

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola
Összehasonlító Neurobiológia Program

Életmód vagy rokonság: a barna ásóbéka retinájának morfofunkcionális értékelése

PhD értekezés tézisei

SCHÄFFER DÁVID ANTAL

Témavezető:
Prof. Dr. Gábrriel Róbert
tanszékvezető egyetemi tanár

PÉCS, 2012

1. Bevezetés

A kétéltűek osztályának három rendjébe (farkos-, farkatlan- és lábatlan kétéltűek) világszerte több, mint 6700 faj tartozik. Az IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) legutóbbi felmérése szerint ezen fajoknak körülbelül 30%-a veszélyeztetett. 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, hazánkban e sajnálatos tényről néhány közlemény rögzíti. A vizsgálataink alanyául választott barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) 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. Fentiek miatt szakirodalomból, közgyűjteményekből és kutatóktól származó adatok alapján elkészítettük a barna ásóbéka magyarországi elterjedésének térképét. 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 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 szemek nagyméretűek, a pupillák függőleges állásúak. Eddigi ismereteink alapján a *P. fuscus* aktivitása a naplementét követő órákban kezdődik, és körülbelül az éjfélét követő néhány óráig tart, így az állat a nap nagy részét a talajba ásva tölti el, éjszaka aktív. A cirkadian aktivitást kísérleti körülmények között mi is igazoltuk. 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 táplálék szájüregbe juttatásában sok esetben a mellső végtagok is segítenek. A fenti leírás alapján arra számítottunk, hogy a *P. fuscus* viselkedésmintázata a látórendszer – és ezen belül is a retina- szerveződésében visszatükröződik. 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.

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. A csapok minimálisan két típusa szinte minden eddig részleteiben vizsgált béka retinában fellelhető, még azokban a fajokban is, ahol a színlátás szerepe minimális. A bipoláris sejteknek mintegy 10 féle variációja ismert gerincesekben és ez a megállapítás a békákra is igaz. 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. A

retinában a fő információ-továbbító útvonal a fotoreceptor \Rightarrow bipoláris sejt \Rightarrow dúcsejt útvonal. E láncban csaknem valamennyi sejt transzmittere a glutamát. 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 előrcsatolnak a bipoláris illetve ganglionsejtek dendritjeire. A horizontális és amakrin sejtek működése hozza létre a központ-környéki organizáció rendszerét.

A kétéltűeknek nincs agykérge, 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. A látórostok az említett struktúrák felszínéhez közel elhelyezkedő neuropil régióban végződnek. 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 retinális ganglion sejtek axonjainak projekcióját a látóközpontokba anterográdf vizsgálatokkal végezték. Ezen területekre mindkét szemből érkeznek optikus rostok, azonban az ipszilaterális projekciók száma lényegesen kisebb (kb. 4%) a kontralaterális retinából érkezőknél. A látórendszer legfontosabb feladatai közé tartozik a préda felsimerése és elfogásának koordinálása, valamint a predátorok felismerése és a menekülési folyamatok inicializálása.

2. Célkitűzések

Hipotézisünk szerint a speciális életkörülmények és a környezethez való alkalmazkodás tükröződnek a *Pelobates* retina szerveződési és élettani sajátágaiban, ezért a többi fajtól jelentősen eltérő retinaszerkezet feltárását vártuk vizsgálatainktól. A retinavizsgálatok során két kiemelt sejt típusra, a fotoreceptor sejtekre és a retinán belüli legdiverzebb sejt félésegre, 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

Vizsgálatainkban kifejlett ásóbékákat (*Pelobates fuscus*) használtunk fel. Az állatokat 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 a szemeket kipreparáltuk és szemserleg preparátumokat készítettünk. A GABA kimutatását célzó vizsgálatok némelyikében ezeket 1 mM-os GABA oldatban inkubáltuk 30 percig.

Az általános retinaszerkezet tanulmányozásához a szemserleg preparátumokat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk egy éjszakán keresztül, 4°C-on. Felszálló alkoholsorban történő dehidráció után a szövetdarabokat Durcupan ACM oldatba ágyasztuk be, és 2 µm vastag félvékony metszeteket készítettünk, melyeket 1%-os toluidinkék oldattal festettünk meg. 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. 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.

A szemserleg és wholemount 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. Ezeket 0,3 %-os tritonos PBS-el kezeltük, majd 30 percig antitest hígítóval (ABS) előinkubáltuk, majd primer antitestekkel inkubáltuk a szöveteket. Ezután 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 (wholemount) készítettünk. Ezeken az anyagokon GABA, COS-1 és Neuropeptid Y (NPY) immunjelöléseket hajtottunk végre, az avidin-biotin módszer alkalmazásával. A wholemountokat glicerinben fedtük és tároltuk, míg néhány kisebb darabot gyantába ágyasztunk és azokból 2 µm-es metszeteket készítettünk, amiket Permound-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. Neurolucida 3.23 (MicroBrightField, Inc.) program segítségével rekonstruáltuk az

összes NPY pozitív sejt térbeli elhelyezkedését egy wholemount preparátumon. A sejtek eloszlási mintázatának meghatározásához a Neuroexplorer 3.03a programmal számoltuk ki a sejtek közötti átlagos legközelebbi szomszéd (nearest neighbour) távolságot.

4. Eredmények

A *Pelobates 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. A retina szövettani rétegei jól megfigyelhetők, vastagságuk egymáshoz viszonyított aránya szintén hasonlít a többi, fent említett békafajéhoz.

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. A toluidinkékkel festett félvékony metszetek alapján kétféle pálcika (minor és major) és egyféle csap különíthető el. 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. 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 fotoreceptorok 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. Azért, hogy pontos képet kapjunk a csapok retinális eloszlásáról COS-1 antitesttel kezelt teljes retina preparátumokat is készítettünk. Amikor a *Pelobates* retina GABA-immunreaktivitást mutató elemeit vizsgáltuk felfedeztük, hogy a más kétélű fajoknál szokásos GABA-eloszlási mintázat mellett, egyes struktúrák a fotoreceptorok rétegében (ONL) is rendszeresen jelölődnek GABA-val. A fotoreceptor rétegben jelölődött sejttestek átmérője 5-6 μm volt, a külső szegmensekre a jelölés nem terjedt ki. A GABA-pozitív csapok számát összevetve a toluidinkékkel festett és a fluoreszcens mintákkal úgy tűnik, hogy minden csap GABA-pozitív. A henger alakú külső szegmensevel rendelkező pálcikák egyike sem bizonyult GABA-immunreaktívnak. A fotoreceptorok ultrastruktúráját megvizsgálva megállapítottuk, hogy a csapok egyértelműen azonosíthatóak, de eltérnek a *Xenopus* csapoktól abban, hogy nincs bennük olajcsepp, hanem annak helyén egy szemcsés, elektrondenz mátrix figyelhető meg. A pálcikák elektronmikroszkópos 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. Ezek a sejtek mindig a fotoreceptorok legkülső sejt sorában foglaltak helyet. Ultravékony metszetekben egész metszetszélüket áttekintve arányuk alacsony volt, a pálcikákon belül 1-3% között ingadozott.

A fentebb leírt fotoreceptor-jelölés mellett a belső sejtes rétegben horizontális, amakrin és bipoláris sejtek is jelölődtek GABA-ellenes antitestekkel. 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.

Sok sejt jelölődött a *P. fuscus* retinában a calretinin elleni antitestekkel. 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. 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 a réteghatártól kifelé volt, és egy erőteljes nyúlványt bocsátott ki a belső rostos réteg felé, ami sokszor már az első alrétegben elágazik.

A tirozin-hidroxiláz a békákban is a dopaminerg sejtek kimutatására alkalmas markermolekula. A *P. fuscus* retinában is sikerült kimutatnunk ezeket a sejteket a belső sejtes rétegben és nyúlványaikat a belső rostos réteg első alrétegében. Az immuncitokémiai vizsgálatok alapján a kimutatott sejtek egységes dendritmorfológiával rendelkeztek.

Nagyméretű (12-15 μm) szerotonin-tartalmú sejteket találtunk a belső sejtes rétegben, melyek nyúlványai a belső rostos réteg teljes szélességében ágaztak szét. A legkiterjedtebb ágrendszert a második és harmadik alrétegben figyelhettük meg.

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.

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, míg a másik sejttestje az IPL-től távolabb volt található és nyúlványait főleg az 1. és 2. alrétegbe küldte. 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. Néhány gyengén immunreaktív Müller-sejtet is megfigyelhettünk, de ezt a jelölést preabszorpciós kísérletekkel sem sikerült eltüntetni, ezért specifikusnak tekintettük. Az immunfluoreszcens vizsgálatokban megfigyelt kétféle amakrin sejtet és a centrifugális rostokat a wholemount preparátumokban is sikerült azonosítani. Az amakrin sejtek törzsdendritjei kb. 200 μm távolságot fednek le. A varikózus centrifugális rostok igen hosszan húzóva behálózják a retina egész területét. A neuropeptid Y-pozitív amakrin sejtek térbeli eloszlását is vizsgáltuk egy wholemount preparátumon. Ebben a vizsgálatban a sejteket egy populációként értékeltük. A 43,9 mm^2 területű preparátumon 964

db NPY-pozitív amakrin sejtet találtunk, így ezen sejtek denzitása a retinán $22/\text{mm}^2$. A nearest neighbour analízis azt mutatta, hogy a sejtmozaik reguláris ($R_n=1,59$), a sejtek egymástól közel azonos távolságra, egyenletesen helyezkednek el az egész retinán.

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. Az összes eddig vizsgált béka fajhoz hasonlóan a barna ásóbékában is megfigyelhető a tirozin-hidroxiláz és a neuropeptid Y immunreaktív elemek hasonló eloszlási mintázata. Kettősen jelölt struktúrát - más laboratóriumok eredményeihez hasonlóan - mi sem mutattunk ki vizsgálataink során. Eredményeink ugyanakkor azt mutatták, hogy az amakrin sejtek egy csoportjában Substance P immunreaktivitás figyelhető meg a *Pelobates* retinában, és a Substance K-t is sikerült azonosítani a széles dendritmezejű amakrin sejtek egy ritka populációjában. A sejtek az INL legbelső sejtrétegében foglalnak helyet, míg a Substance K immunpozitív dendritek a SL1-ben és a SL4/5 határán találhatóak, amelynek következtében részben átfednek a Substance P immunpozitív dendritek területével. Substance K immunpozitivitást mutató displaced amakrin sejteket nem találtunk. A kettős jelöléses 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.

5. Diszkusszió

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy 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. A fotoreceptorok morfológiájában és eloszlásában is sikerült azonban néhány különbséget megfigyelnünk a *Bufo*, *Rana* és *Xenopus* nemzetségeknél leírtakhoz képest.

Az eddigi vizsgálatok a pálcikáknak két különböző (minor és major) csoportját igazolták a *Bufo marinus*, a *Rana pipiens* és a *Xenopus laevis* békafajok esetében. A barna ásóbékában a fentieken túl még egy, a major pálcikákhoz morfológiailag nagyon hasonló pálcikát találtunk, amely csak a magszerkezetében tért el a pálcikákra jellemző általános tulajdonságoktól. 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 csapok denzitását figyelve a retina különböző területein elmondható, hogy eloszlásuk nem egyenletes, a mért értékek jóval kisebbek a már vizsgált béka fajoknál leírt értékeknél. Emlős és hüllő fajokon, majd *Bufo marinus*-on 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 naso-temporalis meridiánja mentén mérték, és a neuronok

hasonló topográfiai eloszlását figyelték meg a külső- és belső magvas rétegekben is. 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 tudtunk 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, míg *Xenopus laevis* esetében közel van az 1:1-es arányhoz. 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. A GABA bizonyítottan a fő gátló transzmitter mind a külső, mind a belső retinában, amely területeken mindhárom ismert GABA receptor típuson (A, B, C) keresztül kifejti hatását. 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. A GABA a horizontális sejteken kiválthat depolarizációt, valamint ezen kívül hathat magukra a csapokra is autoreceptorokon keresztül, mivel mindhárom GABA receptor típust kimutatták már különböző fajok csapjain.

Más laboratóriumok által korábban vizsgált békafajok retinája és a *Pelobates* retina neurokémiai markereinek eloszlása között csak kismértékű eltérést figyeltünk meg.

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

Korábban kétéltűeken végzett vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményeket közöltek a kalciumkötő-fehérjék eloszlásáról a retinális neuronokban, mely ellentmondások valószínűleg a különböző típusú alkalmazott antitesteknek köszönhetőek. Barna ásóbéka esetében a calbindin 28 kDa jelenlétét nem tudtuk kimutatni, amit pedig korábbi vizsgálatok már farkatlan kétéltűek és békák csapjaiban is igazoltak. Esetünkben a fotoreceptorok rétegében és a belső retinális rétegekben kapott jelölés alapján elképzelhető, hogy a barna ásóbékában a calretinin 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* fajoknál leírtakhoz hasonlóan nekünk sem sikerült igazolni a barna ásóbéka retinájában, míg calretinin-immunreaktív amakrin sejtek csak ritkán fordultak elő. Ezen sejteknek morfológiailag két típusát sikerült azonosítani a *Pelobates* retinában. A

ganglionsejtek rétegében számos calretinin pozitív sejtet találtak kétéltűeknél. 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.

A dopaminerg amakrin sejtek általánosak minden gerinces retinában, és denzitásuk minden esetben alacsony értéket mutat. A tirozin-hidroxiláz a dopaminerg sejtek markere a kétéltű retinában. A *Bufo* és *Xenopus* fajok esetében a dopaminerg neuronok egységes dendrit morfológiával rendelkeznek, míg *Rana*-ban két altípust (vékony és vastag sejtek) különböztettek meg. Számuk az összes amakrin sejtnek kb. 0,5%-a. Egyes dopaminerg sejtek a külső plexiform réteg felé küldenek rostokat. Dendritjeik az 1-es és 5-ös szublaminában ágaznak szét. A kísérleteink során barna ásóbékában kimutatott TH-pozitív sejtek rostjaikat az IPL 1-es szublaminájába juttatták, és számuk alacsony volt. Az OPL felé irányuló nyúlványokat nem tudtunk megfigyelni, ami kissé eltér a más békákra jellemző mintázattól, ahol az OPL felé menő rostok alacsony számban bár, de megtalálhatók voltak.

A legtöbb szerotonin immunreaktív sejt amakrin sejtnek bizonyult az eddig vizsgált kétéltűek retinájában, azonban *Xenopus laevis*-ben bipoláris sejteket, *Rana pipiens*-ben pedig ganglion sejteket is igazoltak. A szerotonin tartalmú amakrin sejteket két csoportba sorolták morfológiájuk alapján. Az egyik csoportba nagy sejttesttel rendelkező, széles dendritmezejű neuronok tartoznak, amelyek főleg az 1. és 2. szublaminába juttatnak rostokat. A másik csoportba kis sejttesttel rendelkező, diffúz dendriteloszlású, kis dendritmezejű sejteket találtak. *Pelobates*-ben a szerotonin tartalmú sejtek morfológiailag nem mutatnak eltérést, valamennyien nagy átmérőjű, szerotonin szintetizáló sejteknek tűnnek. Ennek igazolására azonban további kísérletek lesznek szükségesek.

A SP-immunpozitív sejtek a béka retinára általánosan jellemző sejtfeleségek, 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, ez a sejtpopuláció azonban a GABA immunreaktivitása alapján heterogénnek mutatkozott. Lehetséges, hogy a békafajok közül legalább a szárazföldi békafajok retinája két SP-immunpozitív sejtípust tartalmaz, melyek egyikének transzmittere a GABA lehet. A SP/SK kettősjelölésű vizsgálatok eredményei alapján a SP- és SK-immunreaktivitás világosan elkülönülő sejtpopulációkban lokalizálódik a *Pelobates* esetében, ami egy újfajta, neurokémiaiilag meghatározható sejt típus felfedezését jelentheti. Mivel az általánosan ismert, hogy a legtöbb peptid tartalmú amakrin sejt más transzmitter(ek)e)t is tartalmaz, feltételezzük, hogy az 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 sejtnek bármelyikével azonos lenne. 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. Vizsgálataink bizonyítékot szolgáltatottak 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 kétélűekben található tachykininek bioszintézisének részletei továbbra sem ismertek. 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. Ugyanez a tanulmány kromatográfias 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.

Munkánk kétféle, széles dendritmezőjű NPY-pozitív amakrin sejt jelenlétét erősítette meg. A *Bufo marinus*-nál tapasztaltakhoz hasonlóan ezen sejtek térbeli eloszlása a barna ásóbéka retinájában is egyenletes, denzitásuk azonban a fenti fajnál megfigyeltnél alacsonyabb ($22/\text{mm}^2$) értéket mutat. A legfeltűnőbb eredmény az NPY-immunpozitív rostok megjelenése a belső rostos réteg 1-es szublamínájában. Kétélűeken alkalmazott immuncitokémiai módszerekkel korábban már kimutattak FMRFamid- és Substance P-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. Annak igazolására további vizsgálatok szükségesek, hogy az NPY-immunpozitív rostoknak lehet-e hasonló szerepe a barna ásóbéka retinájában.

A korábbi, békákon végzett vizsgálatokhoz hasonlóan 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.

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 sejtípusok 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. Saját közlemények

7.1 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.

7.2 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]

7.3 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 csaltjáromocok, *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.

7.4 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 csaltjáromocok (*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]