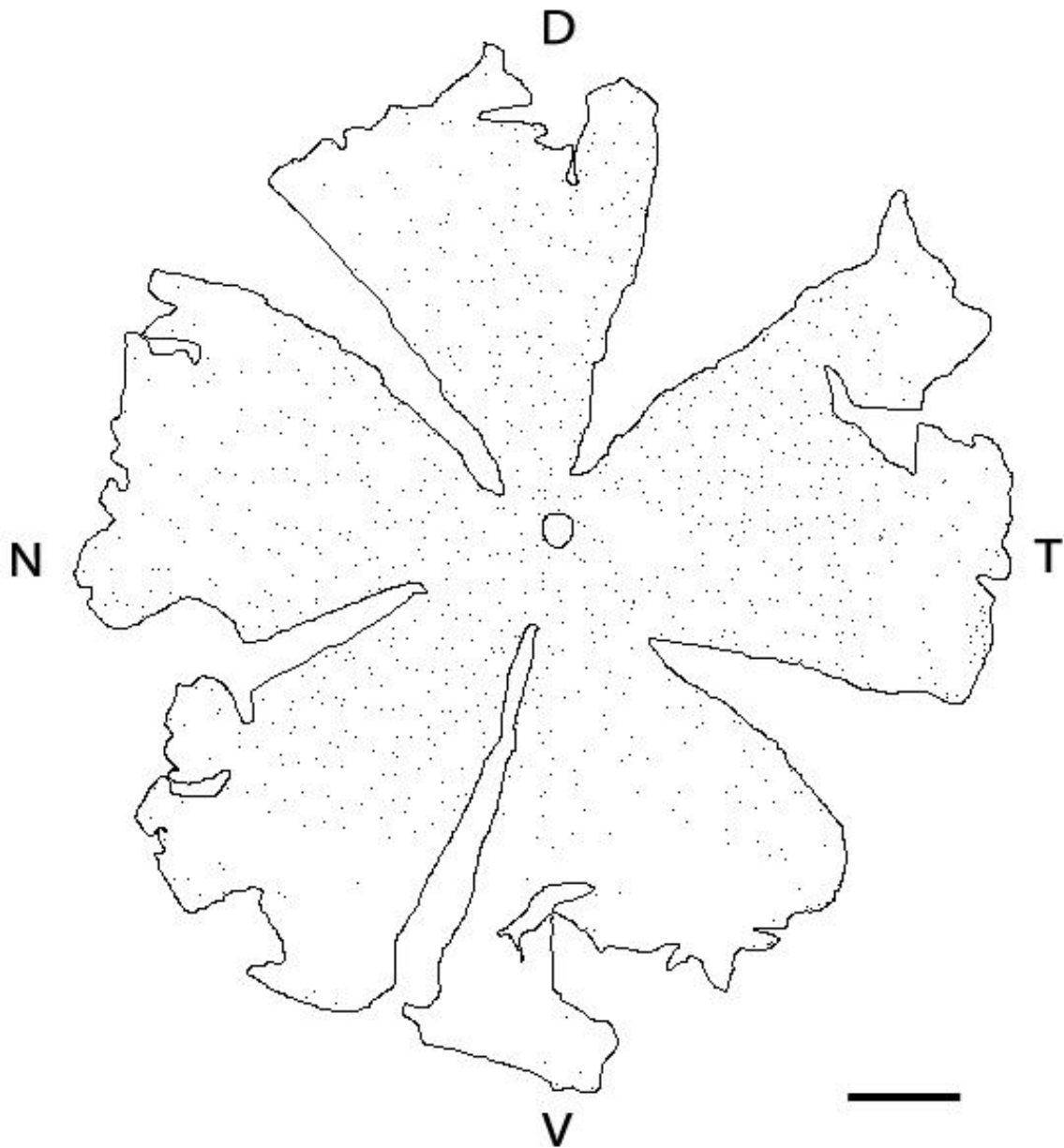


16. ábra. Neuropeptid Y immunreaktivitást mutató elemek a barna ásóbéka retinájából készített wholemout preparátumban. **(a)** a belső rostos réteg fölött elhelyezkedő amakrin sejt (nyíl) hosszú egyenes dendrittel (nyílhegy), **(b)** az első szublaminaába nyúlványokat küldő sejt (nyíl) elágazó dendritfája (nyílhegyek), **(c)** centrifugális rost (nyílhegyek).

A neuropeptid Y-pozitív amakrin sejtek térbeli eloszlását is vizsgáltuk egy wholemout preparátumon. Ebben a vizsgálatban a sejteket egy populációként értékeltük. A 43,9 mm² területű preparátumon 964 db NPY-pozitív amakrin sejtet találtunk, így ezen sejtek denzitása a retinán 22/mm². A nearest neighbour analízis azt mutatta, hogy a sejtmozaik reguláris (Rn=1,59), a sejtek egymástól közel azonos távolságra, egyenletesen helyezkednek el az egész retinán.

4.3.7 Kolokalizációs vizsgálatok eredményei

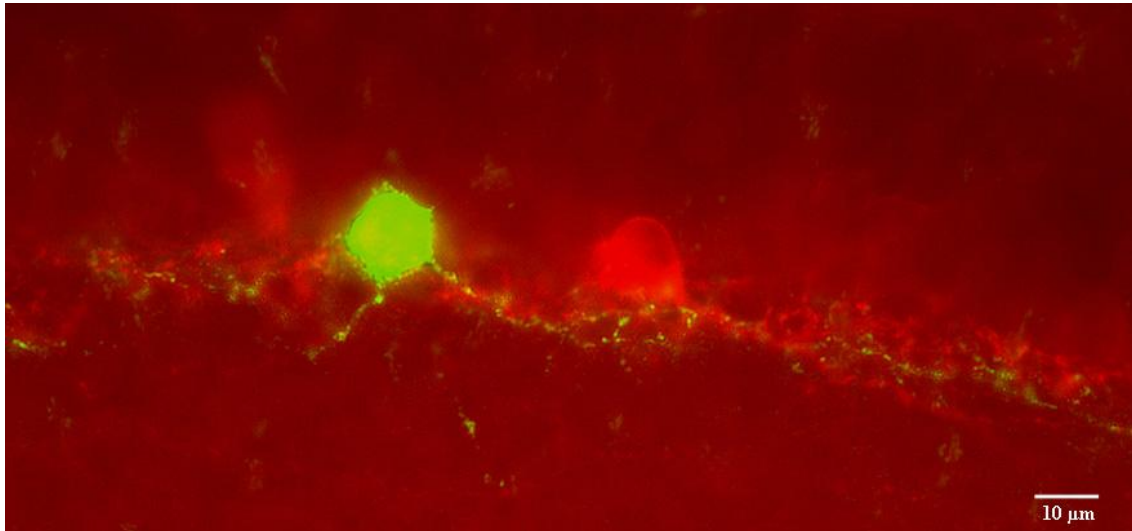
Az amakrin sejtek sokfélesége miatt fontos lehet azok neurokémiai kódrendszerének pontos feltérképezése, az egymás mellett előforduló neurokémiai markerek kimutatása. Néhány erre irányuló kísérletet mi is elvégeztünk. Eredményeink az alábbiakban foglalhatóak össze.



17. ábra. Neuropeptid Y immunreaktív amakrin sejtek térbeli eloszlása wholemount preparátumon. D: dorsalis, V: ventralis, T:temporalis, N: nasalis. Aránymérték: 1000 μ m.

4.3.7.1. Neuropeptid Y/Tirozin-hidroxiláz

Az összes eddig vizsgált béka fajhoz hasonlóan a barna ásóbékában is megfigyelhető a tirozin-hidroxiláz és a neuropeptid Y immunreaktív elemek hasonló eloszlási mintázata (18. ábra). Kettősen jelölt struktúrát - más laboratóriumok eredményeihez hasonlóan - mi sem mutattunk ki vizsgálataink során.

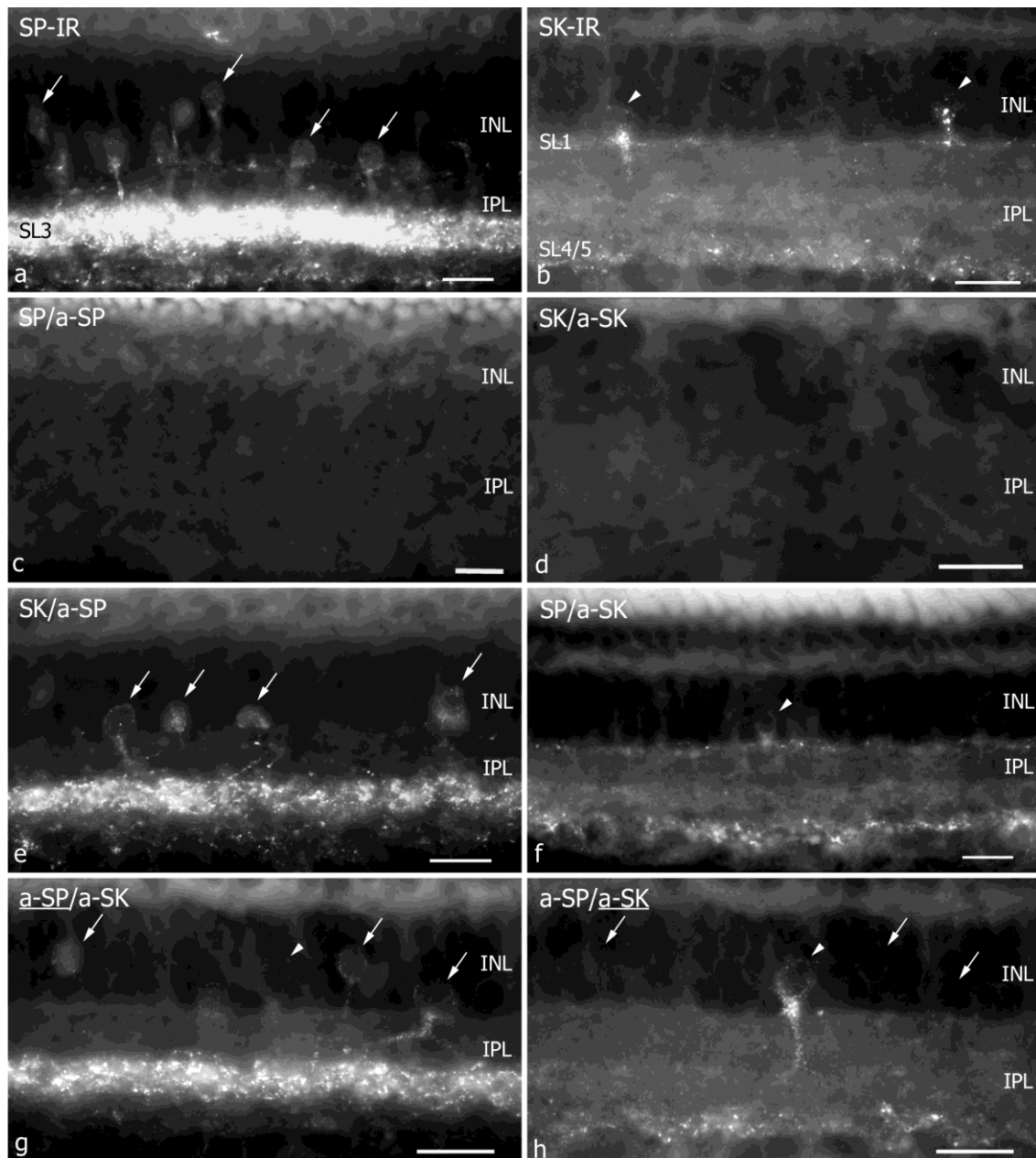


18. ábra. NPY (zöld) és TH (piros) pozitív elemek hasonló térbeli eloszlása

4.3.7.2 *Substance P/Substance K*

A tachikinin peptidok alternatív splicing mechanizmussal keletkeznek több gerinces faj agyában (Krause és mtsai., 1987; Nakanishi 1986; Pennefather és mtsai., 2004), köztük a békákéban is (Liu és Burcher 2005). A három fő peptidtermék (Substance P, Substance K és neurokinin B) a preferált ligandjai a három tachikinin receptor típusnak (NK1, NK2 és NK3), melyekhez különböző erősséggel bár, de mindegyik peptid kötődik (0,01%-tól 20%-ig terjedő keresztkötés-affinitással) (Liu és Burcher 2005, Pennefather és mtsai., 2004). Emlős retinában NK1 receptorokat találtak bipoláris és dopaminerg amakrin sejteken nyúlban, valamint amakrin- és dúcsejteken patkányban (Catalani és mtsai., 2004). Az NK3 receptorok szelektíven találhatóak Off-bipoláris sejteken egérben (Haverkamp és mtsai., 2003), és Off-bipoláris valamint dopaminerg amakrin sejteken patkányban (Catalani és mtsai., 2004). A fenti tények ismeretében kíséreltük meg a Substance K azonosítását és a Substance P-pozitív sejtekhez való anatómiai viszonyának tisztázását.

Eredményeink azt mutatják, hogy az amakrin sejtek egy csoportjában Substance P immunreaktivitás figyelhető meg a *Pelobates* retinában (19. ábra, a kép). Az immunpozitív festődés teljesen eltűnt, ha a Substance P elleni antitesttel teljes hosszúságú Substance P peptid jelenlétében (overnight, 10x-es többlet) végeztünk preabszorpciós kísérletet (19. ábra, c kép). Ugyanezt a vizsgálatot teljes hosszúságú



19. ábra. Substance P és Substance K immunreaktivitás a *Pelobates* retinában. Az aránymérték 20 μm mindegyik képen. **(a)** Substance P immunreaktív elemek. Jól látható két különböző sejtípus (egy kerek sejttessel rendelkező az INL/IPL határon, és egy hosszúkás, lényegesen disztálisabban), és egy erősen festődött sáv az IPL harmadik szublamínájában. Nyilak: Substance P pozitív sejttestek. **(b)** Substance K immunreaktivitás. Széles dendritmezejű amakrin sejtek kis populációja figyelhető meg az INL/IPL határon (nyílhegyek) illetve immunreaktivitást mutató dendritek két sávja látható az SL1-ben és az SL4/5-ben. **(c)** Substance P antitesttel végzett preabszorpciós vizsgálat során nem volt változás sem az immunreaktivitás erősségében, sem a mintázatában Substance P peptid jelenlétében. **(d)** Substance K antitesttel végzett preabszorpciós vizsgálat Substance K peptid jelenlétében. Egyetlen struktúrában sem figyelhető meg immunpozitív jelölés. **(e, f)** Preabszorpciós vizsgálat Substance P antitesttel Substance K peptid jelenlétében **(e)**, és Substance K antitesttel Substance P peptid jelenlétében **(f)**. Sem a megfigyelt immunreaktivitások erősségében, sem a festődési mintázatokban nem tapasztalható változás. **(g, h)** Substance P -vel **(g)** és Substance K-val **(h)** végzett kettősjelöléses vizsgálat. A SP-pozitív sejtek helyzetét ezen az ábrán nyilak, míg az SK-pozitív sejteket nyílhegyek jelölik. Egyetlen SP-pozitív sejt sem mutatott SK-pozitivitást, és ugyanez fordítva is igaz.

Substance K peptid jelenlétében (overnight, 10x-es többlet) elvégezve sem a festődés intenzitása, sem annak mintázata nem változott meg (19. ábra, „e” kép). A Substance K-t a széles dendritmezejű amakrin sejtek egy ritka populációjában sikerült azonosítani. A sejttestek az INL legbelső sejtrétegében foglalnak helyet, míg a Substance K immunpozitív dendritok a SL1-ben és a SL4/5 határán találhatóak (19. ábra „b” kép), amelyek következtében részben átfednek a Substance P immunpozitív dendritok területével. Substance K immunpozitivitást mutató displaced amakrin sejteket nem találtunk. Az immunpozitív festődés itt is teljesen eltűnt, ha a Substance K elleni antitesttel teljes hosszúságú Substance K peptid jelenlétében (overnight, 10x-es többlet) végeztünk preabszorpciós kísérletet (19. ábra, „d” kép). Ugyanezt a vizsgálatot teljes hosszúságú Substance P peptid jelenlétében (overnight, 10x-es többlet) elvégezve sem a festődés intenzitása, sem annak mintázata nem változott meg (19. ábra, „f” kép). A kettős jelölésű vizsgálatokból világosan látszik, hogy Substance P immunreaktív amakrin sejtekből legalább hat-nyolcszor több található a *Pelobates* retinában, mint Substance K pozitív amakrin sejtekből. A bizonyítékok alapján - a Substance P és Substance K immunpozitív sejtek dendritmezeinek átfedése ellenére - a fenti két sejtpopuláció egyértelműen elkülönül egymástól (19. ábra, „g” és „h” képek).

5. Diszkusszió

5.1 A barna ásóbéka retinájának általános szerkezeti felépítése

A barna ásóbéka retinájának szövettani felépítése mind a retina vastagságát, mind az egyes rétegek egymáshoz viszonyított arányát tekintve nagyban hasonlít a többi vizsgált béka faj (pl. *Rana catesbiana*, *Bufo marinus*, *Xenopus laevis*) retinájának felépítéséhez (Steinberg 1973; Zhang és Straznicky 1990; Gábiel és Wilhelm 2001). Vizsgálataink során a fotoreceptorok morfológiájában és eloszlásában is sikerült azonban néhány különbséget megfigyelni a *Bufo*, *Rana* és *Xenopus* nemzetségeknél leírtakhoz képest.

5.2 A fotoreceptorok morfológiája és eloszlása

A barna ásóbéka retinájában morfológiailag háromféle pálcikát és egyféle csapot mutattunk ki. Az eddigi vizsgálatok a pálcikáknak két különböző (minor és major) csoportját igazolták a *Bufo marinus* (Gold és Dowling 1979), a *Rana pipiens* (Liebman és Entine 1968) és a *Xenopus laevis* (Hollyfield és mtsai., 1984; Röhlich és mtsai., 1989) békafajok esetében. A barna ásóbékában a fentiekén túl még egy, a major pálcikákhoz morfológiailag nagyon hasonló pálcikát találtunk, amely csak a magszerkezetében tért el a pálcikákra jellemző általános tulajdonságoktól. A *Xenopus laevis* retinájában a normál csapok mellett két további, „minor” csap populációt (a normálisnál kisebb csapokat és ún. dupla csapokat) is kimutattak (Witkovsky és mtsai., 1981b; Röhlich és mtsai., 1989), melyekhez hasonló struktúrát a barna ásóbéka esetében nem sikerült igazolni.

Az eddig széleskörben vizsgált *Rana* és *Xenopus* fajokkal ellentétben a *Pelobates fuscus* csapjaiban nem mutattunk ki olajcseppet, azok helyét egy denz struktúra tölti ki. A szárazföldi gerincesek szemében lévő olajcseppeknek nincs felismerhető belső struktúrájuk, és gyakran karotinoidokat, vagy esetleg más kémiai anyagokat tartalmazhatnak. Kétéltűek retinájában eddig kétféle olajcseppet sikerült azonosítani. Az egyik a csapok külső szegmensének alsó részében elhelyezkedő szintelen olajcsepp, míg a másik a pigment epithel sejtekben megtalálható sárga színű

olajcsepp. Szerepük a kémiai raktározásban, illetve az ultraibolya sugarak elleni védekezésben lehet (Hailman 1976). A fenti 97 kételtű fajra kiterjedő vizsgálat alapján mindegyik vizsgált fajban legalább az egyik féle olajcsepp megtalálható. Vizsgálataink az epithel sejtekre nem terjedtek ki, azonban a barna ásóbékával egy családba tartozó *Scaphiopus* genus mind az 5 vizsgált tagjánál megtalálható az epitheliális olajcsepp, és egyben hiányzik a csapokban lévő olajcsepp. Ez alapján valószínűsítjük, hogy a *Pelobates fuscus* esetében is hasonló lehet a helyzet. Ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

A csapok denzitását figyelve a retina különböző területein elmondható, hogy eloszlásuk nem egyenletes. Denzitásuk a periférián mért $3900/\text{mm}^2$ -től a retina centrális részén mért $7600/\text{mm}^2$ -ig terjed. A mért értékek jóval kisebbek a már vizsgált béka fajoknál leírt értékeknél (Zhang és Straznicky 1991; Wilhelm és Gábrriel 1999). Emlős (Long és Fischer 1983; Müller és Peichl 1989; Packer és mtsai., 1989) és hüllő fajokon (Wong 1989), majd *Bufo marinus*-on (Zhang és Straznicky 1991) végzett korábbi vizsgálatok már rávilágítottak arra, hogy a retina centrális részén megfigyelhető magas fotoreceptor - elsősorban csap - denzitás mellett, a ganglion sejtek rétegében látócsík (visual streak), vagy fovea centralis formájában elkülönül az éleslátás helye. *Bufo marinus* esetében a ganglion sejtek rétegében a legmagasabb sejtdenzitást a retina nasotemporalis meridiánja mentén mérték (Nguyen és Straznicky 1989), és a neuronok hasonló topográfiai eloszlását figyelték meg a külső- és belső magvas rétegekben is (Zhu és mtsai., 1990; Straznicky 1993). Ez a sejtdenzitásbeli különbség közel hatszoros volt a központi és a perifériális retina területek között *Bufo*-ban. Miután *Pelobates*-ben, hasonló vonatkozásban mindössze 1,5x-es különbséget tudunk kimutatni, értékelésünk szerint ez nem meríti ki a visual streak kritériumát, csupán egy emelkedett központi sejtdenzitásként értékeljük.

Az eddig vizsgált béka fajoktól eltérően a csapok aránya a pálcikákhoz képest nagyon alacsony (1:9) a *Pelobates* retinában. Ugyanez az érték a *Bufo marinus* esetében 1:2 (Zhang és Straznicky 1991), míg *Xenopus laevis* esetében közel van az 1:1-es arányhoz (Wilhelm és Gábrriel 1999). Ez arra enged következtetni, hogy a csapoknak kisebb jelentősége van a vizuális információk feldolgozásában a barna ásóbékánál, ami az állat éjszakai életmódjával lehet összefüggésben.

Mindemellett vizsgálatainkban sikerült bizonyítani GABA immunreaktív csapok jelenlétét. Az általánosan elfogadott, hogy a fotoreceptorok tárolnak és szabadítanak fel glutamátot, mint neurotranszmittert (Marc és mtsai., 1990; Connaughton és mtsai., 1999; Thoreson és Witkovsky 1999). Eddig ezen felül három további anyagot lokalizáltak fotoreceptorokban, mint lehetséges transzmittert. Hisztamint (Eldred és mtsai., 1992), carnosint (Pognetto és mtsai., 1992) és GABA-t (Nishimura és mtsai., 1986; Engbretson és mtsai., 1988). Ismereteink szerint tehát mindössze két olyan közlemény jelent meg eddig, amelyben filogenetikailag egymástól távol eső fajok retinájában GABA immunreaktivitásról számolnak be fotoreceptor sejtekben. Míg az előbbi két anyagról nem sikerült bizonyítani, hogy bármilyen szerepet játszanának a retina információ feldolgozó folyamataiban, a GABA bizonyítottan a fő gátló transzmitter mind a külső, mind a belső retinában, amely területeken mindhárom ismert GABA receptor típuson (A: [Brecha 1992]; B: [Slaughter 1995]; C: [Lukasiewicz 1996]) keresztül kifejti hatását. Érdekes kérdés, hogy mi lehet a funkciója egy GABA-t felszabadító fotoreceptor sejtnek? Az már bebizonyosodott, hogy fény hatására a fotoreceptorokban a glutamát felszabadulás csökken, és az ON-bipoláris sejtektől eltekintve a másodlagos neuronok erre a stimulusra hiperpolarizációval válaszolnak. Ha a fenti fotoreceptor sejtek GABA-t szabadítanak fel transzmitterként, az hathat a másodlagos neuronokra, melyek közül egyes horizontális és bipoláris sejtek működő GABA receptorokkal rendelkeznek (Brecha 1992; Kamermans és Werblin 1992; Slaughter 1995; Liu és mtsai., 2005). A GABA a horizontális sejteken kiválthat depolarizációt (Varela és mtsai., 2005). A klorid ekvilibrium potenciál (-20 mV) ezen neuronok működési feszültség tartományán belülre esik (Kamermans és Werblin 1992). Ezt a meglepően magas ekvilibrium potenciált ezen sejtek membránjában jelen lévő nátrium/kálium/klorid kotranszporter tartja fenn (Vardi és mtsai., 2000). A GABA ezen kívül hathat magára a csapra is autoreceptorokon keresztül (Yang és Yazulla 1994; Lukasiewicz 1996; Pattnaik és mtsai., 2000;), mivel mindhárom GABA receptor típust kimutatták már különböző fajok csapjain (Yang és Yazulla 1994). Újabban felmerült, hogy *Rana catesbeiana* csapjain GABA (Liu és mtsai., 2005) és glicin receptorok (Ge és mtsai., 2007; Zhang és mtsai., 2008) is jelen lehetnek. Mindezek mellett a fenti faj egyes csapjain ionotrop GABA receptorok jelenlétét is kimutatták (Liu és Yang 2006; Liu és mtsai., 2006), ami tovább bonyolítja a fent vázolt képet, és arra utal, hogy a GABA-nak közvetlen szerepe lehet a fotoreceptorok jelfeldolgozásában.

Egy másik érdekes kérdés, hogy a GABA a *Pelobates* csapban szintetizálódik, vagy csupán az anyagcsere során termelődik, mint a Krebs ciklus mellékterméke. GABA és glutamát kettősjelöléses vizsgálatokban a glutamát immunreaktivitás a GABA immunreaktív csapokban gyenge volt, vagy teljes mértékben hiányzott (nem került bemutatásra a dolgozatban). Ezen megfigyelések alapján arra következtetünk, hogy az idegrendszer más GABAerg neuronjaihoz hasonlóan a *Pelobates* csapokban is glutamátból történik a GABA szintézis. Mindemellett a GABA lehetséges hatása a másodlagos sejteken valószínűleg független attól, hogy a fotoreceptor sejtek tudnak-e GABA-t szintetizálni, mivel azt már tudjuk, hogy a retina neuronjai képesek felszabadítani olyan akkumulált anyagokat is, melyek szintézisére egyébként nem képesek (Schütte és Witkovsky 1990). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy ezek a csapok valóban szintetizálnak és/vagy felszabadítanak GABA-t - és csak GABA-t - neurotranszmitterként.

A GABA tartalmú fotoreceptorok jelenléte kétéltűekben, az eddigi ismereteink alapján egyedi a *Pelobates* retinában. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a retina információfeldolgozó folyamataiban ezek a sejtek milyen szerepet töltenek be.

5.3 Neurokémiai markerek, transzmitterek az amakrin sejtekben

Más laboratóriumok által korábban vizsgált békafajok retinája és a *Pelobates* retina neurokémiai markereinek eloszlása között csak kismértékű eltérést figyeltünk meg. A 3. táblázat irodalmi és saját adatok alapján készült. Az adatokból látszik, hogy számos marker az itt összehasonlított 4 nemzetség mindegyikénél előfordul. Vizsgálataink legalább 10 féle amakrin sejtet igazoltak. Az amakrin sejtekben eddig monoaminokat, peptideket és kalcium-kötő fehérjéket azonosítottunk. Mivel a többi béka fajban számos más típusú amakrin sejtet is ismerünk, további vizsgálatokat tervezünk elvégezni más markerekkel (neurofilament, MAP, más peptidek). Az eddig vizsgált egyes markerek részletes összehasonlításával az alábbiakban foglalkozunk.

3. táblázat. Az általunk használt antitestekkel jelölődött struktúrák az egyes béka nemzetségekben. AC: amakrin sejt, BC bipoláris sejt, GC: ganglion sejt, HC: horizontális sejt, IPC: interplexiform sejt, NA: nincs adat

Antitest	<i>Pelobates</i>	<i>Bufo</i>	<i>Rana</i>	<i>Xenopus</i>
Calretinin	Csapok BC (sokféle) AC (néhány) GC (sok)	NA	BC (sokféle) AC (néhány) GC (50%)	BC (sokféle) AC (néhány) GC (sok)
Tirozin-hidroxiláz	AC (2 típus)	AC (1 típus)	AC (2 típus)	AC (1 típus)
Szerotonin	AC (2 v. 3 típus)	AC (3 típus)	AC (?)	AC (3 típus) BC (1 típus)
Substance P	AC (2 v. 3 típus)	AC (2 típus)	AC (?)	AC (1 típus)
Substance K	AC (1 típus)	-	-	-
Neuropeptid Y	AC (2 v. 3 típus) Centrifugális rostok	AC (1 típus)	AC (?)	AC (1 típus)
Szomatosztatin	-	IPC	IPC	IPC
γ -amino-vajsav	Csapok BC AC (50%) HC	BC AC GC	BC AC GC	AC

5.3.1 γ -amino-vajsav (GABA)

A γ -amino-vajsav (GABA) a fő gátló neurotranszmitter az összes máig vizsgált gerinces faj retinájában (Mosinger és mtsai., 1986; Nguyen-Legros és mtsai., 1997; Vígh és mtsai., 2000), amelyekben ezen anyag mindhárom fő receptor típusa is megtalálható (Brecha 1992; Slaughter 1995; Lukasiewicz 1996). A GABAerg jeltevábbitás egy vagy több szükséges elemét lokalizálták számos amakrin sejt típusban, és legalább egyféle horizontális sejtben (Wässle és Chun 1988; Pourcho és Owczarzak 1989; Vaney 1990; Vígh és mtsai., 2000). Néhány fajban bipoláris és ganglion sejtek szintén tartalmaznak GABA-t, vagy a szintéziséhez szükséges enzimet, GABA-dekarboxilázt (GAD) (Mariani és Caserta 1986; Agardh és mtsai., 1987; Gábrriel és mtsai., 1992, 1998; Yang és Yazulla 1994; Rio és mtsai., 1996; Reperant és mtsai., 1997).

Úgy tűnik a GABA tartalmú bipoláris sejtek általánosak a kétéltűek retinájában (Agardh és mtsai., 1987; Gábriel és mtsai., 1992; Yang és Wang 1999), és a GABAerg amakrin sejtek lényegesen nagyobb számban fordulnak elő az alacsonyabbrendű gerincesekben, mint emlősökben (Vígh és mtsai., 2000). Vizsgálataink azt bizonyítják, hogy a *Pelobates* retinában a GABA-immunreaktivitás a többi vizsgált békafajhoz hasonló mintázatot mutat. A barna ásóbéka retinájában az amakrin sejtek közel fele bizonyult GABA pozitívnak, ami megfelel az irodalomban, más kétéltű fajok vizsgálata során kapott eredményeknek (Vígh és mtsai., 2000). Kétéltűek retináján korábban végzett intracelluláris sejtfeltöltési és immuncitokémiai (Yang és mtsai., 1991), valamint elektronmikroszkópos immunfestési eljárással (Gábriel és Straznický 1993) összesen 4 féle GABA pozitív sejtet azonosítottak a sejtestek elhelyezkedése és mérete, valamint az IPL-be juttatott rostok eloszlási mintázata alapján. A barna ásóbékában morfológiai alapon azonosított kétféle GABA pozitív sejt típus ezekhez nagyon hasonló felépítést mutat.

Az amakrin, horizontális és bipoláris sejtek mellett a ganglion sejtek rétegében is találtunk GABA pozitív sejteket. Ezek displaced amakrin sejtek, vagy ganglion sejtek lehetnek. Gábriel és munkatársai (1992) *Bufo marinus* egyedeken végzett vizsgálataikban igazolták, hogy a ganglion sejtek rétegében lévő neuronok kis százaléka GABA immunpozitív ganglion sejt, és néhány immunreaktív axont is kimutattak az optikus rostok rétegében (Gábriel és Straznický 1995). Ez arra utalhat, hogy a GABA tartalmú ganglion sejtek gátló beidegzést adhatnak a béka agy fő látóközpontjába.

Más kétéltű fajok esetében egyes amakrin sejt típusokban mutattak ki GABA és egyéb markerek (szerotonin, SP, NPY) között kolokalizációt (Main és mtsai., 1993). Mi ilyen vizsgálatokat nem végeztünk, bár a nagyszámú GABA-immunreaktív sejt populáció okán sejthető, hogy jónéhány kolokalizációs kísérlet sikerrel járna.

5.3.2 Calretinin

A napjainkig vizsgált különböző gerinces fajok retinájában megfigyelt, calretinin immunreaktivitást mutató elemeket vizsgálva láthatjuk, hogy ez a fehérje számos különböző neuron típusban van jelen a retinában, de ezek eloszlása nagy variabilitást mutat az egyes fajok között.

Korábban kételtűeken végzett vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményeket közöltek a kalciumkötő-fehérjék eloszlásáról a retinális neuronokban, mely ellentmondások valószínűleg a különböző típusú alkalmazott antitesteknek köszönhetőek. Morona és munkatársai (2007) hat kételtű (3 béka és 3 farkos kételtű) fajon végeztek összehasonlító vizsgálatot standard körülmények között ugyanazokkal az antitestekkel. Eredményeik alapján a fotoreceptorok egyik vizsgált faj esetében sem mutattak calretinin immunreaktivitást, míg a horizontális, bipoláris és amakrin sejtek, valamint a ganglion sejtek rétegében található sejtek szubpopulációi minden faj esetében tartalmaztak calretinint (Morona és mtsai., 2007).

Barna ásóbéka esetében a calbindin 28 kDa jelenlétét nem tudtuk kimutatni, amit pedig korábbi vizsgálatok már farkatlan kételtűek (Deng és mtsai., 2001; Zhang és mtsai., 2006) és békák (Gábrriel és mtsai., 1992; Morona és mtsai., 2007) csapjaiban is igazoltak. A barna ásóbéka esetében a fotoreceptorok rétegében és a belső retinális rétegekben kapott jelölés alapján elképzelhető, hogy ebben a fajban a calretinin lesz a fő kalcium-kötő fehérje.

Vizsgálatainkban calretinin immunreaktivitást nagy számban azokban a sejtfeleségekben találtunk, amelyek az információ vertikális továbbításában játszanak szerepet, vagyis a bipoláris sejtekben, a ganglion sejtekben és a fotoreceptorokban. Calretinin-immunreaktív horizontális sejteket a *Rana esculenta* és a *Xenopus laevis* fajokhoz hasonlóan (Sanna és mtsai., 1993; Gábrriel és mtsai., 1998; Gábrriel 2000) nekünk sem sikerült igazolni a barna ásóbéka retinájában. Calretinin-immunreaktív amakrin sejtek más kételtűekhez hasonlóan (Pasteels és mtsai., 1990; Gábrriel és mtsai., 1998; Gábrriel 2000; Deng és mtsai., 2001) ritkán fordultak elő. Ezen sejteknek morfológiailag két típusát sikerült azonosítani a *Pelobates* retinában.

Az irodalmi adatok alapján a calretinin jelenléte kételtűeknél a bipoláris sejtek nagy populációjára jellemző (Pasteels és mtsai., 1990; Gábrriel és mtsai., 1998; Gábrriel 2000; Deng és mtsai., 2001; Maple és mtsai., 2005). Ezek között van néhány ún. displaced bipoláris sejt, és néhány, amelynél tisztán felismerhető Landolt-féle „club”-ot találunk. Hasonlóan általános a calretinin jelenléte a bipoláris sejtekben más alacsonyabbrendű gerinces fajok esetében is, egészen a madarakig (Morona és mtsai., 2007). Ez a helyzet az emlősöknél változik meg, ahol calretinin helyett calbindin található a bipoláris sejtekben (Chan és mtsai., 2001; Chiquet és mtsai., 2005). Ez alól

kivételt jelentenek egyes éjszaka aktív főemlősök és rágcsálók, amelyeknél sem calbindint, sem calretinint nem sikerült kimutatni a fenti sejtekben (Wässle és mtsai., 1998; Chiquet és mtsai., 2005), valamint a földi mókus, melynek bipoláris sejtjei mindkét említett kalciumkötő-fehérjével rendelkeznek (Cuenca és mtsai., 2002).

A ganglionsejtek rétegében számos calretinin pozitív sejtet találtak kétéltűeknél (Gábrriel és mtsai., 1998; Deng és mtsai., 2001). Ezen vizsgálatok mindegyikében különböző morfológiájú és méretű sejteket figyeltek meg, ami arra enged következtetni, hogy ezen sejtek közül sok az ún. displaced amakrin sejt. Vizsgálatainkban mi is számos calretinin immunreaktív sejttestet, és számos rostot figyeltünk meg a GCL-ben, ami alapján valószínűsíthető, hogy ezen sejteknek legalább egy része ganglion sejt. Ennek igazolására a sejtek retrográd jelölését lesz szükséges elvégezni. A calretinin-immunpozitív rostok nagy száma, és az immunreaktív sejttestek változatos mérete arra utal, hogy több ganglion sejt típus is calretinin-pozitív lehet.

5.3.3 *Tirozin-hidroxiláz*

A dopaminerg amakrin sejtek általánosak minden gerinces retinában, és denzitásuk minden esetben alacsony értéket mutat (Smeets és González 2000). A tirozin-hidroxiláz a dopaminerg sejtek markere a kétéltű retinában is, mivel dopamin β -hidroxiláz immunreaktivitást nem mutattak ki, ami a noradrenerg sejtek hiányára utal (Zhu és Straznický 1990b). A *Bufo* és *Xenopus* fajok esetében a dopaminerg neuronok egységes dendrit morfológiával rendelkeznek, míg *Rana*-ban két altípust (vékony és vastag sejtek) különböztettek meg (Kicliter és mtsai., 1999). Egy korábbi közlemény szerint számuk az összes amakrin sejtnek kb. 0,5%-a (Víggh és mtsai., 2000). Egyes dopaminerg sejtek a külső plexiform réteg felé küldenek rostokat (Gábrriel és mtsai., 1991; Witkovsky és mtsai., 1994). Dendritjeik az 1-es és 5-ös szublaminaiban ágaznak szét. A kísérleteink során barna ásóbékában kimutatott TH-pozitív sejtek rostjaikat az IPL 1-es szublaminajába juttatták, és számuk alacsony volt. Az OPL felé irányuló nyúlványokat nem tudtuk megfigyelni, ami kissé eltér a más békákra jellemző mintázattól, ahol az OPL felé menő rostok alacsony számban bár, de megtalálhatók voltak.

5.3.4 Szerotonin

A legtöbb szerotonin immunreaktív sejt amakrin sejtnek bizonyult a kétéltűek retinájában (Schüttle és Witkovsky 1990; Zhu és Straznicky 1990a), azonban *Xenopus laevis*-ben bipoláris sejteket (Gläsener és mtsai., 1988; Schüttle és Witkovsky 1990; Zhu és mtsai., 1992), *Rana pipiens*-ben pedig ganglion sejteket (Liu és Debski 1993) is igazoltak. A szerotonin tartalmú amakrin sejteket két csoportba sorolták morfológiájuk alapján. Az egyik csoportba nagy sejttel rendelkező, széles dendritmezejű neuronok tartoznak, amelyek főleg az 1. és 2. szublamina juttatnak rostokat. A másik csoportba kis sejttel rendelkező, diffúz dendriteloszlású, kis dendritmezejű sejteket találtak (Vígh és mtsai., 2000). Zhu és munkatársai (1992) eredményei alapján a *Bufo* és *Xenopus* retinában mindegyik nagy, és néhány kis amakrin sejt szintetizálni is képes a szerotonint, míg a kis amakrin sejtek másik csoportja, a bipoláris és fotoreceptor sejtek sejttestjei, valamint a fotoreceptorok külső szegmensei csak akkumulálják azt. A szerotonint szintetizáló sejteknek csak egy csoportja, míg a szerotonint akkumuláló sejtek többsége GABA immunreaktivitást is mutat a *Bufo marinus* retinájában (Main és mtsai., 1993), míg *Xenopus*-ban szerotonin és calretinin kolokalizációját is kimutatták (Gábrriel 2000). *Pelobates*-ben a szerotonin tartalmú sejtek morfológiailag nem mutatnak eltérést, valamennyien nagy átmérőjű, szerotonin szintetizáló sejteknek tűnnek. Ennek igazolására azonban további kísérletek lesznek szükségesek.

5.3.5 Substance P

A SP-immunpozitív sejtek a béka retinára általánosan jellemző sejtfeleségek (Vígh és mtsai., 2000), amelyet vizsgálataink is alátámasztottak. A barna ásóbéka retinájából két, anatómiailag különböző SP tartalmú amakrin sejtet sikerült igazolnunk. A *Bufo* retinán korábban végzett mikroanatómiai vizsgálatok csak egy SP-pozitív sejtet írtak le (Hiscock és Straznicky 1989b), ez a sejtpopuláció azonban a GABA immunreaktivitása alapján heterogénnek mutatkozott (Main és mtsai., 1993). Lehetséges, hogy a békafajok közül legalább a szárazföldi békafajok retinája két SP-immunpozitív sejtípust tartalmaz, melyek egyikének transzmittere a GABA lehet.

A SP/SK kettősjelöléses vizsgálatok eredményei alapján a SP- és SK-immunreaktivitás világosan elkülönülő sejtpopulációkban lokalizálódik a *Pelobates* esetében, ami egy újfajta, neurokémiaileg meghatározható sejtípus felfedezését

jelentheti. Ezt a következtetést erősíti meg az a tény, hogy a vizsgálatainkban használt SP antitest - a preabszorpciós vizsgálatok tanúsága szerint- bizonyítottan nem keresztreagált az SK antitesttel. Az emlős idegrendszerben a hasonló antitestek keresztreagálnak a tachykinin peptid család más tagjaival is (Brecha és mtsai., 1987, De Koninck és mtsai., 1992), ezért az emlős rendszerekben kettős jelölés esetén a tachykinin immunreaktivitás felülvizsgálata szükséges a tachykinin tartalmú sejtek pontos neurokémiai alkotóelemének tisztázása végett.

Mivel az általánosan ismert, hogy a legtöbb peptid tartalmú amakrin sejt más transzmitter(ek)e)t is tartalmaz, feltételezzük, hogy a SK tartalmú sejtekben szintén található még legalább egy neuroaktív anyagot. A morfológiai jellegzetességek alapján az azonban nem valószínű, hogy ez a sejt a korábban leírt széles dendritmezejű amakrin sejtek bármelyikével azonos lenne (Vígh és mtsai., 2000). További kolokalizációs vizsgálatok elvégzésére van szükség annak igazolására, hogy ezek a sejtek tartalmazzák-e valamelyik fő gátló neurotranszmittert, a glicint vagy a GABA-t.

Az irodalomban van bizonyíték arra, hogy a béka idegrendszerben lévő tachykininerg sejtek SP és SK termelésére is képesek (Johansson és mtsai., 2004). Vizsgálataink bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy mindkét peptid a retinában is termelődik. Ezen eredmények alapján érdemes elgondolkodni, hogyan szintetizálódik a SP és a SK az amakrin sejtek ezen elkülönült populációiban. A kételtűekben található tachykininiek bioszintézisének részletei továbbra sem ismertek (Liu és Burcher 2005). Úgy gondoljuk, a szintézis folyamata eltérő lehet a SP és a SK esetében a béka retinában. Egy korábbi - a tengerimalac okuláris szöveteinek tachykinin szintézisével foglalkozó - tanulmány állítása szerint, a retinát leszámítva minden okuláris szövetben magasabb volt a SP molaris koncentrációja, mint a SK hasonló értéke (Hayes és mtsai., 1993). Ugyanez a tanulmány kromatográfiás vizsgálatok alapján arra a megállapításra jutott, hogy a tachykinin-1 gén transzkripciója különböző prekursor folyamatokkal és/vagy poszttranszlációs módosításokkal együtt új neurokémiai fenotípust eredményezhet, és befolyásolhatja a látás fiziológiáját. Valóban, a SK vizuális folyamatokra gyakorolt hatásáról készült egyetlen elérhető fiziológiai tanulmány eredménye azt mutatja, hogy hatása a SP hatásával épp ellentétes (Downing és Djamgoz 1993).

Annak ellenére, hogy a három fő peptid, a Substance P, Substance K, a neurokinin A és/vagy ezek fajspecifikus variánsai léteznek a kétéltűekben, kevés bizonyíték mutat arra, hogy az NK1 receptor mellett más tachykinin receptor is lenne a kétéltűek idegrendszerében (Johansson és mtsai., 2004, Liu és Burcher 2005). Bár meggyőző bizonyítékot még nem publikáltak az NK2 vagy az NK3 receptorok jelenléte ellen, jelenleg azt tudjuk, hogy az NK1 receptornak 3 izoformája (bNK1-A, bNK1-B és bNK1-C) létezik az agy varangyban (Liu és mtsai., 2004), melyek - az említés sorrendjében - 309, 390 és 371 aminosavból állnak. Ezek közül a bNK1-C mutatja a legnagyobb affinitást a SK felé (körülbelül 10%-át annak, mint amit a természetes ligandja, a bufokinin felé mutat (Liu és mtsai., 2004). Az NK1 receptor izoformák eloszlása a béka retinában nem ismert. Ha ez a receptor az egyetlen NK receptor típus a béka retinában, akkor az izoformái valószínűleg eltérően helyezkednek el az IPL-ben. Úgy gondoljuk, hogy ebben az esetben a bNK1-C eloszlása a SK eloszlását fogja követni. E hipotézis igazolására a jövőben további kísérletes vizsgálatok elvégzésére van szükség.

5.3.6 *Neuropeptid Y*

Hiscock és Straznický (1989a) varangyon tapasztalt eredményeihez hasonlóan a mi munkánk is kétféle, széles dendritmezőjű NPY-pozitív amakrin sejt jelenlétét erősítette meg. Az ott tapasztaltakhoz hasonlóan ezen sejtek térbeli eloszlása a barna ásóbéka retinájában is egyenletes, denzitásuk azonban a *Bufo marinus*-nál megfigyeltnél alacsonyabb ($22/\text{mm}^2$) értéket mutat. Fenti sejtek egyenletes eloszlása ellenére a varangy retinában a naso-temporalis meridián mentén a retina mindhárom rétegében (ONL, INL, GCL) nagyfokú sejtdenzitás növekedés figyelhető meg (Straznický 1993). A barna ásóbéka esetében csak a fotoreceptorok rétegét vizsgáltuk, ahol azonban a csapoknál megfigyelt denzitásemelkedés centro-nazálisan jelentkezett, és mértéke lényegesen elmaradt a varangynál tapasztaltaktól. Fentiek alapján feltételezhető, hogy az általunk vizsgált fajnál ez csak egy enyhe sejtdenzitás emelkedés, ami nem tekinthető valódi látócsíknak, mint ami megtalálható például a *Bufo* esetében. A pontosabb adatok érdekében, a látócsík meglétének vagy hiányának végső bizonyításához, további feladat lenne a ganglionsejt rétegben lévő sejtek denzitásának részletes vizsgálata.

A legfeltűnőbb eredmény az NPY-immunpozitív rostok megjelenése a belső rostos réteg 1-es szublamínájában. Kétéltűeken alkalmazott immuncitokémiai

módszerekkel korábban már kimutattak FMRFamid (Uchiyama és mtsai., 1988; Wirsig-Wiechmann és Basinger 1988) és Substance P (Uchiyama és mtsai., 1988) immunreaktív centrifugális látó rostokat a látóidegben és a retinában. Halakon végzett vizsgálatok a terminális ideg rostjainak FMRFamid és luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) tartalmát igazolták. Ezek a rostok a retina optikus rostok rétegén és a belső plexiform rétegen keresztül elérték a belső magvas réteget, ahol hosszú, egyenes rostokból álló plexust képeztek. Axonterminálisaik dopaminerg interplexiform- és horizontális sejteken, valamint GABAerg amakrin sejteken, illetve azok nyúlványain végződnek. Ez arra enged következtetni, hogy a horizontális és/vagy amakrin sejteken keresztül módosítják a retina vizuális jelfeldolgozó folyamatait (Stell és mtsai., 1988). Annak igazolására további vizsgálatok szükségesek, hogy az NPY-immunpozitív rostoknak lehet-e hasonló szerepe a barna ásóbéka retinájában.

A korábbi, békákon végzett vizsgálatokhoz hasonlóan (Main és mtsai., 1993) mi sem találtunk kísérleti objektumunkban NPY/TH kettősen jelölt struktúrát, habár a belső rostos réteg 1-es szublamínájában a fenti sejtek dendritjei szoros anatómiai közelségben vannak. Más gerinces fajok esetében sincs ismert példa ezen neurokémiai markerek kolokalizációjára retinális neuronokban, valószínűsíthető azonban a két sejtípus egymást kölcsönösen beidegző kapcsolata, épp a fent említett szoros térbeli együttállás okán. Ennek igazolására elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzésére van szükség.

5.4. Életmód vagy rokonság?

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a barna ásóbéka retinájának általános felépítése a négy lábú gerinces retinára jellemző, konzervatív rétegződést mutatja. Hasonló megállapítást tehetünk a dopaminerg amakrin sejt vonatkozásában is (nagy méretű sejttest, széles dendritfa és dominánsan a szublamina 1-ben történő nyúlvány elágazódás). A szűkebb rokonsági körre (Anura) jellemző neurokémiai azonosságok is felfedezhetők: széles dendritfájú Neuropeptid Y- és Substance P-pozitív amakrin sejtek. Az NPY innerváció amakrinsejtes komponense nagymértékben hasonlít a *Bufo* és a *Xenopus* retinában leírtakra (Hiscock és Straznicky 1989a, b), ellenben itt már megjelenik az első eltérés is, ami az életmódbeli különbségből adódhat: az erős centrifugális NPY-erg innerváció. A Substance P innerváció tekintetében is van némi különbség: míg *Bufo*-ban 3 szublamínás eloszlást (SL1, 3, 5) írtak le a fenti szerzők,

addig *Pelobates*-ben az SP a középső szublaminákban (SL2, 3, 4) fordul elő dominánsan. Egy apró kétely azonban megfogalmazódik bennünk, nevezetesen az 1980-as évek végén használt anti SP antitestek specificitása. A mi vizsgálataink azt mutatták, hogy az 1-es és az 5-ös szublaminában zömmel inkább az SK tartalmú rostok vannak jelen. Ha a mi vizsgálataink során tapasztalt SP és SK immunreaktivitási mintázatot egymásra vetítenénk, akkor jó megközelítéssel olyan képet nyernénk, melyet a fent említett szerzők anti SP antitestek használatával írtak le. A fentiekből is világosan látszik, hogy a *Pelobates fuscus* retinája jól illeszkedik abba a leszármazási sorba, ami a békák Pipanura ágára jellemző.

Fenti hasonlóságok mellett számos eltérésre is fényt derítettünk. Ezek a különbségek vizsgálataink alapján elsősorban a fotoreceptorok eloszlásában, ezen belül is a csapok alacsony arányában mutatkoznak meg. Azonban nem csak az alacsony (10% körüli) arány tartogatott meglepetést számunkra, hanem a pálcikák általános morfológiája és a csapok neurokémiája is. Békákban a kétféle pálcika típust (normál és minor rod) már korábban leírták (Witkovsky és mtsai., 1981a). Mi e két típus mellé a magmorfológia alapján egy harmadikat is leírtunk, aminek spektrális szenzitivitása egyenlőre nem ismert. A csapok esetében pedig e csoportra nézve újdonság volt a GABA tartalmú csapok leírása. Mindez arra utalhat, hogy a vizsgált sejtípusok közül a fotoreceptorok lehetnek azok a retinális neuronok, melyek leginkább változékonyak az életmód függvényében. Nagyon fontos lenne a közeljövőben feltérképezni a ganglion sejtek morfológiáját és fiziológiáját, hiszen ez adhat végső választ arra, hogy a retinális projekció agyi központokba küldött kódjai rokoníthatók-e a korábban leírt kódrendszerekkel (Grüsser és Grüsser-Cornehls 1976).

Mindezek a hasonlóságok és különbségek, amelyeket fent felsoroltunk, és azok a továbbiak, amelyeket még nem tudtunk leírni, magyarázatot adhatnak arra, hogy miért különbözik a napi aktivitási görbe, a táplálkozási viselkedés és az optokinetikus nisztagnus. Biztosak vagyunk azonban abban, hogy mindezek a különbségek, legalábbis részben a retinális mozaikok szerkezeti különbségeiből adódnak. Ezeknek néhány elemét megmutattuk disszertációnkban, és valószínűsíthetően számos további eltérés még felismerésre vár.

6. Következtetések

A retina általános szövettani, szerkezeti felépítése, a megfigyelt neuronok morfológiája nagyban hasonlít az eddig vizsgált kétéltű fajoknál tapasztaltakhoz, azonban az alábbi néhány alapvető különbség felfedezhető:

1. A barna ásóbéka retinájában a csapok száma és a pálcikákhoz viszonyított aránya is lényegesen alacsonyabb az eddig vizsgált kétéltűekhez képest.
2. A csapok denzitása a retina centro-nazalis területén a legnagyobb. A periférián mért értékekhez képest a denzitásemelkedés azonban lényegesen kisebb mértékű (kb. 1,5x-es), mint a kifejezett látócsíkkal rendelkező *Bufo marinus* esetében (kb. 6x-os), ami a látócsík valószínű hiányára utal.
3. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során az eddig morfológiai alapon elkülöníthető kétféle pálcika mellett kimutattunk egy, a normál pálcikákhoz hasonló, de sejtmagjának laza kromatinszerkezete miatt attól mégis eltérő fotoreceptort.
4. Az egyes vizsgált sejttípusok neurokémiajában is sikerült más kétéltű taxonoknál tapasztaltaktól eltérő eredményt kimutatni. Vizsgálataink bizonyították GABA-immunreaktív csapok jelenlétét.
5. Kísérleteinkben igazoltunk SK-immunreaktív amakrin sejteket, amelyekben a SK nem kolokalizált SP-vel.
6. Azonosítottunk NPY-immunpozitív centrifugális rostokat.
7. Csak kismértékű eltérést tapasztaltunk a neurokémiai markerek eloszlásában calretinin, tirozin-hidroxiláz, szerotonin, SP és NPY esetében, míg szomatosztatin jelenlétét nem tudtuk igazolni.

Az alacsony csapszám, a neurokémiai markerekben tapasztalható különbség és a látócsík (visual streak) valószínű hiánya már alapot ad arra a feltételezésre, hogy összefüggés van a látórendszer struktúrája és az életmód között, ennek meggyőző bizonyítására azonban a látórendszer agyi struktúráinak részletes vizsgálatát is szükséges elvégezni.

7. Összefoglalás

Dolgozatunkban egy kétéltű faj, a barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) retinájának vizsgálatát tűztük ki célul. Ez a faj éjszaka aktív, rejtőzködő életmódú, a nappalt föld alatti üregekben tölti. Hipotézisünk szerint a speciális életkörülmények és a környezethez való alkalmazkodás tükröződnek a barna ásóbéka retinájának szerveződési és élettani sajátágaiban. Ezért az általános retinaszerkezetet, valamint két kiemelt sejtípus, a fotoreceptor sejtek és az amakrin sejtek morfológiáját, neurotranszmitter tartalmát és retinális eloszlását tanulmányoztuk immunhisztokémiai-, fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel. A retina általános szövettani, szerkezeti felépítése, a megfigyelt neuronok morfológiája nagyban hasonlított az eddig vizsgált *Bufo*, *Rana* és *Xenopus* fajoknál tapasztaltakhoz, azonban az alábbi néhány alapvető különbség felfedezhető volt. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során az eddig morfológiai alapon elkülöníthető kétféle pálcika mellett kimutattunk egy, a normál pálcikákhoz hasonló, de sejtmagjának laza kromatinszerkezete miatt attól mégis eltérő fotoreceptort. A barna ásóbéka retinájában a csapok száma és a pálcikákhoz viszonyított aránya (1:9) is lényegesen alacsonyabbnak bizonyult az eddig vizsgált kétéltűekhez képest. A csapok denzitása a retina centro-nazalis területén volt a legnagyobb. A periférián mért értékekhez képest a denzitásemelkedés azonban lényegesen kisebb mértékű (kb. 1,5x-es), mint a kifejezett látócsíkkal rendelkező *Bufo marinus* esetében (kb. 6x-os), ami a látócsík valószínű hiányára utal. Az egyes vizsgált sejtípusok neurokémijában is sikerült más kétéltű taxonoknál tapasztaltaktól eltérő eredményt kimutatni. Vizsgálataink bizonyították GABA-immunreaktív csapok jelenlétét, valamint olyan Substance K (SK)-immunreaktív amakrin sejteket igazoltak, amelyekben a SK nem kolokalizált Substance P (SP)-vel. Azonosítottunk NPY-immunpozitív centrifugális rostokat is. Mindezek mellett csak kismértékű eltérést tapasztaltunk a neurokémiai markerek eloszlásában calretinin, tirozin-hidroxiláz, szerotonin, SP és NPY esetében, míg szomatosztatin jelenlétét nem tudtuk igazolni. Az alacsony csapszám, a neurokémiai markerekben tapasztalható különbség és a látócsík (visual streak) valószínű hiánya már alapot ad arra a feltételezésre, hogy összefüggés van a látórendszer struktúrája és az életmód között, ennek meggyőző bizonyítására azonban a látórendszer agyi struktúráinak részletes vizsgálatát is szükséges elvégezni.

8. Summary

The purpose of our study has been to investigate the retina of the Amphibian spadefoot toad (*Pelobates fuscus*). This secretive species has nocturnal activity, spending the daytime hours burrowing underground. According to our hypothesis, its special life conditions and adaptation to the environment are reflected in the anatomical and physiological features of spadefoot toad retina. Therefore we focused our studies on general retina structure, the morphology, neurotransmitter content and retinal distribution of two distinguished cell types i. e. photoreceptor and amacrine cells, using immunohistochemical methods, light and electron microscopy. The general histological and organisational structure of the retina and the morphology of the studied neurons are highly similar to what had been observed in studied species of *Bufo*, *Rana* and *Xenopus*, although some basic differences do appear. During electron microscopic investigations, it was possible to identify, in addition to the two morphologically distinct types of rods, a photoreceptor cell type similar to normal rods but somewhat differing from them in the loose chromatine structure of its nucleus. Both the number of cones and their proportion compared to rods (1:9) were much lower in the retina of the spadefoot toad than in other studied amphibians. The density of cones was highest in the centro-nasal area of the retina. However, the increase in cone density in comparison with its values in peripheric retina areas is substantially lower (cca. 1,5 times) than in *Bufo marinus* (cca. 6 times), a toad with a pronounced visual streak in its retina, suggesting the absence of such a visual streak in the spadefoot toad. Also, in the neurochemistry of certain studied cell types, it was possible to indicate differences as compared to other amphibian taxa. Our studies have confirmed the presence of GABA-immunoreactive cones, and proved the occurrence of Substance K immunoreactive amacrine cells in which Substance K is not co-localised with Substance P. We have also identified Neuropeptide Y-immunopositive centrifugal fibres. Nevertheless, only limited difference was found in the distribution of neurochemical markers in the case of calretinin, tyrosine-hydroxylase, serotonin, Substance P and Neuropeptide Y, and it was not possible to confirm the presence of somatostatin. The low number of cones, the difference in neurochemical markers and the possible absence of a visual streak provide a basis for the assumption that there is a relationship between the structure of the visual system and behaviour. However, to provide firm proof for this hypothesis it would be necessary to perform a detailed investigation into the cerebral structures of the visual system.

9. Irodalomjegyzék

- Agardh E., Bruun A., Ehinger B., Ekstrom P., Vanveen T., Wu J.Y. (1987): Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive and glutamic-acid decarboxylase-immunoreactive neurons in the retina of different vertebrates. *J. Comp. Neurol.* 258: 622–630.
- Aho A.-C. (1997): The visual acuity of the frog (*Rana pipiens*). *J. Comp. Physiol. A.* 180: 19-24.
- Aho A.-C., Donner K., Helenius S., Olesen Larsen L., Reuter T. (1993): Visual performance of the toad (*Bufo bufo*) at low light levels: retinal ganglion cell responses and prey-catching accuracy. *J. Comp. Physiol. A.* 172:671-682.
- Beazley L., Keating M.J., Gaze R.M. (1972): The appearance, during development, of responses in the optic tectum following visual stimulation of the ipsilateral eye in *Xenopus laevis*. *Vision Research* 12(3): 407-410.
- Blaustein A.R., Wake D.B. (1990): Declining amphibian populations: A global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5(7): 203-204.
- Brandstätter J.H., Koulen P., Wässle H. (1997): Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J. Neurosci.* 17: 9298-9307.
- Brecha N.C. (1992): Expression of GABA_A receptors in the vertebrate retina. *Prog. Brain Res.* 90: 3–28.
- Brecha N.C., Johnson D., Bolz J., Sharma S.C., Parnavelas J.G., Liebermann A.R. (1987): Substance P-immunoreactive retinal ganglion cells and their central axon terminals in the rabbit. *Nature* 327: 155-158.
- Brivanlou I.H., Warland D.K., Meister M. (1998): Mechanisms of concerted firing among retinal ganglion cells. *Neuron* 20: 527-539.
- Caine H.S., Gruberg E.R. (1985): Ablation of nucleus isthmi leads to loss of specific visually elicited behaviors in the frog *Rana pipiens*. *Neurosci. Lett.* 54(2-3): 307-312.
- Cannatella D. (2008): Salientia. Frogs and toads. Version 11 January 2008 (under construction). <http://tolweb.org/Salientia/14938/2008.01.11> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/Catalani> E., Gangitani C., Bosco L., Casini G. (2004): Expression of the neurokinin 1 receptor in the mouse retina. *Neuroscience* 128: 519–530.

- Chan T.L., Martin P.R., Clunas N., Grünert U. (2001): Bipolar cell diversity in the primate retina: morphologic and immunocytochemical analysis of a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *J. Comp. Neurol.* 437: 219–239.
- Chiquet C., Dkhissi-Benyahya O., Cooper H.M. (2005): Calcium-binding protein distribution in the retina of strepsirhine and haplorhine primates. *Brain Res. Bull.* 68: 185-194.
- Collins J.P. és Storfer A. (2003): Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89-98.
- Connaughton V.P., Behar T.N., Liu W.L.S., Massey S.C. (1999): Immunocytochemical localization of excitatory and inhibitory neurotransmitters in the zebrafish retina. *Visual Neurosci.* 16: 483–490.
- Cuenca N., Deng P., Linberg K.A., Lewis G.P., Fisher S.K., Kolb H. (2002): The neurons of the ground squirrel retina as revealed by immunostains for calcium binding proteins and neurotransmitters. *J. Neurocytol.* 31: 649–666.
- De Koninck Y., Ribeiro-da-Silva A., Henry J.L., Cuello A.C. (1992): Spinal neurons exhibiting specific nociceptive response abundant Substance P-containing synaptic contacts. *Proc. Natnl. Acad. Sci. USA.* 89: 5073-5077.
- Deng P., Cuenca N., Doerr T., Pow D.V., Miller R., Kolb H. (2001): Localization of neurotransmitters and calcium binding proteins to neurons of salamander and mudpuppy retinas. *Vis. Res.* 41: 1771–1783.
- Dowling J.E. (1987): *The retina. An approachable part of the brain.* Belknap Press of Harvard University Press. London. 282 pp.
- Downing J.E.G., Djamgoz M.B.A. (1993): Electrophysiological effects of tachykinin analogs on ganglion cell activity in cyprinid fish retina. *Neuropeptides* 24: 109-116.
- Eldred W.D., Schütte M., Cochrane D.E., Panula P. (1992): Immunocytochemical and biochemical studies of histamine in the retina of the turtle *Pseudemys scripta*, *Cell Tissue Res.* 267: 449–454.
- Engbretson G.A., Anderson K.J., Wu J.Y. (1988): GABA as a potential transmitter in lizard photoreceptors: immunocytochemical and biochemical evidence. *J. Comp. Neurol.* 278: 461-471.
- Fisher M.D., Udin S.B. (1988): Connections between the nucleus isthmi and the tectum in larval and post-metamorphic axolotls. *J. Neurobiol.* 19: 111-125.
- Frost D.R. (2011): *Amphibian Species of the World: an online reference.* Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at

<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>. American Museum of Natural History, New York, USA.

- Frumkes T.E., Miller R.F., Slaughter M., Dacheux R.F. (1981): Physiological and pharmacological basis of GABA and glycine actions on neurons of mudpuppy retina. III. Amacrine-mediated inhibitory influences on ganglion cell receptive-field organization: a model. *J Neurophysiol* 45: 783-804.
- Gasc J.-P., Cabela A., Crnobrnja-Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martínez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T.S., Veith, M., Zuiderwijk A. (Eds.) (1997): Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Societas Europaea Herpetologica & Muséum National d'Histoire Naturelle (IEGB/SPN), Paris 496 pp.
- Gábríel R. (2000): Calretinin is present in serotonin- and GABA-positive amacrine cell populations in the retina of *Xenopus laevis*. *Neurosci. Lett.* 285: 9-12.
- Gábríel R., Zhu B.S., Straznický C. (1991): Tyrosine hydroxylase immunoreactive elements in the distal retina of *Bufo marinus*: a light- and electron microscopic study. *Brain Res.* 559: 225–232.
- Gábríel R., Straznický C., Wye-Dvorak J. (1992): GABA-like immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: evidence for the presence of GABA-containing ganglion cells. *Brain Res.* 571: 175-179.
- Gábríel R., Wilhelm M., Straznický C. (1992): Microtubule-associated protein 2 (MAP2)-immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: colocalisation with tyrosine hydroxylase and serotonin in amacrine cells. *Cell Tissue Res.* 269: 175-182.
- Gábríel R., Straznický C. (1993): Quantitative analysis of GABA-immunoreactive synapses in the retina of *Bufo marinus*: identification of direct output to ganglion cells and contacts with dopaminergic amacrine cells. *J. Neurocytol.* 22: 26-38.
- Gábríel, R., Straznický, C. (1995): Synapses of optic axons with GABA- and glutamate-containing elements in the optic tectum of *Bufo marinus*. *J. Brain Res.* 36: 329-340.
- Gábríel R., Völgyi B., Pollák E. (1998): Calretinin-immunoreactive elements in retina and optic tectum of the frog, *Rana esculenta*. *Brain Res.* 782: 53-62.
- Gábríel R., Wilhelm M. (2001): Structure and function of photoreceptor and second-order cell mosaics in the retina of *Xenopus*. *Int. Rev. Cytol.* 210: 77-120.
- Ge L.H., Lee S.-C., Liu J., Yang X.-L. (2007): Glycine receptors are functionally expressed on bullfrog retinal cone photoreceptors. *Neuroscience* 146: 427-434.

- Van Gelder J., Hoedermackers H.M. (1971): Sound activity and migration during the breeding period of *Rana temporaria* L., *R. arvalis* Nilsson, *Pelobates fuscus* Laur. and *Rana esculenta* L. J. Anim. Ecol. 40(3): 559-568.
- Glasser S., Ingle D. (1978): The nucleus isthmus as a relay station in the ipsilateral visual projection to the frog's optic tectum. Brain Res. 159: 214-218.
- Gläsener G., Schmidt C., Himstedt W. (1988): Two populations of serotonin-immunoreactive neurons in the frog (*Rana esculenta*) retina. Neurosci. Lett. 84: 251-254.
- Gold G.H., Dowling J.E. (1979): Photoreceptor coupling in retina of the toad, *Bufo marinus*. I. Anatomy. J. Neurophysiol. 42: 292-310.
- Grobstein P., Comer C. (1978): A crossed isthmotectal projection in *Rana pipiens* and its involvement in the ipsilateral visuotectal projection. Brain Res. 156: 117-123.
- Gruberg E.R., Lettvin J.Y. (1980): Anatomy and physiology of a binocular system in the frog *Rana pipiens*. Brain Res. 192(2): 313-325.
- Grüsser O.J., Grüsser-Cornehls U. (1976): Neurophysiology of the anuran visual system. In: Llinás R., Precht W. (Eds.): Frog Neurobiology. Springer, Berlin Heidelberg. pp. 297-385.
- Hailman J.P. (1976): Oildroplets in the eyes of adult anuran amphibians: A comparative survey. J. Morph. 148: 453-468.
- Hayes R.G.J., Shaw C., Chakravarthy U., Buchanan K.D. (1993): Tachykinin-1 gene products in porcine ocular tissues – evidence for transcriptional and posttranslational regulation. Vision Res. 33: 1477-1480.
- Hayes T.B., Falso P., Gallipeau S., Stice M. (2010): The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. J. Exp. Biology 213: 921-933.
- Haverkamp S., Gosh K.K., Hirano A.A., Wässle H. (2003): Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. J. Comp. Neurol. 455: 463-476.
- Hensley S.H., Yang X.L., Wu S.M. (1993): Relative contribution of rod and cone inputs to bipolar cells and ganglion cells in the tiger salamander retina. J. Neurophysiol. 69: 2086-2098.
- Hiscock, J.J., Straznicky C. (1989a): Neuropeptide Y-like immunoreactive amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. Brain Res., 494(1): 55-64.
- Hiscock J.J., Straznicky C. (1989b): Morphological characterization of Substance P-like immunoreactive amacrine cells in the anuran retina, Vision Res. 29: 293-301.

- Hollyfield J.G., Rayborn M.E., Rosenthal J. (1984): Two populations of rod photoreceptors in the retina of *Xenopus laevis* identified with ³H-fucose autoradiography. *Vision Res.* 24: 777-782.
- IUCN (2011): IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 January 2012.
- Johansson Å., Liu L., Holmgren S., Burcher E. (2004): Characterization of receptors for two *Xenopus* gastrointestinal tachykinin peptides in their species of origin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370: 35-45.
- Kolb H, Nelson R, Mariani A (1981) Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.* 21: 1081-1114.
- Korsós Z. (1997): *Nemzeti Biodivezítés-monitorozó rendszer VIII. Kételtűek és hüllők.* Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest. 44 pp.
- Kamermans M., Werblin F. (1992): GABA-mediated positive autofeedback loop controls horizontal cell kinetics in tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 12: 2451–2463.
- Kicliter E., Bengoa F., Herrera J.A., González M., Ortíz-Goveo E., Rodriguez V., Lugo N. (1999): Two groups of TH-like immunoreactive neurons in the frog (*Rana pipiens*) retina. *Brain Res.* 816: 149–157.
- Krause J.E., Chirgwin J.M., Carter M.S., Xu Z.S., Hershey A.D. (1987): Three rat preprotachykinin messenger-RNAs encode the neuropeptides Substance P and neurokinin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 881–885.
- Lázár Gy. (1971): The projection of the retinal quadrants on the optic centres in the frog: a terminal degeneration study. *Acta. Morph. Acad. Sci. Hung.* 19: 325-334.
- Lázár Gy. (1975): A béka látóközpontjának szerkezeti vizsgálata. Kandidátusi értekezés. Pécs.
- Lázár Gy., Székely Gy. (1969): Distribution of optic terminals in the different optic centres of the frog. *Brain Res.* 16: 1-14.
- Liebman P.A., Entine G. (1968): Visual pigments of frog and tadpole (*Rana pipiens*). *Vision Res.* 8: 761-775.
- Liu J., Zhao J.-W., Du J.-L., Yang X.-L. (2005): Functional GABA_B receptors are expressed on bullfrog cones. *Neuroscience* 132: 103-113.
- Liu J., Li G.-L., Yang X.-L. (2006): An ionotropic GABA receptor with novel pharmacology at bullfrog cone photoreceptor terminals. *NeuroSignals* 15: 13-25.
- Liu J., Yang X.-L. (2006): Off response of bullfrog cones is shaped by terminal ionotropic GABA receptors. *Brain. Res. Bull.* 71: 219-223.

- Liu L., Burcher E. (2005): Tachykinin peptides and receptors: putting amphibians into perspective. *Peptides* 26(8): 1369-1382.
- Liu L., Markus I., Vandenberg R.J., Neilan B.A., Murray M., Burcher E. (2004): Molecular identification and characterization of three isoforms of tachykinin NK1-like receptors in the cane toad *Bufo marinus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R575-R585.
- Liu J., Zhao J.-W., Du J.-L., Yang X.-L. (2005): Functional GABA_B receptors are expressed at the cone terminals in bullfrog retina. *Neuroscience* 132: 103–113.
- Liu Q., Debski E.A. (1993): Serotonin-like immunoreactivity in the adult and developing retina of the leopard frog *Rana pipiens*. *J. Comp. Neurol.* 338: 391–401.
- Long K.O., Fisher S.K. (1983): The distribution of photoreceptor and ganglion cells in the california ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*. *J. Comp. Neurol.* 221: 329-340.
- Lukasiewicz P.D. (1996): GABA(C) receptors in the vertebrate retina, *Mol. Neurobiol.* 12: 181–194.
- Main C.M., Wilhelm M., Gábríel R. (1993): Colocalization of GABA-immunoreactivity in neuropeptide-and monoamine-containing amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*, *Arch. Histol. Cytol.* 56 (2): 161-166.
- Maple B.R., Zhang J., Pang J.J., Gao F., Wu S.M. (2005): Characterization of displaced bipolar cells in the tiger salamander retina. *Vis. Res.* 45: 697–705.
- Marc R.E., Liu W.L.S., Kalloniatis M., Raiguel S.F., Vanhaesendonck E. (1990): Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina, *J. Neurosci.* 10: 4006–4034.
- Mariani A.P., Caserta M.T. (1986): Electron-microscopy of glutamate-decarboxylase (GAD) immunoreactivity in the inner plexiform layer of the rhesus-monkey retina *J. Neurocytol.* 15: 645–655.
- Maturana H.R., Lettwin J.Y., McCulloch W.S., Pitts W.H. (1960): Anatomy and physiology of vision in the frog (*Rana pipiens*). *J. Gen. Physiol.* 43: 129-175.
- Main C.M., Wilhelm M., Gábríel R. (1993): Colocalization of GABA-immunoreactivity in neuropeptide- and monoamine-containing amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. *Arch. Histol. Cytol.* 56: 161-166.
- Meissner K. (1983): Circadiane Rhythmen von Lokomotion, Atmungsaktivität und Pupillomotorik bei der Kröte *Pelobates fuscus* LAUR. *Zool. Jb. Physiol.*, 87: 297-308.

- Meister M., Lagnado L., Baylor D.A. (1995): Concerted signaling by retinal ganglion cells. *Science* 270(5239): 1207-1210.
- Menger N., Pow D.V., Wassle H. (1998): Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 401: 34–46. Miller R.F., Dacheux R.F. (1976): Synaptic organization and ionic basis of on and off channels in mudpuppy retina. II. Chloride-dependent ganglion cell mechanisms. *J. Gen. Physiol.* 67: 639-659.
- Molnár L., Gábrriel R. (2001): Fény- és elektronmikroszkópos mikrotechnika. Dialóg-Campus Kiadó, Budapest-Pécs. pp. 1-549.
- Morona R., Moreno N., López J.M., González A. (2007): Comparative analysis of calbindin D-28K and calretinin in the retina of anuran and urodele amphibians: Colocalization with choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase. *Brain Res.* 1182: 34-49.
- Mosinger J, Studholme K, Yazulla S (1986): GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp. Eye Res.* 42: 631-644.
- Müller B., Peichl L. (1989): Topography of cones and rods in the tree shrew retina. *J. Comp. Neurol.* 282: 581-594.
- Nakanishi S. (1986): Structure and regulation of the preprotachykinin gene. *Trends Neurosci.* 9: 41–44.
- Nelson R. (1982): AII amacrine cells quicken the time course of rod signals in the cat retina. *J. Neurophysiol.* 47: 928–947.
- Nguyen V.-S., Straznicky C. (1989): The development and the topographic organization of the retinal ganglion cell layer in *Bufo marinus*. *Exp. Brain. Res.* 75: 345-353.
- Nguyen-Legros J., Versaux-Botteri C., Savy C. (1997): Dopaminergic and GABAergic retinal cell populations in mammals, *Microsc. Res. Tech.* 36: 26–42.
- Nishimura Y., Schwartz M.L., Rakic P. (1986): GABA and GAD immunoreactivity of photoreceptor terminals in primate retina. *Nature* 320: 753-756.
- Nöllert A. (1990): Die Knoblauchkröte. Die Neue Brehm-Bucherei, Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt. 144 pp.
- Packer O., Hendrickson E., Curcio C.A. (1989): Photoreceptor topography of the retina in the adult pigtail macaque (*Macaca nemestrina*). *J. Comp. Neurol.* 288: 165-183.
- Pasteels B., Rogers J., Blachier F., Pochet R. (1990): Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis. Neurosci.* 5: 1–16.

- Pattnaik B., Jellali A., Sahel J., Dreyfus H., Picaud S. (2000): GABA_C receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors, *J. Neurosci.* 20: 6789–6796.
- Pennefather J.N., Lecci A., Candenas M.L., Patak E., Pinto F.M., Maggi C.A. (2004): Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 74: 1445–1463.
- Pognetto M.S., Cantino D., Fasolo A. (1992): Carnosine-like immunoreactivity is associated with synaptic vesicles in photoreceptors of the frog retina. *Brain Res.* 578: 261–268.
- Pollák E. (1998): A béka nucleus isthmi ultrastrukturális és immunhisztokémiai jellemzése. PhD értekezés. Pécs. 79 pp.
- Pourcho R.G. (1996): Neurotransmitters in the retina. *Curr. Eye. Res.* 15: 797–803.
- Pourcho R.G., Goebel D.J. (1985): A combined Golgi and autoradiographic study of (³H)glycine-accumulating amacrine cells in the cat retina. *J Comp Neurol.* 233: 473-480.
- Pourcho R.G., Owczarzak M.T. (1989): Distribution of GABA immunoreactivity in the cat retina - a light-microscopic and electron-microscopic study. *Visual Neurosci.* 2: 425-435.
- Puky M. (2000): A comprehensive three-year herpetological survey in the Gemenc Region of the Danube-Dráva National Park, Hungary. *Opusc. Zool. Budapest.* 32: 113-128.
- Puky M., Schád P., Szövényi G. (2005): Magyarország herpetológiai atlasza/ Herpetological atlas of Hungary. Varangy Akciócsoport Egyesület, Budapest. 207 pp.
- Purger J.J. (1998): Diet of Red-footed Falcon *Falco vespertinus* nestlings from hatching to fledging. *Ornis Fennica* 75 (4): 185-191.
- Repérant J., Rio J.P., Ward R., Wasowicz M., Miceli D., Medina M., Pierre J. (1997): Enrichment of glutamate-like immunoreactivity in the retinotectal terminals of the viper *Vipera aspis*: an electron microscope quantitative immunogold study. *J. Chem. Neuroanat.* 12: 267-280.
- Rio J.P., Vesselkin N.P., Reperant J., Kenigfest N.B., Miceli D., Adanina V. (1996): Retinal and non-retinal inputs upon retinopetal RMA neurons in the lamprey: a light and electron microscopic study combining HRP axonal tracing and GABA immunocytochemistry. *J. Chem. Neuroanat.* 12: 51-70.
- Röhlich P., Szél Á., Papermaster D.S. (1989): Immunocytochemical reactivity of *Xenopus laevis* retinal rods and cones with several monoclonal antibodies to visual pigments. *J Comp Neurol.* 290: 105-117.

- Röhlich P., Szél Á. (2000): Photoreceptor cells in the *Xenopus* retina. *Microsc. Res. Tech.* 50(5): 327-37.
- Sanna P.P., Keyser K.T., Celio M.R., Karten H.J., Bloom F.E. (1993): Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the vertebrate retina. *Brain Res.* 600: 141–150.
- Scalia F. (1976): The optic pathway of the frog: nuclear organisation and connections. In: Llinás R., Precht W. (Eds.): *Frog Neurobiology*. Springer, Berlin Heidelberg. pp. 386-406.
- Schütte M., Witkovsky P. (1990): Serotonin-like immunoreactivity in the retina of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *J. Neurocytol.* 19: 504-518.
- Shkolnik-Yarros E.G., Podugolnikova T.A. (1978): Bipolar cells of the frog retina: a Golgi study. *Vision Res.* 18: 301-310.
- Slaughter M.M. (1995): GABA_B receptors in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 14: 293–312.
- Slaughter M.M., Miller R.F. (1981): 2-amino-4-phosphobutyrate: a new pharmacological tool for retina research. *Science* 211: 182-185.
- Smeets W.J., González A. (2000): Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res. Rev.* 33: 308–379.
- Smiley J.F., Basinger S.F. (1988): Somatostatin-like immunoreactivity and glycine high-affinity uptake colocalize to an interplexiform cell type of the *Xenopus laevis* retina. *J. Comp. Neurol.* 274: 608-618.
- Steinberg R.H. (1973): Scanning electron microscopy of the bullfrog's retina and pigment epithelium. *Z. Zellforsch.* 143: 451-463.
- Stell, W.K., Walker S.E., Ball A.K. (1987): Functional-anatomical studies on the terminal nerve projection to the retina of bony fishes. *Ann. NY Acad. Sci.* 519: 80-96.
- Stone S, Schütte M (1991) Physiological and morphological properties of OFF- and ON-center bipolar cells in *Xenopus* retina: effects of glycine and GABA. *Visual Neurosci.* 7: 363-376.
- Stone S, Witkovsky P, Schütte M (1990) A chromatic horizontal cell in *Xenopus* retina: intracellular staining and synaptic pharmacology. *J. Neurophysiol.* 64: 1683-1694.
- Straznicky C. (1993): Development of the anuran retina: Past and present. In: Fawcett J.W., Sharma S.C. (Eds.): *Formation and regeneration of nerve connections*. Birkhauser, Boston. pp. 162-184.

- Straznicky C., Straznicky I.T. (1988): Morphological classification of retinal ganglion cells in adult *Xenopus laevis*. *Anat. Embryol.* 178: 143-153.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L., Waller R.W. (2004): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783.
- Székely Gy., Lázár Gy. (1976): Cellular and synaptic architecture of the optic tectum. In: Llinas R., Precht W. (Eds.): *Frog Neurobiology*, Springer-Verlag, New York. pp. 407-434..
- Szél Á., van Veen T., Röhlich P. (1989): Retinal cone differentiation. *Nature* 370: 336.
- Thoreson W.B., Witkovsky P. (1999): Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 18: 765-810.
- Tóth P., Straznicky K. (1989): The morphological characterization and distribution of displaced ganglion cells in the anuran retina. *Visual Neurosci.* 3: 551-561.
- Tóth P., Lázár Gy., Wang S.-R., Li T.-B., Xu J., Pál E., Straznicky C. (1994): The contralaterally projecting neurons of the isthmus nucleus in five anuran species: A retrograde tracing study with HRP and cobalt. *J. Comp. Neurol.* 346: 306-320.
- Uchiyama H., Reh T.A., Stell W.K. (1988): Immunocytochemical and morphological evidence for a retinopetal projection in anuran amphibians. *J. Comp. Neurol.* 274: 48–59.
- Yang C.-Y., Lukasiewicz P., Maguire G., Werblin FS, Yazulla S (1991): Amacrine cells in the tiger salamander retina: morphology, physiology and neurotransmitter identification. *J. Comp. Neurol.* 312: 19-32.
- Yang C.Y., Yazulla S. (1994) Glutamate-immunoreactivities, GABA-immunoreactivities, and GAD-immunoreactivities co-localize in bipolar cells of tiger salamander retina. *Visual Neurosci.* 11: 1193–1203.
- Yang C.Y., Wang H.H. (1999): Anatomical and electrophysiological evidence for GABAergic bipolar cells in tiger salamander retina. *Vision Res.* 39: 3653–3661.
- Vaney D.I. (1990): The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 9: 49–100.
- Vardi N., Zhang L.-L., Payne J.A., Sterling P. (2000): Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite response to GABA. *J. Neurosci.* 20: 7657-7663.
- Varela C., Rivera L., Blanco R., Villa P. (2005): Depolarizing effect of GABA in horizontal cells of the rabbit retina. *Neurosci. Res.* 53: 257-264.

- Vígh J., Bánvölgyi T., Wilhelm M. (2000): Amacrine cells of the anuran retina: morphology, chemical neuroanatomy and physiology, *Microsc. Res. Techn.* 50: 373-383.
- Wake, D.B. (1991): Declining amphibian populations. *Science* 253: 860.
- Warland D.K., Reinagel P., Meister M. (1997): Decoding visual information from a population of retinal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* 78: 2336-2350.
- Wässle H., Chun M.H. (1988): Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the cat retina, *J. Neurosci.* 8: 3383–3394.
- Wässle H., Peichl L., Airaksinen M.S., Meyer M. (1998.): Calcium-binding proteins in the retina of a calbindin-null mutant mouse. *Cell Tissue Res.* 292: 211–218.
- Wilhelm M., Gábríel R. (1999): Functional anatomy of the photoreceptor and second-order cell mosaic in the retina of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 297: 35-46.
- Wirsig-Wiechmann C.R., Basinger S.F. (1988): FMRFamide-immunoreactive retinopetal fibers in the frog (*Rana pipiens*): demonstration by lesion and immunocytochemical techniques. *Brain Res.* 449: 116–134.
- Witkovsky, P., Levine, J.S., Engbretson, G.A., Hassin, G., and MacNichol, E.F. (1981a). A microspectrophotometric study of normal and artificial visual pigments in the photoreceptors of *Xenopus laevis*. *Vision Res.* 26: 867-873.
- Witkovsky P., Yang C.Y., Ripps H. (1981b): Properties of blue-sensitive rod in the *Xenopus retina*. *Vision Res.* 21: 875-883.
- Witkovsky P., Zhang J., Blam O. (1994): Dopaminergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: amacrine vs. interplexiform cell subtypes and relation to bipolar cells. *Cell Tissue Res.* 278: 45-56
- Wong R.O.L. (1989): Morphology and distribution of neurons in the retina of the american garter snake *Thamnophis sirtalis*. *J. Comp. Neurol.* 283: 587-601.
- Wye-Dvorak J., Straznický C., Tóth P. (1992): Retinal projections in the cane toad, *Bufo marinus*. *Brain Behav. Evol.* 39: 208-218.
- Zhang X.-J., Ge L.-H., Liu J., Yang, X.-L. (2008): Functional expression of the glycine transporter 1 on bullfrog retinal cones. *Neuroreport* 19: 1667-1671.
- Zhang Y., Straznický C. (1991): The morphology and distribution of photoreceptors in the retina of *Bufo marinus*. *Anat Embryol.* 183: 97-104.
- Zhou Z.J., Lee S. (2008): Synaptic physiology of direction selectivity in the retina. *J. Physiol.* 586: 4371-4376.

- Zhu B., Straznicky C. (1990a): Morphology and distribution of serotonin-like immunoreactive amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. *Visual Neurosci.* 5: 371-378.
- Zhu B., Straznicky C. (1990b): Dendritic morphology and retinal distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive amacrine cells in *Bufo marinus*. *Anat. Embryol.* 181(4): 365-371.
- Zhu B., Hiscock J., Straznicky C. (1990): The changing distribution of neurons in the inner nuclear layer from metamorphosis to adult: a morphometric analysis of the anuran retina. *Anat. Embryol.* 181: 585-594.
- Zhu B., Straznicky C. (1991): Morphology and retinal distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive amacrine cells in the retina of developing *Xenopus laevis*. *Anat. Embryol.* 184(1): 33-45.
- Zhu B.S., Gábríel R., Straznicky C. (1992): Serotonin synthesis and accumulation by neurons of the anuran retina. *Visual Neurosci.* 9: 377–388.

10. Saját közlemények

10.1 A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

- 1) **Schäffer D.A.**, Gábrriel R. (2005): Two major tachykinins, Substance P and Substance K, are localized to distinct subsets of amacrine cells in the anuran retina. *Neurosci. Lett.* 386: 194-198.
- 2) **Schäffer D.A.**, Purger J.J. (2005): A barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) elterjedése Magyarországon. [angol összefoglalóval]. *Állattani Közl.* 90: 25-39.
- 3) **Schäffer D.A.**, Gábrriel R. (2007): GABA-immunoreactive photoreceptors in the retina of an anuran, *Pelobates fuscus*. *Neurosci. Lett.* 416: 202-205.

10.2 A disszertáció alapjául szolgáló konferencia részvételek

- 1) **Schäffer D.**, Purger J.J., Gábrriel R. (2003): A barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) magyarországi elterjedése az eddigi kutatások alapján. VI. Magyar Ökológus Kongresszus, Gödöllő. [abstract]
- 2) **Schäffer D.**, Dénes V., Gábrriel R., Purger J.J. (2003): Distribution of chemical markers in the retina of the spadefoot toad (*Pelobates fuscus fuscus*). A MITT IX. Konferenciája, Balatonfüred, *Clinical Neurosci.* 56(2): 77-78. [abstract]
- 3) Gábrriel R., **Schäffer D.**, Purger J.J., Wilhelm M. (2003): Neurochemical analysis of retinal cell types in *Pelobates fuscus*. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prága. [abstract]
- 4) **Schäffer D.**, Purger J.J. (2004): Kétéltű-szaporodóhelyek felmérése terelőkerítések és vödörcepadák alkalmazásával. II. Szünzoológiai Szimpózium, Budapest. [előadás]
- 5) Babai N., **Schäffer D.**, Gábrriel R. (2005): Photoreceptor distribution in retina of the spadefoot toad (*Pelobates fuscus*). A MITT XI. Konferenciája, Pécs, *Clinical Neurosci.* 58(S1): 9. [abstract]
- 6) **Schäffer D.**, Wilhelm M., Gábrriel R. (2005): Neuropeptide-Y like immunoreactive elements in the retina of the spadefoot toad (*Pelobates fuscus*). A MITT XI. Konferenciája, Pécs, *Clinical Neurosci.* 58(S1): 83. [abstract]
- 7) Gábrriel R., **Schäffer D.A.** (2006): GABA-immunoreactive photoreceptors in the retina of an anuran, *Pelobates fuscus*. FASEB Summer Research Conferences, Retinal Neurobiology and Visual Processing, Indian Wells, California. [abstract]
- 8) **Schäffer D.A.**, Pirkhoffer E., Horváth Gy., Purger J.J. (2006): Distribution of common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*) and soil types in Hungary. 1st European Congress of Conservation Biology, Eger. [abstract]

10.3 Egyéb tudományos közlemények

- 1) Horváth Gy., Hamburger K., **Schäffer D.** (2002): Újabb adatok a Dráva felső szakaszának kisemlős faunájához. *Nat. Somogy*. 3: 111-130.
- 2) Horváth Gy., Pogány Á., Hamburger K., **Schäffer D.** (2004): A védett csalitjáró pocok, *Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761) országos elterjedése az 1999-ig gyűjtött adatok alapján. [angol összefoglalóval]. *Természetvédelmi Közl.* 11: 607-611.
- 3) Horváth Gy., **Schäffer D.**, Molnár D., Pogány Á. (2006): Kisemlősök populációs és közösségi vizsgálata két ártéri erdőtípusban. *Nat. Somogy*. 9: 325-332.
- 4) Trócsányi B., **Schäffer D.A.**, Korsós Z. (2007): A Mecsek kétéltű- és hüllőfaunájának áttekintése, újabb faunisztikai adatokkal. [A review of the amphibian and reptile fauna of Mecsek Mountains, with new herpetofaunistic data (SW Hungary)]. *Acta Naturalia Pannonica* 2: 189–206.
- 5) Horváth Gy., **Schäffer D.**, Türmer K., Végh B., Voigt A., Pirkhoffer E., Bank L. (2009): Baranya megye kisvízkataszterének elkészítése és a kisvizek kategóriák szerinti kiértékelése. In: Temesi A. (Ed.): *Paeonia 2009; A Duna-Dráva Nemzeti Park Igazgatóság Értesítője*. pp. 147-163.

10.4 Egyéb konferencia részvételek

- 1) Horváth Gy., **Schäffer D.**, Hamburger K., Molnár D. (2001): A Dráva felső szakaszán végzett bagolyköpet elemzések kisemlős faunisztikai eredményei. II. Dráva Konferencia, Pécs. [abstract]
- 2) Horváth Gy., **Schäffer D.**, Hamburger K., Molnár D., Pogány Á. (2001): Kisemlősök populáció és közösségi vizsgálata két ártéri erdőtípusban. II. Dráva Konferencia, Pécs. [előadás]
- 3) Csete S., **Schäffer D.**, Horváth Gy. (2001): The impact of vegetation structure on the microhabitat preferences of three rodentia in patchy habitat. 44th IAVS Symposium, Vegetation and Ecosystem Function, Freising-Weihenstephan. [abstract]
- 4) Horváth Gy., Pogány Á., Hamburger K., **Schäffer D.** (2002): A védett csalitjáró pocok (*Microtus agrestis* Linnaeus, 1761) országos elterjedése és szünbiológiai vizsgálata a Kis-Balaton területén. I. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Sopron. [abstract]
- 5) **Schäffer D.A.**, Végh B., Voigt A., Türmer K., Horvai V., Purger J.J. (2006): A barna ásóbéka szaporodásbiológiai vizsgálata a Barcsi-borókás területén. VII. Magyar Ökológus Kongresszus, Budapest. [abstract]

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőm, Prof. Dr. Gábrriel Róbert egyetemi tanár szakmai irányítását és feltétlen támogatását, amivel végigkísérte tudományos munkámat. Az Ő kitartó bátorítása és türelme nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat.

Köszönettel tartozom Dr. Purger Jenő egyetemi docensnek, aki doktorandusz képzésem alatt végig segítette a barna ásóbéka populációbiológiájának megértését célzó terepi vizsgálataimat, és a faj magyarországi elterjedését leíró mű elkészítését.

Külön köszönöm Dr. Dénes Viktória egyetemi adjunktusnak, hogy hosszú éveken keresztül megosztotta velem az immunhisztokémia labort, és segített elsajátítani a legfontosabb metodikákat. Dr. Wilhelm Márta egyetemi docensnek, hogy ehhez támogatást nyújtott, és „titkos” receptfüzetét, valamint széleskörű tapasztalatait rendelkezésemre bocsátotta.

További köszönet Prof. Dr. Seress László egyetemi tanárnak és a Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium asszisztenseinek az elektronmikroszkóp, valamint Dr. Degrell Péter egyetemi adjunktusnak és a II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum asszisztenseinek a cryostat használatában nyújtott segítségükért.

Dr. Pollák Edit egyetemi docensnek, hogy beavatott az ultramikrotóm használatába és az elektronmikroszkópos vizsgálatra szánt anyagok feldolgozásába, és kritikai észrevételeivel mindvégig támogatta munkámat.

Köszönöm Prof. Dr. Lázár Gyula egyetemi tanárnak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta saját készítésű apparátusát és szakmai segítségét a nisztagmusvizsgálatok elvégzéséhez, és lehetővé tette a NeuroLucida és a Neuroexplorer programok használatát.

Prof. Dr. Szél Ágoston egyetemi tanárnak, hogy a COS-1 antitestet rendelkezésünkre bocsátotta.

Köszönet Prof. Dr. Csoknya Mária egyetemi tanárnak a PhD fokozatszerzési eljárással kapcsolatos ügyintézésben nyújtott pótolhatatlan és fáradhatatlan segítségéért, valamint azért, mert egy életre megtanította, hogy: „A jobb mindig jobb, mint a bal!”

Szeretném megköszönni Dr. Szabadfi Krisztina tudományos segédmunkatársnak, hogy a dolgozatírás hajrájában praktikus tanácsokkal segítette munkámat, amivel sok időt és energiát takarított meg nekem.

Külön szeretném megköszönni Horvai Valér, Soós Nándor, Türmer Katalin, Voigt Anikó és Végh Brigitta hallgatóim kitartó munkáját, akik az időjárási viszontagságok ellenére rendszeresen vállalták a terepi vizsgálatok megpróbáltatásait, ezzel jelentősen hozzájárulva a Barcsi-borókás kétéltűfaunájának, ezen belül is a barna ásóbékának a pontosabb megismeréséhez.

Kiemelt köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Horváth Győző egyetemi adjunktusnak. A vezetésével működő diákköri műhelymunka keretein belül ismerkedtem meg a tudományos élettel, és az itt gyűjtött tapasztalatok, élmények hatására indultam el ezen az úton. Külön öröm számomra, hogy közben egy baráttal is gazdagabb lettem.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Édesanyámnak, hogy áldozatvállalásával lehetővé tette számomra az egyetem elvégzését és a PhD képzésben való részvételt, valamint Feleségemnek, Eszternek és a családom többi tagjának, hogy mindvégig megtettek mindent annak érdekében, hogy ez a dolgozat megszülethessen.