

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A retinális dúcsejtek fényválaszának időbeli sajátosságait  
befolyásoló tényezők vizsgálata: tranziencia és oszcillációs  
aktivitás az emlős retinában**

PhD értekezés

**Ganczer Alma**

Pécs 2021

# **PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

## **A retinális dúcsejtek fényválaszának időbeli sajátosságait befolyásoló tényezők vizsgálata: tranziencia és oszcillációs aktivitás az emlős retinában**

PhD értekezés

**Ganczer Alma**

Témavezető:

**Dr. Völgyi Béla**

habilitált egyetemi docens

.....  
Dr. Völgyi Béla

habilitált egyetemi docens,

témavezető

.....  
Dr. Gábrriel Róbert

habilitált egyetemi tanár,

PTE-BDI vezető

# Tartalomjegyzék

## 1. Bevezető

1.1 Az emlős retina.....	5.
1.2 Az emlős retina rétegei, sejttípusai .....	6.
1.3 Az emberi retina és a házi egér retinájának összehasonlítása .....	12.
1.4 Dúcsejtek az egér retinában.....	15.
1.5 Szinaptikus transzmisszió a retinában.....	18.
1.6 Retinális útvonalak .....	23.
1.7 A dúcsejtek fényválaszának kinetikája.....	25.
1.8 Idegsejtek oszcillációs aktivitása .....	27.

## 2. Célkitűzések .....

**29.**

## 3. Anyagok és módszerek

3.1 A házi egér, mint kísérleti modell .....	31.
3.2 A retinapreparátum készítése .....	31.
3.3 Elektromos elvezetések .....	32.
3.4 Kísérleti összeállítás .....	33.
3.5 Adatelemzés .....	35.
3.6 Statisztikai elemzések kivitelezése.....	37.
3.7 Ábrák és grafikonok készítése.....	37.

## 4. Eredmények

4.1 A tranziencia mérése különböző módszerekkel .....	38.
4.2 A tranzienciát mérő módszerek szórásának összehasonlítása.....	41.
4.3 PSTH $\tau$ összehasonlítása az időkonstanssal .....	44.
4.4 Tranziens és fenntartott válaszok kategorizálása .....	46.
4.5 Variabilitás a retinális dúcsejtek ON és OFF kinetikájában .....	47.
4.6 A tranziencia alakulása szkotopikus körülmények között .....	49.
4.7 Tranziencia és laterális szignalizáció .....	51.
4.8 Párhuzamos pályák egymásra hatása .....	56.
4.9 Retinális dúcsejtek oszcillációs aktivitása.....	59.

## **5. Eredmények megbeszélése**

5.1 A megfelelő számítási mód kérdése .....	65.
5.2 A tranziencia eloszlási skálája.....	67.
5.3 A külső és belső retina szinaptikus kapcsolatainak szerepe.....	69.
5.4 A tranziencia eredete az emlős retinában .....	72.
5.5 Kitekintés a dúcsejtek szinkronizált oszcillációs aktivitása felé .....	75.

## **6. Összefoglaló**

6.1 Összefoglaló .....	78.
6.2 Summary .....	79.

## **7. Köszönetnyilvánítás .....**

**80.**

## **8. Irodalomjegyzék .....**

**81.**

## **9. Publikációs Lista .....**

**87.**

## **10. Függelékek**

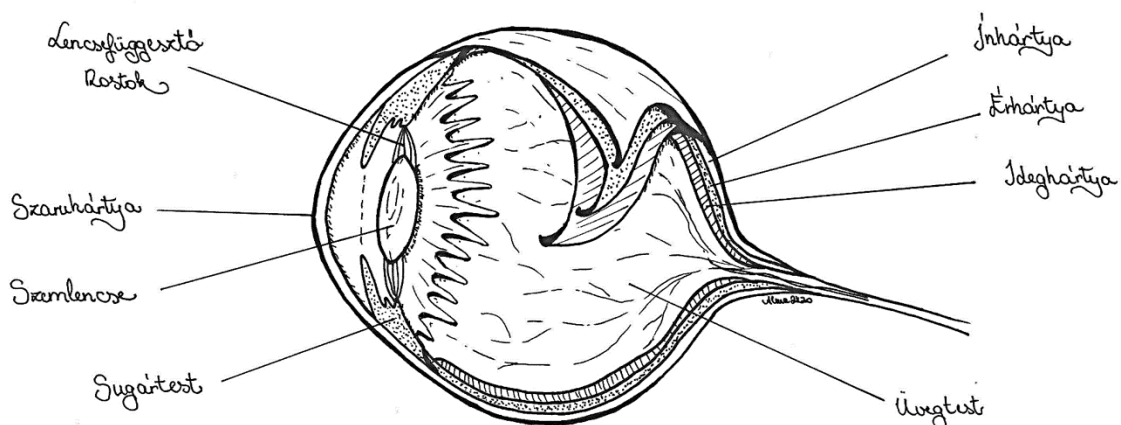
10.1 Az elvégzett statisztikai próbák jegyzéke .....	90.
--	-----

# 1. Bevezető

## 1.1 Az emlős retina

Bátran kijelenthetjük, hogy a hagyományos öt érzékszerv közül egy átlagember a látására támaszkodik leginkább a mindennapokban. A külvilágból érkező információ több, mint 80%-át nyerjük a vizuális környezetből (Ripley és Politzer 2010), ezért a természet- és orvostudományok fejlődésével kiemelt fontosságúvá válik számunkra a látórendszer működésének megismerése és mindazon folyamatok megértése, melyeknek köszönhetően az emberi agy képes a minket körülvevő világot látásunk segítségével leképezni. A feladat nem egyszerű: az emlős látórendszer az érzékszervekkel történő érzékelés egyik kifejezetten összetett, az alkalmazkodás lehetőségeit tekintve igencsak nagy változatosságot mutató példája, mely mind felépítését tekintve, mind pedig működésében két nagyobb (perifériás és centrális) egységre bontható fel.

A retina (recehártya) a gerincesek szemének legbelső, az üvegtesttel szomszédos rétegében elhelyezkedő, körülbelül 200 $\mu$ m vastagságú fényérzékeny idegszövet (1. ábrán szemléltetve). Felépítése szöveti szinten jellegzetes anatómiai tagolódást mutat; az emlős retinát alkotó különböző sejtcsoportok funkciójukat tekintve szerveződnek rétegekbe. A retina elsődleges feladata a környezetből érkező fény elektromos jellé alakítása és továbbítása az agy látóközpontja felé: a feldolgozott információ a látóidegen (*nervus opticus*) keresztül távozik, mely mindent összevetve a retina elektromos kimeneteként is szolgál.



**1. Ábra:** az emberi szem vázlatos, szemléltető rajza, mely az emlősök szemének általános felépítését **modellezi**. A retina, fejlődéstani eredetének köszönhetően, az ideghártya rétegét képezve védetten helyezkedik el az ínhártya (sclera) és az érhártya (choroidea) rétegei alatt.

Fontos megjegyezni, hogy a retina nem csak a fény elektromos jellé alakítását végző optoelektronikai transzducerként működik; a vizuális jel detektálását követően azonnal megkezdődik az információ elsődleges feldolgozása és tartalom szerinti különválogatása. Bár hajlamosak lehetünk azt feltételezni, hogy a látóközpont „egy az egyben” képezi le a rá zúdított információhalmazból a külvilágot, a valóság ettől jelentősen eltér. A látótér különböző elemeit (mint például az általunk érzékelt formák és színek, vagy ezek mozgása) leképező csatornák tulajdonképpen egymással párhuzamosan futnak, így a felsőbb agyi központok felé továbbított információ már rögtön a retina szintjén bizonyos mértékű elő-szelekción halad át. A valóságban ez mindössze annyit jelent, hogy az általunk látott és teljes egészésként érzékelt „kép” számtalan apró részletre bontható, azaz képesek vagyunk külön-külön érzékelnéi luminozitást, kontrasztot, szíkontrasztot, mozgást, a közeledő vagy oldalirányú mozgás pontos irányát, alakok és formák orientációját, illetve meg tudunk egy objektumot a háttértől különböztetni és detektálni tudjuk egy objektum mozgásától függetlenül a háttér mozgását is. Mindezen képi aspektusok már a periférián szeparálódnak egymástól és egymással párhuzamosan, precízen különválogatva kerülnek továbbításra. Ez természetesen nagymértékű szervezettséget igényel, ami nem csak a retinát felépítő sejttípusok lokalizációjában, hanem azok számában és kapcsolatrendszerében is megmutatkozik: a retina egy rétegelt, jól szervezett, ám annál bonyolultabb hálózatként működik számos beépített szabályozási mechanizmussal.

## **1.2 Az emlős retina rétegei, sejttípusai**

Az emlős retinában hat jellegzetes funkcionális szövettani réteget különböztetünk meg a tankönyvekben szereplő anatómiai felosztási séma neuronális elemek alkotta rétegeivel megegyezően. Ezek a külső rétegek felől befelé haladva a következők:

1. Fotoreceptorok külső szegmense
2. Külső sejtes réteg (ONL – outer nuclear layer): fotoreceptor sejttestek építik fel
3. Külső rostos réteg (OPL – outer plexiform layer): a fotoreceptor – bipoláris sejt és horizontális sejt szinapszisok rétege
4. Belső sejtes réteg (INL – inner nuclear layer): bipoláris, horizontális és amakrin sejttesteket tartalmaz
5. Belső rostos réteg (IPL – inner plexiform layer): a bipoláris sejt – dúcsejt szinapszisok mellett ide nyúlnak a dúcsejtek dendritjei és az amakrin sejtek nyúlványai
6. Dúcsejtek rétege (GCL – ganglion cell layer): itt találhatóak a dúcsejtek szómái, illetve ebben a rétegben találjuk az ún. „displaced” amakrin sejteket

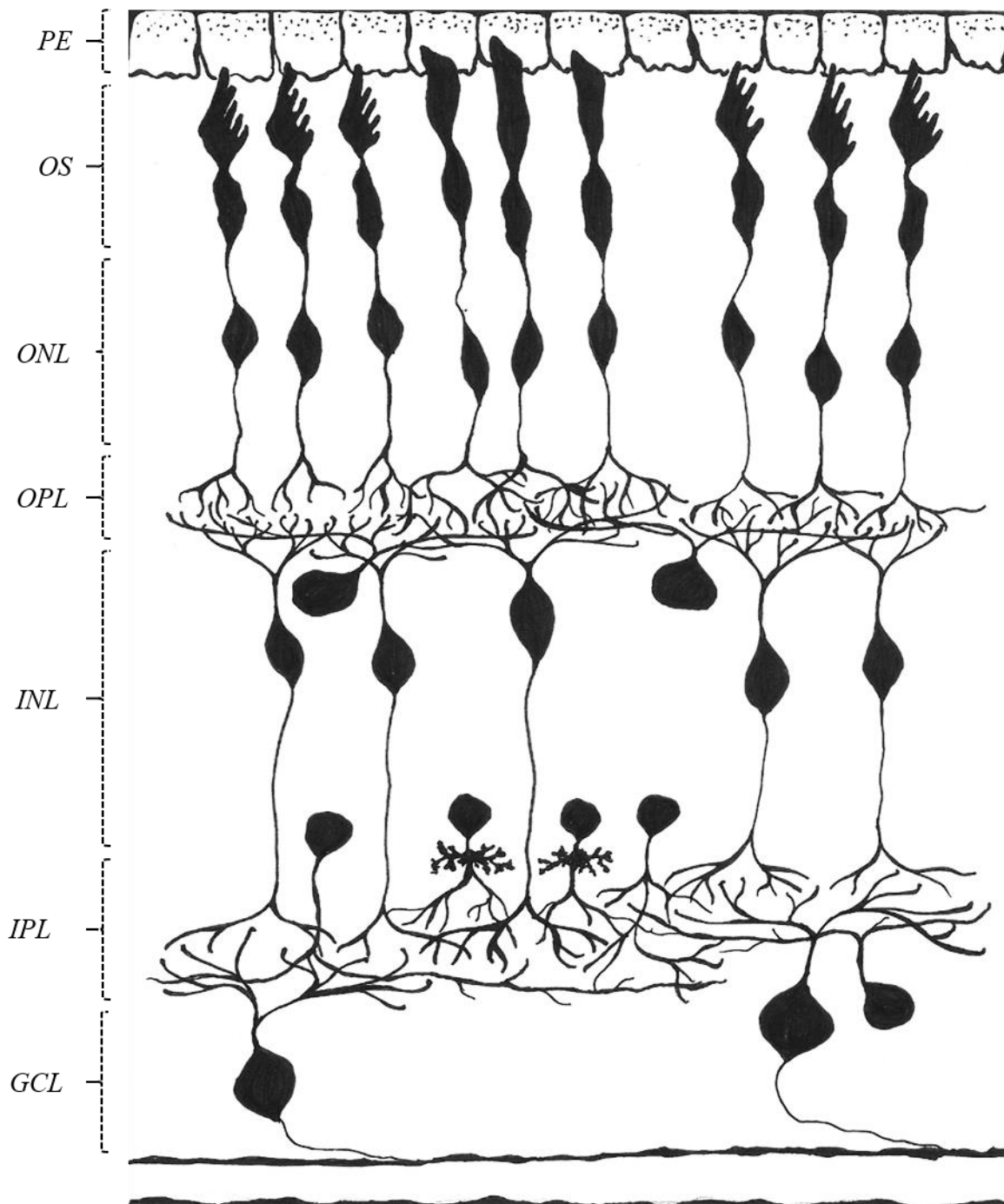
Ha a retinát körülvevő közvetlen szöveti környezetet is figyelembe vesszük, a listát tovább bővíthetjük egyrészt a fotoreceptorok rétegén kívül elhelyezkedő pigmenthám rétegével, mely a retinát külső környezetétől elhatárolja és fontos szereplője a receptorokban végbemenő fototranszdukciós folyamatnak, illetve említést tehetünk még a horizontális irányban húzódó külső és belső határoló membránok jelenlétéről. Ez utóbbi két réteget a retina Müller glia sejtjeinek külső és belső végtalpai alkotják. Mindezeket figyelembe véve a retina 10 rétegre tagolt strukturális felosztása is elfogadott és ismert, mely esetben az üvegtesttől legtávolabb elhelyezkedő réteget elsőként tekintve a következő felosztást állíthatjuk fel:

1. Pigmenthám (RPE – retinal pigment epithel; egyrétegű köbhám)
2. Fotoreceptorok külső szegmense
3. Külső határoló membrán (ELM – external limiting membrane)
4. Külső sejtes réteg
5. Külső rostos réteg
6. Belső sejtes réteg
7. Belső rostos réteg
8. Dúcsejtek rétege
9. A látóideg rostjainak rétege (*stratum opticum*)
10. Belső határoló membrán (ILM – internal limiting membrane)

Érdemes azonban megemlékezni a retina gliasejtjeiről is, melyek nélkülözhetetlenek a retina egészséges működéséhez (Reichenbach és Bringman 2020):

1. Müller sejtek: a retinális glia populáció közel 90%-a tartozik ide; részt vesznek a vér-retina gát kialakításában és a retina normál struktúrájának fenntartásában, fagocitálják a fotoreceptorok előregedett részeit, támogatják az idegsejtek fejlődését és az extracelluláris folyadék ionegyensúlyának szabályozásával megteremtik a retina sejtjeinek túléléséhez szükséges ideális környezetet (Goldman 2014).
2. Asztrociták: a retina legbelső rétegeiben helyezkednek el (Vecino és mtsai 2016.), a Müller gliához hasonlóan részt vesznek a retina homeosztázisának fenntartásában
3. Mikroglia: az immun privilégiumot élvező retina rezidens makrofágjai, a rostos rétegekben helyezkednek el (Karlstetter és mtsai. 2015).

Az emlős retina fent leírt hat réteges felépítését a 2. ábra mutatja be a főbb idegsejtosztályok és a pigmenthám hozzávetőleges elhelyezkedését felrajzolva, míg a retinát felépítő sejteket általános jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.



**2. ábra: Az emlős retina szövettani rétegeit és az azokat felépítő idegsejt-típusok elhelyezkedését bemutató szemléltető ábra.** Bár eredetét tekintve a fotoreceptorok felett elhelyezkedő pigmenthám (PE) nem része a retina idegszövetének, a legtöbb ábrán mégis feltüntetésre kerül, mint anatómiai és immunológiai barrier, illetve a retina normál működéseinek aktív közreműködője. A fotoreceptorok külső szegmensei (OS) alatt helyezkedik el a külső sejtes réteg (ONL) a receptorok sejttesteit tartalmazva, melyet a külső rostos (OPL), belső sejtes (INL) és belső rostos rétegek (IPL) követnek. A dúcsejtek rétegéből (GCL) kilépve a látóideg rostjai egy saját réteget (stratum opticum) létrehozva hagyják el a retina területét.



Sejt		Általános funkció	Főbb típusai*	Specializált feladat
Fotoreceptor sejt	Neuron	Fototranszdukció	Pálcikák	Perifériás látás, látás éjszakai fényviszonyok között
			Csapok	Színlátás, látás nappali fényviszonyok között
Horizontális sejt	Neuron	Kontraszt kiemelés, fényadaptáció		
Bipoláris sejt	Neuron		ON	Fény hatására depolarizáció
			OFF	Fény hatására hiperpolarizáció
Amakrin sejt**	Neuron	Gátló interneuronok	Narrow field	Függőleges irányú kommunikáció a különböző rétegek között
			Wide field	Rétegen belüli kommunikáció
			GABA-erg	Típusfüggő; a dopaminerg sejtek pl. a cirkadián ritmus beállításában vesznek részt
			Glicinerg	Típusfüggő; az AII amakrin sejtek pl. a pálcika bipolárisokat kapcsolják a csap útvonalba
			Egyéb	
Retinális dúcsejt***	Neuron	Információ továbbítása a látóideg felé		
Pigmenthám sejtek	<i>Epitél sejt</i>	Fényabszorpció, vér-retinát kialakítása, immunprivilegium biztosítása, egészséges fotoreceptor működés biztosítása		
Müller sejtek	<i>Glia</i>	Belső és külső határoló membrán kialakítása, homeosztatikus funkciók, a retina normál metabolizmusának és struktúrájának fenntartása		
Asztrocita	<i>Glia</i>	Homeosztatikus funkciók, vaszkularizáció		
Mikroglia	<i>Glia</i>	Rezidens immunsejt		

**1. Táblázat: a retinát felépítő sejtek felsorolása és rövid bemutatása.** Masland (2012), illetve Reichenbach és Bringmann (2020) munkája alapján. \*A retina sejtjei számos morfológiai és/vagy funkcionális típusal és altípussal rendelkeznek, a felsorolás ezért csak tájékoztató jellegű. \*\*Rendkívül heterogén csoportként jelen táblázatban csak a legnagyobb kategóriák bemutatása lehetséges. \*\*\*A retinális dúcsejtekkel az 1.3 és 1.4 alfejezetek foglalkoznak bővebben.

A külvilágból származó fény érzékelésében a fotoreceptorok játsszák az elsődleges szerepet. Az elnyelt fotonok energiája képes a sejtben zajló molekuláris folyamatokat befolyásolni és ezáltal a sejt által termelt kémiai hírvivők, ún. transzmitterek felszabadulását szabályozni, melyek a kémiai szinapszis működési elve szerint megváltoztatják a soron következő partner, a bipoláris sejt molekuláris sejt szintű működését (Peichl 2005). Az emberi szem számára látható fény az elektromágneses sugárzások megközelítőleg 400-700 nm hullámhosszú tartományát fedi le, így talán nem meglepő, hogy az emlős fotoreceptorok egyes típusai némi változatosságot mutatnak annak tekintetében, hogy mely hullámhossztartományban és milyen fényintenzitás mellett képesek a legtöbb fényt elnyelni (Ahnelt és Kolb 2000). A fotoreceptorok általános felépítésüket tekintve külső és belső szegmensre, illetve az ONL-ben elhelyezkedő sejttestre és az OPL-be nyúló szinaptikus végződésre tagolhatóak. A fotoreceptorok jellemzésekor talán érdemes a felsorolást a pálcikákkal kezdeni, melyek arra specializálódtak, hogy alacsony fényintenzitás mellett is biztosítsák a látórendszer működését. Elnevezésüket karcsú, hosszúkás alakjuknak köszönhetik, mely könnyen megkülönböztethetővé teszi őket a zömökebb, színérzékelésre képes csapoktól. Sötétadaptált retina esetén akár már egyetlen foton energiája is elegendő lehet ahhoz, hogy a pálcikákat ingerületbe hozza (Hecht és mtsai. 1942; Baylor és mtsai. 1979), így az éjszakai látásban és gyér fényviszonyok mellett csak a pálcikák közvetítésével terjedhet tovább a vizuális információ. A rendkívüli érzékenység ugyanakkor lényegesen lassabb válaszkészséggel párosul (MacLeod 1972). Bár színinformációt nem továbbítanak, fényelnyelési érzékenységük csúcspontja bizonyítottan a zöld hullámhossztartományba tehető (492 nm).

A pálcikákkal szemben a csapok szintjén már bizonyos mértékű munkamegosztást figyelhetünk meg a különböző fényelnyelési maximummal rendelkező típusok között. Az egyes típusok számától függően beszélhetünk mono-, di- és trikromatikus látásról, utóbbi azonban az emlősök osztályán belül csak a főemlősök és az ember látórendszerére jellemző. A legtöbb emlős (köztük a dolgozatban tárgyalt tudományos munka kísérleti objektumaként szereplő házi egér) látása dikromatikus, azaz rövid (kék vagy S típus) és középhosszú (zöld vagy M típus) hullámhossztartományokban elnyelő csapokkal működik. Mindez azt jelenti, hogy számukra a vörös fény (hosszú hullámhossztartomány, L típus) nem, vagy csak rosszul érzékelhető, így az állatok sötétben mutatott viselkedése viszonylag jól vizsgálható az emberi szem számára látható vörös megvilágítás mellett (Peichl 2005). A csapok magas fényintenzitás mellett működnek hatékonyan és a látótér elemeit magas fokú részletességgel képesek leképezni a

látórendszerben. A pálcikákhoz képest a csapok jelét továbbító pályák alacsony konvergenciát mutatnak és az eltérő fényérzékenységu csap-típusoknak köszönhetően több, egymással párhuzamos útvonalat alakítanak ki (Field és Chichilnisky 2007; Masland 2012). A fotoreceptorokat a retina közbülső rétegeiben a bipoláris sejtek követik. Alapvetően két nagy csoportra oszthatóak: ON (fény bekapcsolására depolarizálódó) és OFF (fényre hiperpolarizálódó) bipoláris sejtek. A bipoláris sejtek ingerületüket a retinális dúcsejteknek (más néven ganglionsejteknek) adják át, melyek a retina legbelső rétegében helyezkednek el. A szem felépítésének optikai sajátossága, hogy a fénynek a retina teljes szövetén keresztül kell haladnia ahhoz, hogy a fotoreceptorok rétegét elérje. Éppen ezért a köztes rétegek áttetszőek, a fény számára átjárhatóak és csak néhány, kiemelt esetben találunk a dúcsejtek között fényérzékeny sejteket (fotoszenzitív, melanopszint termelő dúcsejtek, M1-M5 típusként jelölve; Sanes és Masland 2015). Összességében a dúcsejtek képezik a retina végső kimenetét a központi idegrendszer látóközpontja felé, és más retinális sejt típusokkal szemben lokális potenciálok kialakítása mellett akciós potenciálok generálására is képesek. A retinális dúcsejtek populációinak pontos száma fajonként eltérő, azonosításuk és klasszifikációjuk ezért jelenleg is zajló folyamat (Vlasits és mtsai. 2018, Baden és mtsai. 2019). Az általunk modellként használt egér retina esetén a működéstanilag elkülöníthető dúcsejt típusok száma legalább 22-32 közöttire tehető (Völgyi és mtsai. 2009; Baden és mtsai. 2019). A bipoláris sejtekkel ellentétben a dúcsejtek szintjén általánosan nem csak „ON” és „OFF”, hanem ún. „ON-OFF” sejteket is megkülönböztetünk a fényválasz tekintetében, amelyek a fény be- és kikapcsolására egyaránt akciós potenciál sorozattal válaszolnak. *A retinális dúcsejtekről bővebb információ az 1.3 (emberi és egér retina összehasonlítása) illetve az 1.4 (az egér retina dúcsejtjeinek bemutatása) alfejezetekben olvasható.*

A fotoreceptorok, bipoláris sejtek és dúcsejtek egymást sorban követve alakítják ki a retinában futó függőleges irányú parallel pályákat, mellettük azonban két további sejt típus is lényeges szerepet tölt be a vizuális kód kialakításában, ezek pedig a horizontális és amakrin sejtek. Az OPL-ben elhelyezkedő horizontális sejteknek két nagy csoportja ismert az emlős retinában, melyeket jellemzően „A” és „B” típusként jelölnek (a főemlősök kivétel képeznek, esetükben a jellemző tipizálás H1 és H2). Mindkét típus dendritfája a csapoktól gyűjt információt, a B-típusú horizontális sejt (a H1 típusúhoz hasonlóan) azonban egy hosszú axonnal is rendelkezik, amely a pálcikákhoz fut. A horizontális sejtek feladata tulajdonképpen nem más, mint a környező fotoreceptorok aktivitásának szabályozása: az általuk gyakorolt negatív feedback laterális hatás fontos szerepet játszik a látótér különböző fényerősségu területeinek

hatékony elkülönítésében, azaz a szélek és kontrasztok detektálásában (Hartline 1983, Kuffler 1953, Masland 2012, Thoreson és Dacey 2019).

A jól körülírt, néhány típusba tömörülő horizontális sejtekkel szemben az amakrin sejtek nagy és inhomogén csoportja akár 40 (Haemstadter és mtsai. 2013), illetve a molekuláris analízisek alapján akár 140 további sejtípust is magába foglalhat (Yan és mtsai. 2020) és ez a szám jelentősen változhat is annak függvényében, hogy melyik emlős fajt vizsgáljuk. Jellemzően a belső retina gátló interneuronjairól van szó – általános jellemzésük azonban akár ki is merülhet ennyiben. Szerteágazó hálózatukban kémiai és elektromos szinapszisokat egyaránt létesítenek, partnereik lehetnek bipoláris sejtek (ún. inhibitoros feedback mechanizmus kialakítása), dúcsejtek (inhibitoros feed-forward kapcsolatok létrehozása) vagy más amakrin sejtek. Az egy amakrin sejt által lefedett modulációs terület alapján, morfológiai besorolással megkülönböztetünk ún. „small-field” vagy „narrow-field” (kis területet lefedő, lokálisan szabályozó) és „wide-field” (akár milliméteres távolságokat áthidaló, hosszú nyúlványokkal rendelkező) amakrin sejteket (Franke és Baden 2017). Szinaptikus transzmisszó tekintetében a „small-field” sejtek jellemzően glicinergek (Menger és mtsai 1998), míg a „wide-field” sejtek GABA-t szabadítanak fel transzmitterként (Pourcho és Goebel 1983). Bizonyos amakrin sejtípusok egy másodlagos transzmittert, például glutamátot, dopamint vagy acetilkolinot is alkalmazhatnak (Lee és mtsai. 2014) vagy neuromodulátorokat (Somatostatin - SOM, Substance P – SP, Neuropeptide Y - NPY; Vasoactive intestinal polypeptide - VIP) szabadíthatnak fel (Li és Lam 1990; Vielma és mtsai. 2011; Franke és Baden 2017). A réskapcsolatok biztosította elektromos kapcsoltságnak köszönhetően a hálózat egyes elemei a saját, lokális szabályozási körökön túl is képesek a retinális jelátvitelt akár több szinaptikus lépcsőt követően is modulálni (Asari és Meister 2014; Franke és Baden 2017).

### **1.3 Az emberi retina és a házi egér (*Mus musculus*) retinájának összehasonlítása**

A dolgozatban bemutatott kísérletes munka alapkutatásnak minősül, célja elsősorban az emlős retina alaposabb megértése, a retinában működő idegi hálózatok működéséről nyert ismereteink bővítése. Azzal azonban, hogy a számunkra releváns célcsoportot az „emlős retinaként” jelöljük meg, máris egy fontos korlátot állítunk fel magunknak: mennyire tekinthetjük a retinát, mint szervet, univerzálisnak az egyes rendszertani csoportok között? A retinakutatásban részt emlős modellek hosszas listájának (a teljesség igénye nélkül: házi egér, vándorpatkány, tengerimalac, házi nyúl, házi macska, a selyemmajom vagy a makákó) köszönhetően tudjuk, hogy a retina működésének alapvető sémája az egyes emlős fajok között általánosnak tekinthető, szövettani tagolása szintén egységes sémát mutat. Lényeges

különbségeket tapasztalhatunk azonban a retinát felépítő sejtek jellemző típusainak reprezentáltságában és eloszlásában, illetve meg kell jegyeznünk, hogy az emberi látásban kulcsfontosságú szerepet betöltő látógödör (fovea centralis, „az éleslátás helye”) az emlősök között kiemelten a nappali életmódot folytató főemlősök látórendszerének sajátossága (Bringmann és mtsai. 2018; Grünert és Martin 2020) és a kísérleti modellállatok jelentős részében nem található meg. A fovea mellett azonban a látásélesség javítására az evolúció során egyéb adaptációk is kialakultak, mint például csapokat szintén nagy sűrűségben tartalmazó, megközelítőleg kör alakú area centralis a macskák, vagy a hosszúkás ún. „visual streak” a nyulak esetén (Bringmann és mtsai. 2018).

Ha az ember látását a dolgozatban vizsgált modell, a házi egér retinájával hasonlítjuk össze, jelentős különbségeket fedezhetünk fel a sejtek számában, tipizálásában és eloszlásában (a jellemző különbségeket tájékoztató jelleggel a 2. táblázat foglalja össze). Fontos megemlékeznünk arról, hogy a házi egeret jellemzően az éjszakai (nokturnális) életmódot folytató állatok köré sorolhatjuk, tehát elsősorban a sötétben való tájékozódáshoz adaptálódott az ember nappali aktivitásával szemben, így a pálcikák sűrűsége jóval magasabb értéket mutat az egér retina esetében. A látógödör hiányában a fotoreceptorok eloszlása az egér látórendszerében ezzel szemben viszonylag egyenletesnek tekinthető, míg az emberi éleslátás a csapok rendkívül koncentrált centrális (és a pálcikák perifériás) topográfiai preferenciáját eredményezi (Curcio és mtsai 1990, Grünert és Martin 2020). Eltérő továbbá a két csoport színlátása is: az emberi trikromatikus színlátás kifejezetten a főemlősökre jellemző, az egereknek csupán az S és M típusú csapokkal beérniük, ami viszont lehetővé teszi a kutatók számára a sötétadaptált rágcsáló retina alacsony intenzitású, vörös fényű megvilágítás mellett történő boncolását. Számottevő különbség továbbá, hogy az emberi retinában előforduló horizontális sejtek két nagy típusának (H1 és H2) általános megfelelőiből (B és A) az egerek csupán a B típusal rendelkeznek (Peichl és Ganzález-Soriano 1994). Bár a főemlős és a rágcsáló bipoláris sejteket vizsgálva a megállapított sejttípusok száma hasonlóan alakul (12 és 14, kettővel több az egér retinában), az egyes típusok megfeleltetése ebben az esetben is csak részlegesen valósítható meg (Euler és mtsai. 2014, Grünert és Martin 2020). Nagy eltérés mutatkozik a retinális dúcsejt típusok prediktált számában is: míg a főemlős retinában a dúcsejtek tipizálása 16 és 18 típus körül alakul (Peng és mtsai. 2019), addig az egér retinában a dúcsejt típusok pontos számának meghatározása és a különböző módszerekkel (morfológiai, fiziológia és molekuláris biológiai paraméterek) elkülönített kategóriák egymással történő megfeleltetése továbbra is intenzív kutatómunka tárgyát képezik (Rheume és mtsai. 2018).

Jelentős különbség mutatható ki továbbá az egyes vizsgált állatfajok között a dúcsejtek nevezékτανát illetően is: az egérben gyakran vizsgált és jól körülírt alfa sejtek például a házi macskában Y sejt-ként ismertek és az emberi (és főemlős) látórendszer parasol sejtjeivel (nagy receptív mező, mozgás és mélységérzékelés) állíthatóak párhuzamba. Ugyanakkor a főemlős midget (kis receptív mező, szélek érzékelése, színérzékenység kromatikus opponencia formájában) sejtekhez hasonlítható X vagy béta sejtek képviselői az egér retinában kevésbé ismertek és további vizsgálatokra várnak (Sanes és Masland 2015).

	<b>Ember</b>	<b>Házi egér</b>
Életmód	nappali	éjszakai
Retina mérete (átmérő)	40 mm	5 mm
Fovea centralis	van	nincs
Fotoreceptorok sűrűsége	változó	viszonylag állandó
Pálcikák száma	92 000 000	6 400 000
Csapok száma	4 600 000	180 000
Pálcikák:csapok aránya	20	36
Csapok típusa	S,M,L	S, M
Színlátás	trikromatikus	bikromatikus
Horizontális sejtek	H1, H2	B
Bipoláris sejtek	12 típus (főemlős)	14 típus
Amakrin sejtek	25+ (30-60?)	45+ (140?)
Dúcsejt típusok száma	16 (fovea) - 18 (periféria)	30-40
Dúcsejtek száma	1 000 000	50 000
Dúcsejtek rétegének vastagsága	8 (periféria) -1 (fovea) sejtréteg	1 sejtréteg

**2. Táblázat: jellegzetes különbségek az ember (és általánosságban a főemlősök) és a házi egér retinájának felépítésében.** A tapasztalt különbségek jelentős része a két élőlény életmódjára vezethető vissza: éjszakai életmód mellett az egér látórendszere egyértelműen a sötétlátáshoz feltétlenül szükséges pálcikákat preferálja.

Tagadhatatlan, hogy a látórendszer működésének megértésére tett kísérleteinket a tudományos kíváncsiság mögött megbújva az a cél vezérli, hogy a szerzett tudást az emberi látás javítására vagy helyreállítására tett törekvéseinkben tudjuk kamatoztatni. A retinakutatásban éppen ezért háro jelentős kategóriát kell felállítanunk: 1. a gerinces retina, 2. az emlős retina, illetve 3. a főemlősök retinája, mint modell. A felsorolt különbségek ellenére kis testmérete, egyszerű és költséghatékony tartása (más, közepes- vagy nagytestű állatokhoz

vagy akár főemlősökhöz mérten), illetve gyors szaporodási ciklusa/generációs ideje miatt a házi egér továbbra is népszerű kísérleti modell a retinakutatásban. Vitathatatlan előnye más modellekkel szemben (a korábban felsoroltak mellett) a rendelkezésünkre álló laboratóriumi egértörzsek rendkívül magas száma (csak a Jackson Laboratory több, mint 8300 különböző vonalat tart számon; <https://www.jax.org>), melyek között számos genetikailag módosított vonal található. Úgy vélem, az egér retina még számos olyan alapvető látórendszeri és idegrendszeri strukturális és működési sajátosság megértéséhez nyújthat kiváló alapot, melyet későbbiekben sikeresen használhat majd fel a tudomány a gyógyászatban és az alkalmazott kutatásban.

#### **1.4 Dúcsejtek az egér retinában**

Az emlős retinában található idegsejtek nagy és változatos csoportját több, mint 60 idegsejt típus építi fel (Masland 2012), melyből a különböző dúcsejt típusok száma egérben akár harmincnál is több különálló dúcsejt típust foglalhat magába (Sanes és Masland 2015). A dúcsejtek megkülönböztetése más sejtípusoktól morfológiai bélyegek alapján az alábbi elsődleges sajátosságok szerint lehetséges (Masland 2012; Sanes és Masland 2015):

1. a sejttest a GCL-ben helyezkedik el (szükséges, de nem egyértelműen meghatározó feltétel az ún. „displaced” amakrin sejtek jelenléte miatt a GCL-ben),
2. a dendriteken az IPL-ben arborizálnak és rajtuk tüske nem található,
3. axonjaik a látóidegen kilépve futnak a látóközpont felé.

Jellemző tulajdonságuk továbbá, hogy a rendelkezésükre álló teret mozaikosan töltik ki (angol nyelvhasználatban a „tiling” jelensége), tehát egy adott típusba tartozó dúcsejtek szómái egymástól viszonylag szabályos távolságra helyezkednek el, dendritjeik pedig egyenletes eloszlással, rések és kihagyások nélkül hálózák be a sejtek közötti szabad területet (Wässle 2004). A dúcsejtek, szerencsénkre, ugyanakkor univerzális molekuláris markerekkel is rendelkeznek, melyek lehetővé teszik a teljes populáció egyetlen jellel történő azonosítását:

1. Thy1 felszíni fehérje (Barnstable és Dräger 1984),
2. a Brn3 transzkripciós faktor-család (Badea és mtsai. 2009),
3. RPBM RNS-kötő fehérje (Rodriguez és mtsai. 2014).

További klasszifikációt tesz lehetővé, hogy az ON (fényre depolarizáló), OFF (fényre hiperpolarizáló) vagy éppenséggel ON-OFF fiziológia a dúcsejtek nyúlványainak morfológiai jellegzetességében is nyomon követhető: ON sejtek esetén a dendritfa arborizációja az IPL belső rétegeiben történik, míg OFF dúcsejteknél ugyanez a jelenség az IPL külső rétegében

figyelhető meg. ON-OFF sejtek esetén kettős, avagy bi-sztratifikáció jellemző, amely szintén egyértelmű azonosítást tesz lehetővé.

Sok esetben a klasszifikáció egyik legnagyobb kihívása az ismert funkció feltárt morfológiával történő helyes összekapcsolása. Ehhez olyan specifikus jelölésre van szükség, amely lehetővé teszi egy-egy sejt típus vagy azon belüli altípus elkülönítését és szelektív tanulmányozását. Az egér retinális dúcsejtek azonosításában nagy előrelépést jelentett az elérhető genetikailag módosított egértörzsek számának jelentős növekedése: egy-egy vonal akár típus vagy altípus specifikus azonosítást is lehetővé tehet (pl. az alfa dúcsejteket jelölő KCNG4-Cre vonal, amely lehetővé tette egy lehetséges, eddig hiányzó altípus azonosítását; Krieger és mtsai. 2017). Az ismert retinális idegsejt típusok palettája azonban továbbra sem teljes: Rheume és kollégái eddig 40 klasztert különítettek el a dúcsejtek transzkriptóm-analízisével (Rheume és mtsai. 2018), ezek megfeleltetése a már azonosított csoportokkal egyelőre viszont csak a molekuláris markerek szintjén valósult meg. Az egér retinában leírt dúcsejt típusokat a 3. táblázat foglalja össze.



Az egér retina dúcsejtjei				
Csoport megnevezése	Rövid név	Jellemző tulajdonságok	Morfológiai bélyegek	Ismert altípusok
ON-OFF irány szelektív dúcsejtek	ON-OFF DS RGC	Mozgás iránya (kontraszt-független iránypreferencia)	Bisztratifikált dendritfa	4 csoport (a 4 kardinális irány alapján)
ON irány szelektív dúcsejtek	ON-DS RGC	Fényes mozgó pontokat érzékel	Monosztratifikált dendritfa	3 csoport (3 preferált irány)
Alfa dúcsejtek	$\alpha$ RGC	Macska Y sejtek megfelelői	Nagy sejttest, széles dendritfa dichotómikus elágazásokkal	3 típus (+1 kérdéses)
Fényérzékeny dúcsejtek	ipRGC	Melanopszint tartalmaznak	Nagy kiterjedésű dendritfa	M1-M5 (M4=ON alfa)
Local edge detektorok	LED, egérben W3B	Kis méretű mozgó pont azonosítása mozdulatlan háttéren	Kompakt dendritfa extenzív elágazásokkal	
J-RGC		Látómezőben felfelé irányuló mozgásra reagál, erősen aszimmetrikus receptív mező	Aszimmetrikus dendritfa (dorzálistól ventrális irányban)	morfológiailag 3 lehetséges típus
Színérzékeny dúcsejtek		Egérben csak leírva, emlősökben általános		Blue ON és Blue OFF
Orientáció-szelektív sejtek	OS RGC		2 típus*	
Kontraszt-szuppresszált sejtek		Uniformitás detektor		
Béta sejtek	$\beta$ RGC	Egérben leírva, de még nincs pontosan meghatározva (macskában X sejtek)		
<b>Egyéb**</b>				

**3. Táblázat: Egér retinában azonosított dúcsejt típusok.** Az összefoglaló táblázat Sanes és Masland munkája alapján készült (Sanes és Masland 2015). \*Nath és Schwartz munkája alapján egér retinában az orientáció-szelektív dúcsejteknek eddig két típusát sikerült elkülöníteni. \*\*Az egyéb kategória olyan morfológiailag azonosított csoportokat (lehetséges típusok/altípusok) ölel fel: Farrow és munkatársai által azonosított, korábbi típusoknak meg nem feleltetett parvalbumin pozitív sejtek (Farrow és mtsai. 2013) és Sümbül és kollégái által leírt további sejtcsoportok (szám szerint 6; Sümbül és mtsai. 2014).

## 1.5 Szinaptikus transzmisszió a retinában

A retinális párhuzamos pályák egyik legjelentősebb szerepet betöltő neurotranszmittere tulajdonképpen nem más, mint egy egyszerű aminosav, a glutamát, amely a központi idegrendszer működésének kulcsfontosságú résztvevője (Michaelis 1998). Hatását mind ionotróp [1. AMPA/2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav; 2 NMDA/N-metil-d-aszparaginsav; 3. kainsav/kainate receptorok], mind pedig metabotróp glutamátreceptorokra (mGluR<sub>1-8</sub>) képes kifejteni (Thoreson és Witkovsky 1999). A fotoreceptorok működésének alapelve, hogy a fény hatására beinduló fototranszdukciós folyamatnak köszönhetően a sejt által megvilágítás hiányában folyamatosan felszabadított glutamát mennyisége csökken, így az ún. „sötét-áram” mérséklődése (azaz a transzmitterleadás csökkenése) lesz az, amely a bipoláris sejtek szintjén kiváltja poszt-szinaptikus választ. A bipoláris sejtek által közvetített ON és OFF válasz tulajdonképpen egyaránt glutamátreceptorokon keresztül valósul meg: míg az ON bipoláris sejtek esetén az mGluR6 által közvetített jelátviteli folyamatok az adenilát-cikláz enzim aktivitásának gátlását eredményezik, addig az OFF bipoláris sejtek esetén a kationcsatornák glutamát hatására történő nyílása a membránt depolarizálja (AMPA vagy kainát receptor), lehetőséget biztosítva a két sejtípus egy pontból induló alternáló aktiválására. A bipoláris sejtek felől induló szinaptikus transzmisszió szintén glutamáttal operál, azzal a különbséggel, hogy a retinális dúcsejteken már megjelenik poszt-szinaptikusan az ionotróp glutamátreceptorok egy további típusa, az NMDA receptor.

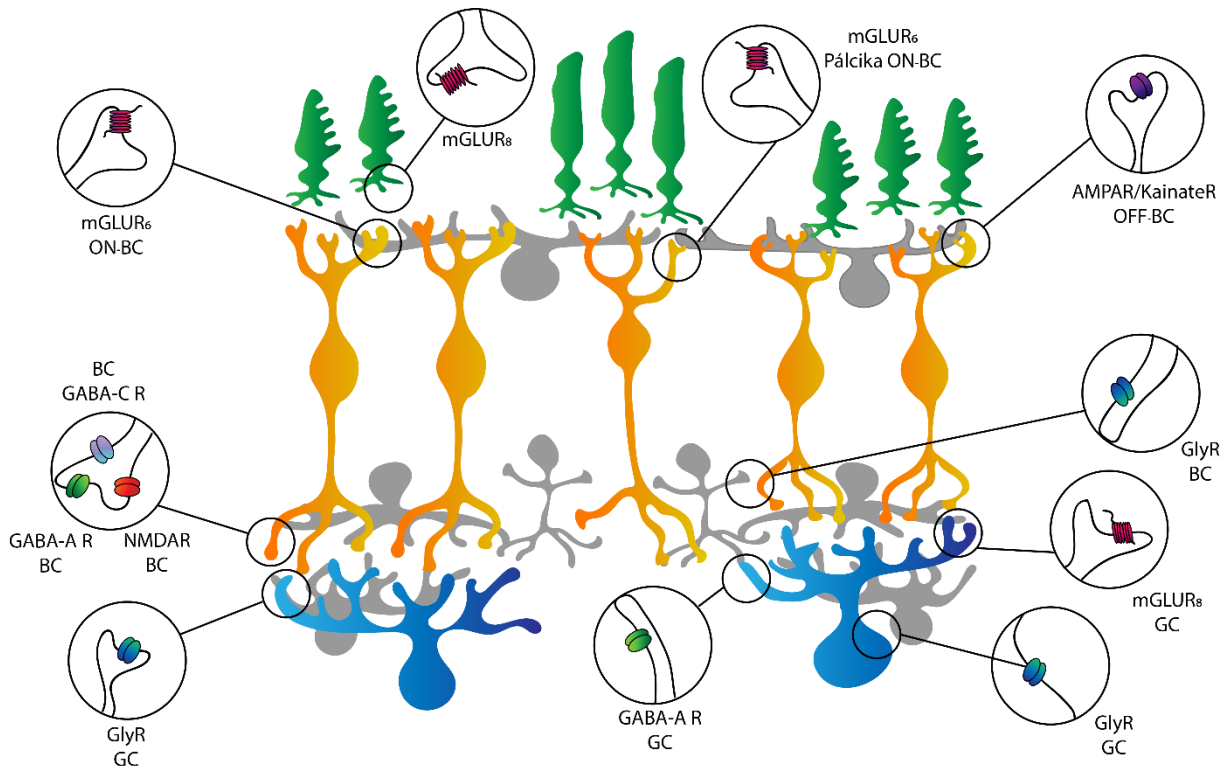
A központi idegrendszer egy további klasszikus neurotranszmittere, a GABA, azaz gamma-amino-vajsav, szintén elterjedt a retinális szinapszisokban. Elsősorban a horizontális sejtek és az ún. „large-field” amakrin sejtek inhibitoros hatásának közvetítésében játszik szerepet. A GABA-erg amakrin sejtek egyaránt szinaptizálnak bipoláris sejtekkel, dúcsejtekkel és más amakrin sejtekkel is. A kettős immunhisztokémiai jelöléseknek köszönhetően ma már tudjuk, hogy bizonyos sejtcsoportokban akár más fontos neurokémiai hírvivőkkel együttesen is előfordulhat (A18 sejtekben dopamin, Kolb és Mtsai 1991; starburst amakrin sejtekben acetilkolin, Taylor és Smith 2012). A három ismert GABA receptortípus (A és C, mint ionotróp receptor és B, mint metabotróp receptor) közül mindhárom megtalálható a retinában, a különböző receptortípusok kombinációja így lehetővé teszi, hogy a GABA által közvetített inhibitoros hatás eltérő kinetikával nyilvánuljon meg különböző sejtpopulációkban, ezáltal is növelve a retinális jelátviteli hálózat komplexitását. A GABA-A receptor széles körben elterjedt a központi idegrendszerben, ligand-aktivált kloridcsatornáként lehetővé teszi a membrán gyors hiperpolarizációját, ugyanakkor GABA-C receptor esetén ugyanezen gátló hatás már

lényegesen lassabb kinetikával nyilvánul meg. Bár az új nevezéktan szerint a GABA-C receptor helyes megnevezése GABA-A $\rho$  (a  $\rho$  jelölés az ún. rho alegység jelenlétére utal), a dolgozat megfogalmazásakor célszerűbbnek tartottam a régebbi, általánosan ismert jelölést alkalmazni. A GABA-B receptorok, az előző két csoporttól eltérően, a G-fehérjéhez kapcsolódva, a sejten belüli jelátviteli folyamatokat befolyásolva fejtik ki (a GABA-A receptorokhoz képest lassabb kinetikával működő) gátló hatásukat. Bár a központi idegrendszerben máshol is megtalálhatóak, a GABA-C receptorok jelenléte elsősorban a retinában figyelhető meg nagy számban. Jelen vannak a horizontális sejtek, bipoláris sejtek, amakrin sejtek és dúcsejtek szintjén is, általában GABA-A receptorokkal együtt, de eltérő számban és arányban (Deniz és mtsai 2019), így feltételezhető, hogy a megszokottól eltérő kinetikájuknak köszönhetően nagy részben járulnak hozzá a különböző retinális útvonalak változatos funkcióinak kialakításához. Továbbá, a jelenleg elfogadott álláspont szerint, a GABA-C receptorok játsszák a legfontosabb szerepet az amakrin sejtek által közvetített feedback és feed-forward szinapszisok kialakításában (Qian 2005).

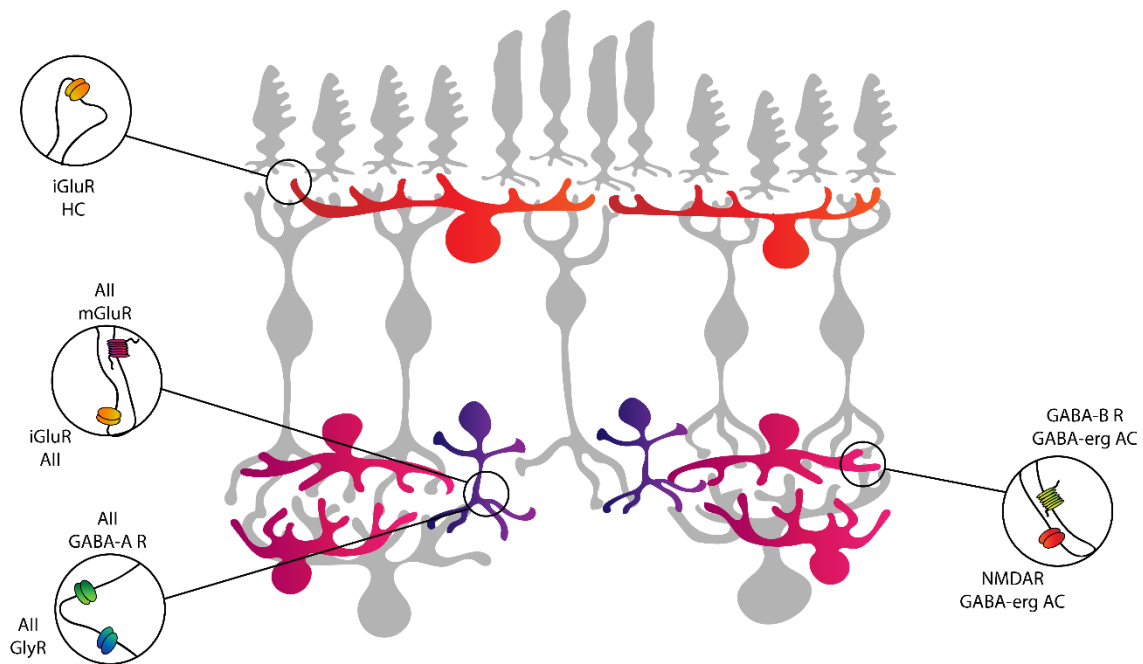
A „small-field” amakrin sejtekben, ellentétben a tipikusan GABA-erg „large-field” társaikkal, már jellemzően a glicin játssza a legfontosabb inhibitoros hírvivő szerepét; ez tapasztalható például a jól ismert AII amakrin sejtek esetén. A glicin receptorok minden esetben ligand-aktivált kloridcsatornaként működnek és a sejtmembrán hiperpolarizációjával gátolják az idegsejtek elektromos aktivitását. Az alfa alegység különböző típusainak térképezése az egér retinában (Heinze és mtsai. 2007) rámutatott az egyes receptortípusok specifikus eloszlására, ez pedig arra enged következtetni, hogy a GABA receptorokhoz hasonlóan az emlős retina glicinerg receptorai is funkció-specifikus lokalizációt mutatnak az egyes útvonalak mentén. Ezt a feltételezést erősíti az a tény is, hogy a többszörös jelölések tanulsága szerint az esetek többségében egy poszt-szinaptikus receptor csupán egyetlen típusú alfa alegységet expresszál. Az alfa1, gyors kinetikájú alegység jellemzően bipoláris és alfa-homológ dúcsejtekben fordul elő (Ivanova és Müller 2006; Majumdar és mtsai. 2007). AII amakrin sejtekben már a lassabb, közepes tartományba eső alfa3 alegység szerepel, míg a lassúnak tekinthető alfa2 és alfa4 alegységek elsősorban a „narrow-field” amakrin sejteknél fordulnak elő (Weiss és mtsai. 2008).

A GABA-val esetenként ko-lokalizációt mutató dopamin jelenléte könnyen kimutatható a tirozin-hidroxiláz enzim jelölésével. Receptorai (D1- és D2-típusú dopamin receptorok) megtalálhatóak a retina különböző pontjain: míg a D2-típusú receptorok elsősorban a külső retinában fordulnak elő (ONL, OLM, pigmenthám rétegében), addig a D1-típusú receptorok jellemzően az elektromos réskapcsolatok előfordulásával állnak összefüggésben (horizontális

sejtek, amakrin sejtek, dúcsejtek; Roy és Field 2019). Az acetilkolin receptorok tekintetében szintén hasonló variabilitás figyelhető meg: az emlős retinában mind a muszkarinos (mAChR), mind pedig a nikotinos (nAChR) receptortípust kimutatták (Hutchins és Hollyfield 1985), magát az acetilkolint pedig a perifériás idegrendszer gyors excitatórikus transzmittereként tartják számon.



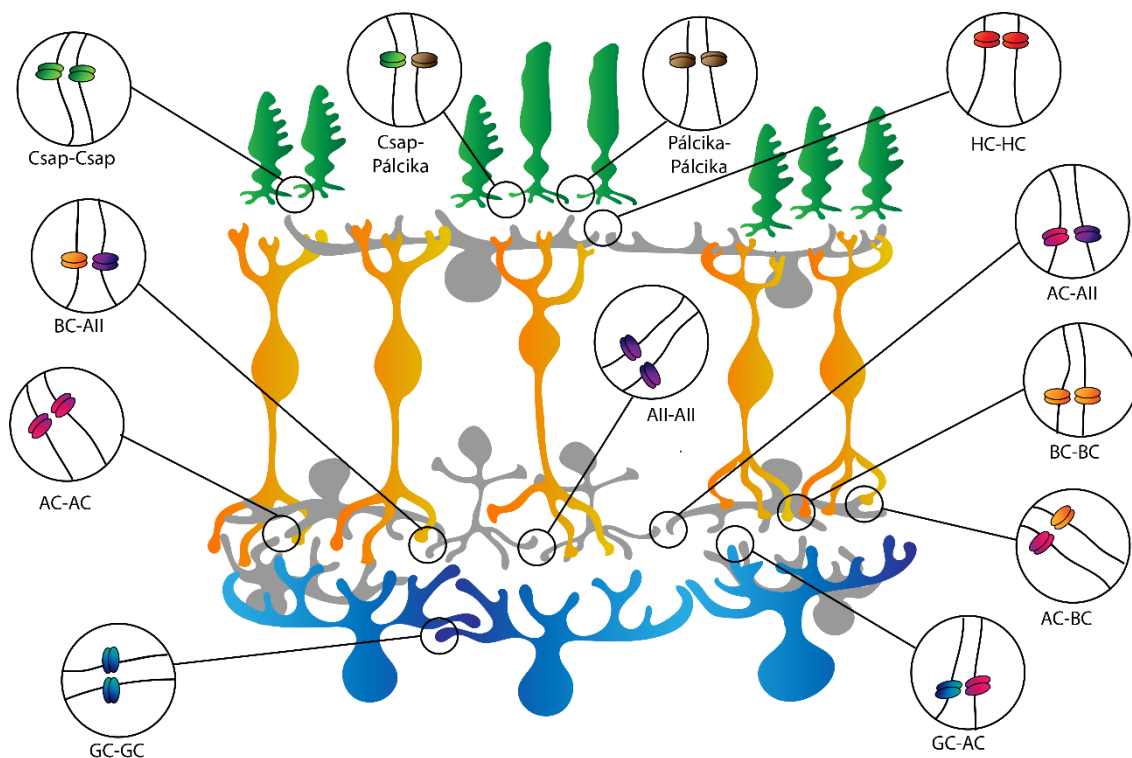
**3. Ábra: az emlős retinában működő párhuzamos útvonalak poszt-szinaptikus receptorainak elhelyezkedése.** Az ábrán szemléltető jelleggel, elsősorban az elhelyezkedést hangsúlyozva szerepelnek a glutamát (ionotróp és metabotróp egyaránt), a glicin és a GABA receptorok. Az ábrán használt rövidítések (ABC sorrendben): AMPAR=AMPA receptor, BC=bipoláris sejt, GABA-A R=GABA-A receptor, GC=dúcsejt, GlyR=glicin receptor, mGLUR=metabotróp glutamát receptot.



**4. Ábra: a retina interneuronjai által kialakított oldalirányú jelátviteli útvonalak poszt-szinaptikus receptorai.** Az ábra szemléltető jellegű, elsősorban a glutamát, glicin és GABA receptorok általános elhelyezkedését hivatott jelezni. Az ábrán használt rövidítések (ABC sorrendben): AII= AII amakrin sejt, AC= amakrin sejt, GABA-A R=GABA-A receptor, GABA-B R=GABA-B receptor, GlyR=glicin receptor HC=horizontális sejt, iGluR=ionotróp glutamátreceptor, mGluR=metabotróp glutamátreceptor, NMDAR= N-metil-d-aszparaginsav receptor,

A hagyományos kémiai transzmisszó mellett kiemelten fontos szerepet kap a retinában a réskapcsolatok, vagy más néven elektromos szinapszisok által közvetített jelátvitel. Testszerte minden olyan szövetben találkozhatunk velük, ahol esszenciális a sejtek közötti gyors, összehangolt kommunikáció – és a retinában sincs ez másképp. Míg a korábban bemutatott neurotranszmitterek felszabadítása, diffúziója és receptorhoz kötődése is jelentős időt vesz igénybe, addig a réskapcsolatok lehetővé teszik az elektromos jel közvetlen, akadályok és késleltetés nélküli továbbhaladását sejtről-sejtre. Az emlős retinában réskapcsolatok találhatóak például a fotoreceptorok szintjén a csapok között, ahol feladatuk elsősorban jel szummációja és a jel/zaj-arány csökkentése (Bloomfield és Volgyi 2009), ugyanakkor megtalálhatóak továbbá a pálcikák és csapok között is, létrehozva egy másodlagos pálcika útvonalat, amely egyenesen a csapokon keresztül szállítja tovább a pálcikák által szkotopikus fényviszonyok mellett rögzített információt (Völgyi és mtsai. 2004). Szintén fontos szerepet töltenek be az elektromos szinapszisok a horizontális sejtek működésében (Bloomfield és Völgyi 2009), lehetővé téve az erre a sejtípusra jellemző rendkívül nagy területet lefedő receptív mező kialakulását (Mangel és Downling 1985). A retinális elektromos szinapszisok működésének egyik legillusztratívabb

példája az AII amakrin sejtek működése: az ún. elsődleges pálcika útvonal legfontosabb ismertetőjegye, hogy a pálcikák felől érkező információ először AII sejtek segítségével kapcsolódik át a csap útvonalba és csak ezután juthat el a dúcsejtek szintjére. Az elektromos jel továbbítását ebben a formában az AII-AII és az AII-bipoláris sejt réskapcsolatok teszik lehetővé (Kolb 1977, Famiglietti és Strettoi 1990, Volgyi és mtsai. 2009). Általánosságban elmondható, hogy az amakrin sejt – amakrin sejt és az amakrin sejt – dúcsejt réskapcsolatok rendkívül fontos szerepet töltenek be a retinális elektromos aktivitás szinkronizációjában, ugyanakkor az érintett sejtípusok nagy számára való tekintettel a szóban forgó szinaptikus kapcsolatok leírása és tipizálása jelen pillanatban sem tekinthető még teljesnek. Szintén kiemelt jelentőségű a dúcsejteken megjelenő elektromos szinapszisok működése, melyek lehetővé teszik a lokális hálózatok létrehozását az azonos típusba tartozó retinális dúcsejtek között: az elektromos aktivitás szinkronizációja lényegesen megnöveli a látóideg felé történő jeladás hatékonyságát (Volgyi és mtsai. 2009). Különböző dúcsejt típusokat összekapcsoló heterológ réskapcsolatok jelenlétét nem sikerült kimutatni (Trenholm és mtsai. 2017).



**5. Ábra: Az elektromos szinapszisok elhelyezkedése az emlős retinában.** Az ábrán alkalmazott színek mindig a szinaptikus kapcsolat kialakításában résztvevő két sejtet (azonos sejtípus azonos színnel feltüntetve) jelzi, a réskapcsolatot felépítő connexin alegységekről azonban nem közöl információt! Az ábrán használt rövidítések és jelölések: AC = amakrin sejt, AII = AII típusú amakrin sejt, BC = bipoláris sejt, GC = dúcsejt, HC = horizontális sejt.

## 1.6 Retinális útvonalak

Az egyik legjelentősebb vertikális útvonal a sötétben, azaz megfelelő megvilágítás hiányában előtérbe kerülő, alacsony fényintenzitás mellett is működőképes elsődleges pálcika-útvonal, mely elsősorban az éjszakai életmódra berendezkedett fajok túlélésében játszik meghatározó szerepet. Nem elhanyagolható azonban a sötétlátás képessége az emberben sem, hiszen jellemzően még szinte vaksötétben is elsősorban a vizuális információk alapján próbálunk tájékozódni. Az elsődleges pálcika-útvonal jelentőségét tükrözi, hogy az emberi retinában fotoreceptoraink közül a pálcikák száma nagyságrendekkel felülszárnyalja a csapok számát, ez a trend pedig nyomon követhető a hálózatba kapcsolt további neuronok számában is (Ahnelt és Kolb 2000). A sötétben való vizuális tájékozódás jelentősége ellenére az emlős retinában azonosított számos bipoláris sejttípus közül azonban egyről sikerült csak bebizonyítani, hogy kizárólag a pálcikáktól kapja ingerületét: az azonosított, pálcika bipolárisoként emlegetett sejt ON-polaritású és más ON bipolárisokhoz hasonlóan a már ismertetett metabotróp glutamátreceptorral (mGluR6) rendelkezik. Dendritjei az OPL-ben jellegzetes pálcika ribbon szinapszisokon keresztül kapnak bemenetet, míg axonjaik mélyen az IPL-be nyúlnak és a dúcsejtekhez közel terminálódnak. A pálcika útvonal különlegessége, hogy az általa továbbított információ nem közvetlen módon, hanem a csap-útvonal bipoláris sejteinek közbeiktatásával éri el a retinális dúcsejteket, a kapcsolat létrehozásáért pedig az AII amakrin sejtek felelősek (Famiglietti és mtsai. 1975). Az amakrin sejtekre általánosságban jellemző inhibitoros szinapszisok azonban csak egy részét adják a pálcika-útvonal összetett kapcsolási rajzának: az AII populáció egyszerre létesít glicinerg kapcsolatot az OFF-bipolárisokkal, illetve réskapcsolatokat az ON-bipoláris hálózat elemeivel és a szomszédos amakrin sejtekkel (Wässle 2004).

A pálcika útvonal egyik legfontosabb jellemzője a magas fokú konvergencia. A macska retinát alapul véve sikeresen végigkövethetjük az információáramlás egyes állomásait, amely összegzésképp közel 1500 fotoreceptor bemenetét összegzi egyetlen ON-béta dúcsejtre akár 100 pálcika bipoláris sejt bevonásával (Sterling és mtsai 1988; Kolb és Nelson 1993). A fényinformáció ilyen jelentős mértékű összegződése teszi lehetővé, hogy alacsony fényviszonyok mellett is megőrizhető maradjon a vizuális tájékozódás képessége. A fent jellemzett elsődleges útvonal mellett létezik továbbá egy másodlagos és egy harmadlagos pálcika útvonal is, melyek működése tovább bonyolítja a retinális neuronok eleve komplex hálózatát. A másodlagos útvonal a pálcikák csapokkal történő összekapcsolását jelenti elektromos szinapszisokon keresztül, míg a harmadlagos, még inkább rejtélyes útvonal a

pálcikák bizonyos csap bipolarisokhoz történő közvetlen jeltovábbítását foglalja magába (Völgyi és mtsai 2004; Pan és mtsai. 2016).

A pálcikákkal ellentétben a csapok már a magasabb intenzitástartományú fény felfogására szakosodtak, így esetükben a funkció is jelentősen változik: a cél többé nem a minimális információ felerősítése, hanem a környezet részletekben gazdag, lehető legpontosabb leképezése. Az emlős retinában minimum kettő, főemlősök esetén pedig már három specifikus hullámhossztartományra szakosodott fotoreceptor továbbít jelet a belső sejtrétegek felé, melyeket érzékenységük szerint a kék, a zöld és vörös csapok kategóriájába sorolhatunk. A három különböző receptortípus eredményezte diverzitás már az első csatlakozási pont, a fotoreceptor – bipolaris sejt szinapszis szintjén egyértelműen megfigyelhető: a pálcika útvonal egyetlen jellegzetes bipolarisával ellentétben a csapok több bipolaris sejttípusnak továbbítanak információt, melyek itt már közvetlenül szinaptizálnak a végső bemenetet fogadó dúcsejtekkel. A stimulus fényerejétől függően két párhuzamos pályát különböztethetünk meg: a háttérből kiemelkedő, fényesebb jel az ún. ON, a háttérnél sötétebb jel pedig az ún. OFF csatornát használja, a bipolaris sejt – dúcsejt szinapszis azonban ettől a kettősségtől függetlenül általánosan glutamátot használ neurotranszmitterként (Brandstätter és mtsai. 1998).

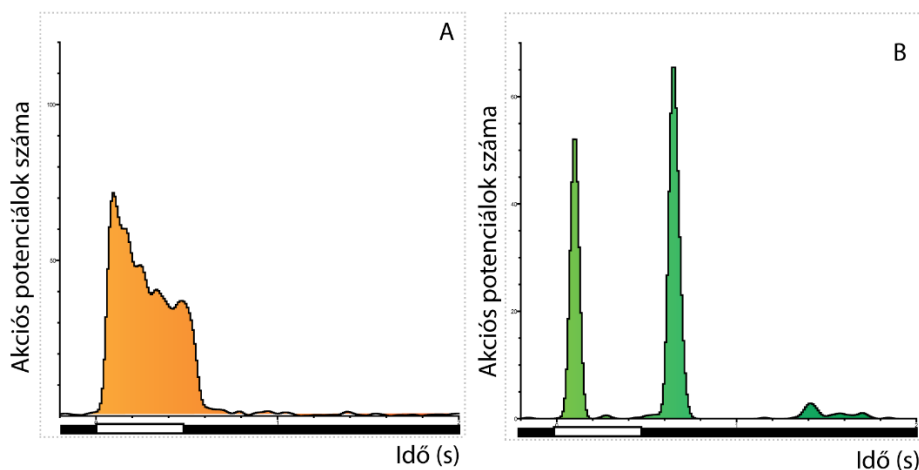
További fontos tulajdonság a vizuális tér leképezését tekintve a kontraszt: a csap útvonalak részeként a horizontális sejtek biztosítják a fotoreceptorok szintjéről érkező centrum-periféria információ éles elválását. Ezekon a pályákon ugyanakkor a konvergencia alacsony szintje figyelhető meg (egy bipolaris sejthez 5-10 csaptól érkezik csupán bemenet; Wässle 2004), hiszen a rendszer fotopikus fényintenzitás mellett a lehető legjobb felbontással próbálja meg fenntartani a vizuális információ részletgazdagságát. A természetes fényviszonyok azonban nem különíthetők el szimplán szkotopikusra és fotopikusra: a csillagos ég halvány derengése és a nappali fényesség között találhatjuk az úgynevezett mezopikus tartományt, amely jellemezheti a korai napkeltét és a késői napnyugtát vagy a jól, általában mesterségesen megvilágított éjszakai tartományt (Grimes és mtsai. 2018). A mezopikus körülmények különleges keveredését eredményezik a csap és pálcika útvonalak találkozásának: az alacsony mezopikus intenzitás az a szint, ahol a másodlagos és harmadlagos pálcika útvonalak a leginkább hatékonyak (Grimes és mtsai. 2018). A fényintenzitás alapján történő pálcika és csap útvonalakra történő elkülönítés azonban nem az egyetlen szempont, amely párhuzamosan futó, de egymástól részben vagy teljesen elkülönülő pályák kialakulásához vezet a retinában. A vizuális tér számos különböző aspektusra vagy elemre bontható (amelyek egymástól történő elkülönítése nem csupán a látóközpontban történik, hanem már a periférián, a retinális



neuronhálózat segítségével kezdetét veszi. Az emlős retina információtovábbítására éppen ezért a párhuzamos feldolgozás (angol nyelvű megnevezéssel „parallel processing”) jellemző: a különböző aspektusokat kódoló információ szétválasztása a retinából kilépve a látópálya magasabb szintjein is érvényben marad.

### 1.7 A dúcsejtek fényválaszának kinetikája

A retinális dúcsejtek a számukra optimális fénystimulusra akciós potenciálok sorozatával reagálnak, amelyek a látóidegen vezetődnek tovább a látóközpont felé. Az elektromos kisüléseknek nemcsak a pusztá megjelenése, hanem azok maximális frekvenciája, illetve a maximum időkése és a fényválasz időbeli lecsengése is fontos információt hordoz a továbbítandó információ minőségéről. Alapvetően a dúcsejteket két nagy csoportba sorolhatjuk az egyedi fényválasz kinetikáját figyelembe véve: gyors lefutású, azaz tranziens (transient) és lassú lefutású, vagy fenntartott (sustained). A tranziens fényválaszt az akciós potenciálok számának gyors emelkedése és a csúcstartó utáni hasonlóan gyors csökkenése, majd rövid időn belüli (40-60 ms) megszűnése jellemzi. A valódi fenntartott fényválasz ugyanakkor akár teljes fényingerlés ideje alatt fennáll, bár intenzitása a csúcstartó elérését követően jelentősen csökkenhet. Az általános értelmezés szerint ez a kettősség fontos minőségi információt hordoz: a környezet gyorsan változó, pontos időzítését igénylő információit a dúcsejtek kitörésszerű tranziens válaszként továbbítják, míg a valamiféle kontinuitást mutató információk továbbítására a fenntartott válasz alkalmas.



**6. Ábra:** fenntartott ON (A, balra) és tranziens ON illetve OFF (B, jobbra) fényválaszok összehasonlító ábrája. A hisztogram az egységnyi időtartamra eső (bin=10ms) akciós potenciálok számát ábrázolja az eltelt idő függvényében.

A tranziens/fenntartott dichotómia már a korai tudományos publikációkban megjelenő elektromos elvezetésekben is nyomon követhető (Werblin és Dowling 1969; Kaneko 1970), mint a különböző stimulus-frekvenciák továbbítására szolgáló fiziológiai mechanizmus és a retinális dúcsejtek tipizálására használható alapvető élettani sajátosság (Cleland és mtsai. 1971). A retinában a fényinformáció feldolgozásának útvonalán a dúcsejtek előtt már a bipoláris sejtek szintjén is megjelenik ez kettősség (deVries 2000; Borghouis és mtsai. 2014), ugyanakkor esetükben akciós potenciálok hiányában a lokális potenciálok segítségével mérhető, hogy a sejt „fázisos” vagy „tónusos” választ ad (a kétféle nevezéktan egyaránt megtalálható különböző publikációkban, azonban a tranziens és fenntartott kifejezések angol nyelvű megfelelőit lényegesen nagyobb gyakorisággal alkalmazzák a fényválasz jellemzésére). A fényválasz gyors, vagy elnyújtott természete támpontként szolgál a dúcsejtek tipizálásában is: az egér retinában előszeretettel vizsgált alfa sejteket hagyományosan három típusra osztjuk az egér retinában fel aszerint, hogy működésük jellemzően tranziens vagy fenntartott: OFF tranziens, OFF fenntartott és ON fenntartott. A felsorolásból látszólag hiányzó ON tranziens alfa sejtet sokáig nem sikerült azonosítani, Krieger és munkatársai azonban úgy vélik, nyomára akadtak az elveszett altípusnak (alfa sejtekre atipikus gyenge SMI32 jelölődés; Krieger és mtsai. 2017). Annak ellenére, hogy a tranziens és fenntartott fényválaszok (és sejtek) létezése ismert és elfogadott, az eltérő kinetika háttérben meghúzódó szabályozó mechanizmust egyelőre nem sikerült maradéktalanul feltérképezni (Zhao és mtsai. 2017). A fent leírt rövid jellemzést leszámítva nincs egységesen elfogadott osztályozási skála arra vonatkozóan sem, hogy milyen követelményeknek kell megfelelnie egy tranziens vagy fenntartott válasznak, ezek a paraméterek közleményeként egyéni elbírálás alá esnek. Arról tehát, hogy hogyan és milyen módszerrel, milyen határok mentén választhatók szét egyáltalán a dúcsejtek tranziens és fenntartott csoportjai, vagy hogy általános érvényűnek tekinthető-e egyáltalán ez a szigorú két kategóriás felosztás, egyelőre nem zajlik párbeszéd.

**Mivel ezek a kérdések az emlős látórendszer alapvető funkcióival és a retinális kód létrehozásával kapcsolatosak, ezért az alábbi dolgozatban ezeknek a megválaszolására irányuló kísérletes eredményeinket mutatom be.**

## 1.8 Idegsejtek oszcillációs aktivitása

Régóta ismert, hogy az idegsejtek képesek elektromos aktivitásukat oszcilláló mintázatokba szervezni: Eckhorn és munkatársai már 1989-ben leírták az általuk „koherens oszcillációként” megnevezett jelenséget a házi macska vizuális cortexében (Eckhorn és mtsai. 1989). Ugyanezen oszcillációs aktivitást azóta a látóközpont mellett más központi idegrendszeri működésekben és struktúrákban is sikerült igazolni, mint például a szaglórendszer (Wehr és Laurent 1996; Laurent 2002), a hallórendszer (Patel és Balaban 2000), illetve a tanulás és memória (Fell és mtsai. 2001). A retinában szintén megfigyelhető a fent említett oszcillációs aktivitás (Neuenschwander és Singer 1996; Castelo-Branco és mtsai. 1998; Kenyon és mtsai. 2003; Arai és mtsai. 2004; Ishikane és mtsai. 2005; Qiu és mtsai. 2016). Az elérhető publikációk magas száma ellenére az oszcillációs aktivitás vizsgálatában is felmerül a retinakutatás általános problémája: a számunkra (azaz a dolgozatban bemutatott kísérletes munka szempontjából) leginkább releváns kutatásokat kétélűek (amerikai ökörbéka, *Lithobates catesbeianus*) retináján végezték (Arai és mtsai. 2004; Ishikane és mtsai. 2005; Qiu és mtsai. 2016), ezért egyelőre bizonytalan, hogy az alacsonyabb rendű gerinceseken történt megfigyelések mennyire általánosíthatóak és alkalmazhatóak az emlős idegrendszer működésére vonatkozóan (az ember, az egér és a kétélűek látórendszerének általános különbségeit a 4. táblázat szemlélteti).

	<b>Ember</b>	<b>Házi egér</b>	<b>Kétéltűek</b>
Retina felosztás	6(10)* réteg	6(10)* réteg	2 (pars pigmentosa, pars nervosa)
Színlátás	trikromatikus	dikromatikus	dikromatikus/tetrakromatikus
Fovea	van	nincs	nincs
Vérellátás	vaszkuláris	vaszkuláris	avaszkuláris
Pálcikák	1 típus	1 típus	2 (vagy 3)
Csapok	S, M, L	S, M	Szimpla és dupla
Dúcsejtek	16/18 típus	30-40 típus	3+ (5 osztály)
Feldolgozás	Látókéreg	Látókéreg	Tectum opticum

**4. Táblázat: különbségek az ember, a házi egér és a kétéltűek retinájának felépítésében és a látórendszer működésében (Donner és Yovanovich 2020, Grünert és Martin 2020 alapján).**

Bár a dolgozat elsődleges célja a retinális dúcsejtek tranzienciájának vizsgálata, feltételezhetjük, hogy a fenntartott oszcilláció a fényválasz lecsengésének kinetikáját is befolyásolhatja, illetve azzal összefüggésben állhat. A dolgozat eredményei között a sejtek tranziens és fenntartott kettősségének tárgyalása mellett kitérek majd az egér retina dúcsejtjeiből elvezethető szinkronizált oszcillációs aktivitásra, kísérletet téve az oszcillációt meghatározó és a szinkronizációt kialakító tényezők azonosítására.

## **2. Célkitűzések**

Munkánk kezdetekor a retinális neuronhálózat alapvető kapcsolatrendszerei ismertek voltak, az azonban nem volt világos, hogy ezen összetett rendszer működése hogyan befolyásolja a retinális dúcsejtek válaszkinetikáját. Elsődleges célunk a kísérletes munka során tehát a következő kérdéskörök vizsgálata volt:

### ***1. Egy egységes metodológiai megközelítés kidolgozása a tranziencia számszerűsítésére.***

Ezt azért tűztük ki célul, mert úgy éreztük, szükséges egy egységes, objektív keretrendszer az általunk vizsgálni kívánt tranziens és fenntartott válaszok elkülönítésére, amely a dolgozatban leírt kísérletes munka tervezésekor nem állt rendelkezésünkre. Feltételeztük, hogy egy általánosan elfogadott értékelési skála hiánya egyben azt is jelenti, hogy a tudományos közleményekben korábban leírt kvantifikációs módszerek nem bizonyultak kellően megbízhatónak, vagy nem voltak kellően rugalmasak más kísérleti összeállításokba történő átemeléshez.

### ***2. A tranziencia számszerűsítésére létrehozott módszer összehasonlítása a tudományos közleményekben leírt és megemlített egyéb eljárásokkal.***

A korábban publikált metodikai megközelítések és az általunk első körben használni kívánt számítási módszer összehasonlítását azért éreztük szükségesnek, hogy a lehető legpontosabban megismerhessük módszerünk alkalmazhatóságának határait és megbizonyosodjunk létjogosultságáról mind a megbízhatóság, mind pedig a széles körű alkalmazhatóság szempontjából. Hosszú távú terveink között szerepelt a tranziencia számértékekben történő kifejezésének meghonosítása a retinakutatásban, ezért igyekeztünk átfogó jellemzést nyújtani minden lehetséges jelöltről.

### ***3. A retinális dúcsejtek fényválaszának tranzienciáját befolyásoló tényezők vizsgálata.***

Ismert, hogy a retinális dúcsejtek fénystimulusra tranziens vagy fenntartott elektromos aktivitással reagálnak. A tranziens/fenntartott kettősség egy gyakran használt és általánosan elfogadott karakterisztikája a fényválasz jellemzésének (és a dúcsejtek tipizálásának), ugyanakkor egyelőre nem ismert, pontosan milyen tényezők határozzák meg egy tranziens vagy fenntartott fényválasz kialakulását.

***4. Kísérletes bizonyíték gyűjtése arra vonatkozóan, hogy a külső retinális (fotoreceptor-bipoláris sejt szinapsis) kapcsolatok csak elhanyagolható, míg a belső retina szinaptikus kapcsolatai (kémiai és elektromos) meghatározó szerepet töltenek be a változó tranziencia – és ezáltal a tranziens/fenntartott kettősség - kialakításában.***

A témában született korábbi publikációk sokszor ellentmondásos javaslatokat és eredményeket közölnek, ezért a dolgozat kiemelt célja egyértelműen azonosítani azokat a szabályozó mechanizmusokat, amelyek meghatározzák a fényválasz időbeli karakterisztikáját.

***5. A retinális dúcsejtek oszcillatórikus aktivitásának tanulmányozása.***

Kísérletes eredményeink rávilágítottak, hogy a retinális dúcsejtek fényválasza gyakran jellemezhető oszcillációs aktivitással, melynek létezése a szakirodalomban már ismert, mibenléte ugyanakkor még számos tekintetben magyarázatra szorul. Célul tűztük ki tehát, hogy a méréseink során rögzített oszcillációs aktivitást elemezzük, az oszcilláció megjelenését kialakító tényezőket azonosítsuk és bizonyítékot nyerjünk arra vonatkozóan, hogy szinkronizáció mutatható-e ki a retina különböző pontjairól elvezetett oszcillációs aktivitásban.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1 A házi egér, mint kísérleti modell

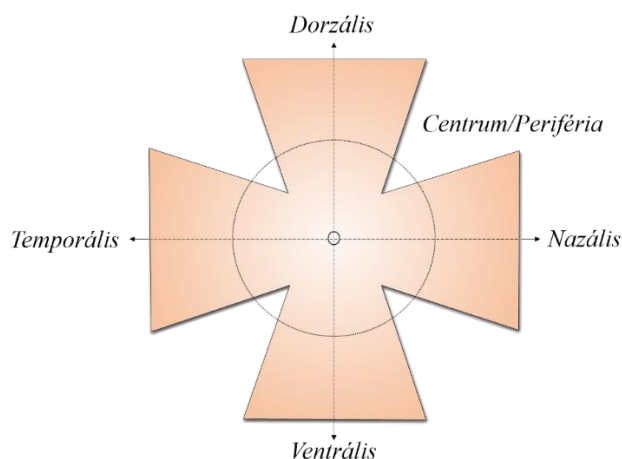
A dolgozatban bemutatott kutatómunka során a C57Bl6 nem-GMO standard laboratóriumi egértörzs egyedeit használtuk fel. Az állatok a The Jackson Laboratory (JAX, Bar Harbor, MA, USA) tenyészetéből származtak, beszerzésük a Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA), mint európai forgalmazó közvetítésével valósult meg. Az állatokat a PTE-SZKK Állatház egérszobájában helyeztük el, tartásuk során ügyeltünk az állatház működési szabályzatának betartására. A szervkivétel céljából felhasználni kívánt állatok ellátmányozása ad libitum történt, egészségügyi állapotukat az állatház személyzetével együttműködve rendszeresen ellenőriztük. A jelen kísérletes munkában részt vevő felnőtt (P20<) egyedek eutanáziája sötétadaptációt követően cervicalis dislocatio formájában zajlott, melyet izofluránnal végrehajtott inhalációs bódítás előzött meg. A szemek eltávolítása előtt az állat állapotát ellenőriztük; a szervkivétel csak az életjelek teljes hiányában kezdődött meg.

A PTE Munkahelyi Állatjóléti Bizottság által kiadott bizonyítvány száma: **PTE/B/105/2015**

Vonatkozó kísérleti engedély száma: **BA/35/51-42/2016** (Dr. Völgyi Béla)

#### 3.2 A retinapreparátum készítése

A retina eltávolítása vörös fényű megvilágítás mellett, oxigenizált emlős ringerben történt, melynek pontos receptjét az 5. táblázat mutatja. Első lépésként apró bemetszést ejtettünk az ínhártya és a szaruhártya határán, majd a szem elülső részét az *ora serrata* mentén sebészi olló segítségével eltávolítottuk. A lencse eltávolítását követően a retinát óvatos mozdulatokkal leválasztottuk az érhártyáról és izoláltuk. A retina felületének egyenletessé tételéhez 4-5 rövid sugárirányú bemetszést ejtettünk a szövet szélétől indítva (lásd 7. ábra). A teljes folyamat sötét szobában, alacsony intenzitású vörös fényel történő megvilágítás mellett zajlott a retina sötétadaptált állapotának megőrzésére.



**7. Ábra: a kész retina preparátum szemléltető rajza.** A preparátumon történő tájékozódás a retina anatómiája (centrális/perifériális) és a látótér tartományai (nazális/ventrális/dorzális/temporális) alapján lehetséges.

<b>Ringer oldat emlős retina perfúziójához</b>	
<b>pH ~ 7,4</b>	Koncentráció (mM/dm <sup>3</sup> )
NaCl	125
KCl	3
CaCl <sub>2</sub>	2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
MgCl <sub>2</sub>	1
NaHCO <sub>3</sub>	25
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> /Glükóz	10

**5. Táblázat: a leírt elektrofiziológiai kísérletekben alkalmazott emlős ringer oldat összetétele.**

### 3.3 Elektromos elvezetések

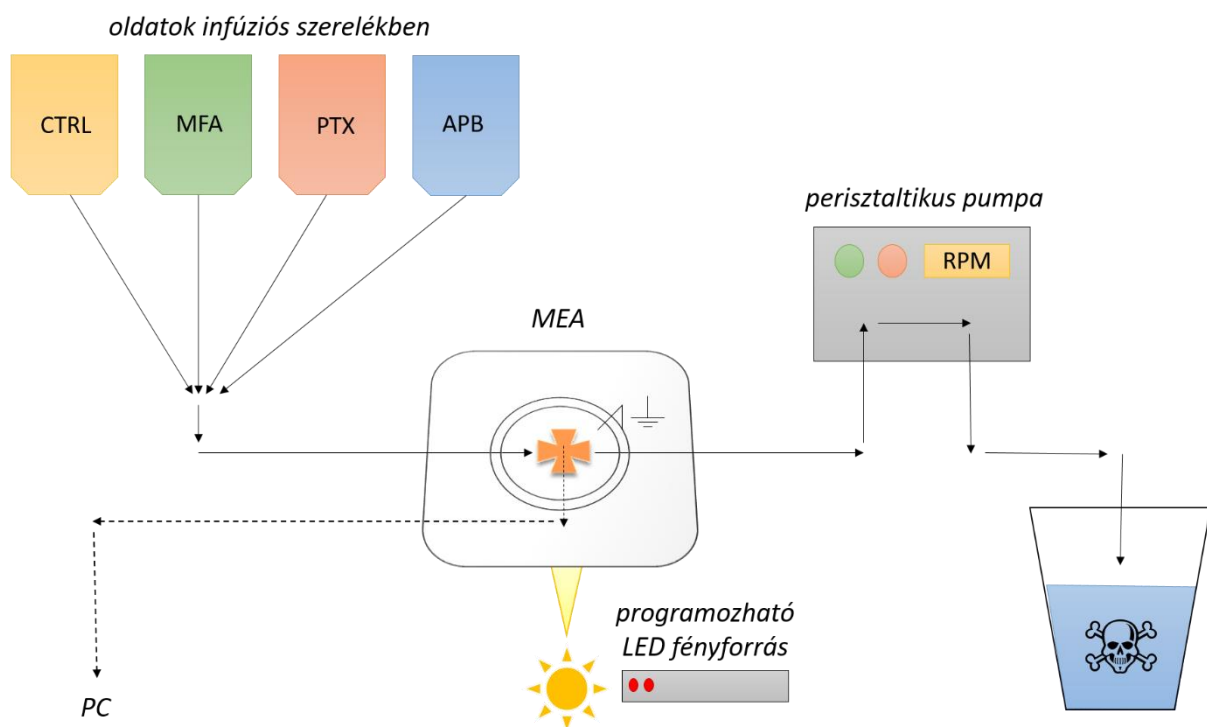
A sejtek elektromos aktivitását a kísérletek egy részében különálló extracelluláris elektródával (szénszálas mikroelektródák, 1M $\Omega$ ; Kation Scientific LCC Minneapolis, MN, USA) vezettük el, majd az off-line analízis előtt digitalizáltuk (Digidata 1440a; Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA). A mintavételezési frekvencia 20kHz volt (Axoscope; Axon Instruments, Foster City, CA). Az egysejtes elvezetések mellett sokelektrodás elvezetéseket is alkalmaztunk (64 és 120 csatornás multi-electrode array, azaz MEA rendszer, MultiChannel



Systems MCS GmbH, Reutlingen, Németország). A MEA elvezetések során az elektromos aktivitás rögzítésére McRack szoftvert (MultiChannel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Németország) használtunk, amely lehetővé tette a sejtek elektromos működéseinek előzetes szűrését és valós időben történő nyomonkövetését.

### 3.4 Alkalmazott fénystimulus és a kísérleti összeállítás

A dúcsejtek stimulálásához zöld ( $\lambda=540\text{nm}$ ) illetve fehér fényű LED fényforrást használtunk. A fényingerlés során 500 ms időtartamú megvilágítási szakaszokat 1500 ms hosszúságú sötét periódus követett. A fényingerléssel kiváltott elektromos aktivitásról készült felvételeket először kontroll körülmények között, ringer oldat perfúziója mellett rögzítettük (8. ábra), majd farmakológiai kezelések esetén (6. táblázat) a perfúziót a megfelelő koncentrációjú, szintén oxigenizált ringerből előállított oldatra cseréltük. Minden esetben felvételeket készítettünk a sejtek spontán aktivitásáról is a fényingerlés bekapcsolása előtt.



**8. Ábra: általános kísérleti elrendezés bemutatása a MEA mérések példáján.** A CTRL feliratú oldat a kontroll mérések során alkalmazott ringert jelöli. PTX=pikrotoxin, MFA=meclofenomc acid, APB=L-2-amino-4-phosphonobutyric acid. A kísérlet során egyszeri átmosás történt, az oldatokat a preparátumról egyenesen egy gyűjtőedénybe vezetünk, melyet a kísérlet befejeztével veszélyes hulladékként kezelünk.

<b>Alkalmazott farmakonok listája</b>				
<b>Teljes név</b>	<b>Rövidítés</b>	<b>Átírat</b>	<b>Hatás</b>	<b>Koncentráció</b>
L-2-amino-4-phosphonobutyric acid	L-AP4, APB		Metabotróp glutamát receptor (III. típus) agonista	50µM
Meclofenamic acid	MFA		Elektromos szinapszisok zárása	50µM
Picrotoxin	PTX	Pikrotoxin	GABA antagonist (GABA-A receptor)	50µM

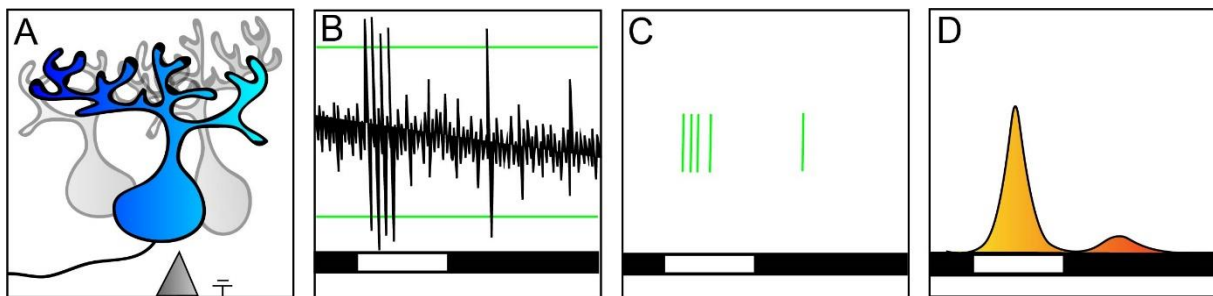
**6. Táblázat: a dolgozatban bemutatott kísérletekben szereplő farmakonok jegyzéke az alkalmazott koncentráció értékekkel.**

A kezelések kiválasztásánál törekedtünk olyan anyagok alkalmazására, melyek a retinakutatásban általánosan ismertek. Az APB (vagy L-AP4) ismert mGluR agonista, amely az ON bipoláris sejteken poszt-szinaptikusan elhelyezkedő mGluR<sub>6</sub> receptorok aktivációjával a sejt hiperpolarizációját és az ON útvonal jeltovábbításának megszűnését váltja ki. Ugyanez a receptortípus jellemző az ON csap és pálcika útvonalatra is, ezért APB hatására alacsony fényintenzitás mellett a sejt fényválaszának ON és OFF komponense egyaránt eltűnik, mivel normál szkotopikus körülmények között egyedül a pálcika ON bipoláris aktív. Ebben az esetben feltételezhető, hogy magas fényintenzitás mellett csak az OFF csap útvonal aktív.

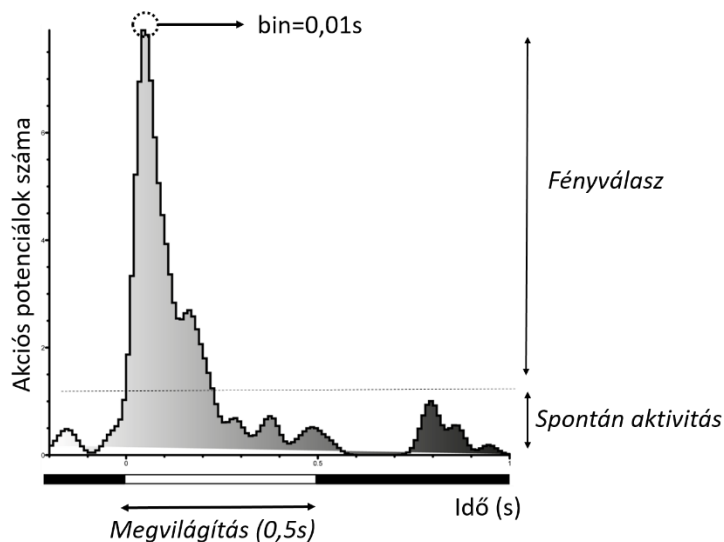
Az elektromos szinapszisok meghatározó szerepe a retinális kód kialakításában ismert (Trenholm és Awtramani 2019), így megalapozottnak éreztük azt a feltételezést, hogy a réskapcsolatok nyitása és zárása szintén befolyásolhatja a dúcsejtek fényválaszának lecsengését. Az eredetileg izületi és izomfájdalomcsillapítoként használt MFA képes a retinális réskapcsolatokat hatékonyan és reverzibilisen zárni (Pan és mtsai. 2007), ezért az elektromos szinapszisok tranzienciára gyakorolt hatásának vizsgálatára alkalmaztuk. A pikrotoxin melyet a GABA-erg transzmisszió blokkolására alkalmaztunk, képes az ionotróp GABA-receptorok klorid csatornáit blokkolni és ezáltal a GABA gátló hatását mérsékelni. Kísérleteinkben a GABA-erg amakrin sejtek által kifejtett inhibíció szelektív gátlását tudtuk megvalósítani vele. A glicinerg amakrin sejtek blokkolása jellemzően sztrichninnel (strychnine) történik a retinakutatásban, a dolgozatban bemutatott kísérletes munka során azonban a vegyületet a kutatócsoport tagjainak személyes szakmai tapasztalataira hagyatkozva elvetettük a kísérleti összeállítás tervezésénél.

### 3.5 Adatelemzés

A kísérlet során a teljes elektromos aktivitást rögzítettük, az akciós potenciálok szűrését utólagosan végeztük el Spike2 (Cambridge Electronics Design Ltd., Cambridge, UK) segítségével, amely lehetőséget biztosít a különböző dúcsejtekből származó, de egy csatornán megjelenő elektromos aktivitás szűrésére is. A tranziencia számításához NeuroExplorer szoftverben (Nex Technologies, Littleton, MA, USA) generáltunk hisztrogramokat (peristimulus-time histogram, PSTH), ahol az x tengely az eltelt időt mutatta ( $t=[s]$ ), az y tengelyen pedig az adott időegység alatt ( $\text{bin}=0,01s$ ) rögzített akciós potenciálok átlagos száma volt leolvasható. A dúcsejtek elektromos aktivitásának analízisét a fent leírt lépéseken keresztül a 9. ábra mutatja be, az elkészült hisztrogram részleteiben a 10. ábrán tekinthető meg. A hisztogram készítésekor a görbe kirajzolásánál Gauss-szűrőt alkalmaztunk, illetve feltüntettük az ingerlés megkezdését megelőző 200ms időtartamot is („peristimulus” hisztrogram; a stimulálást követő és az azt megelőző tetszőleges hosszúságú időtartamot mutatja).



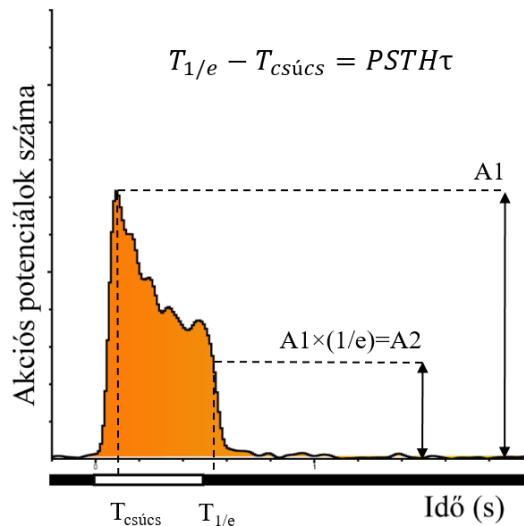
**9. Ábra: a fényválasz elemzésének lépései.** A retinális dúcsejtek elektromos aktivitását extracelluláris elvezetéssel rögzítettük („A” panel). A felvételeken („B” panel) kijelöltük azokat az időpontokat (timestamp), ahol a feszültség meghaladta a küszöbértéket (akciós potenciálok szűrése, „C” panel), majd az egységnyi időtartamra (bin) eső akciós potenciálok számát egy hisztogramon ábrázoltuk. A „B”, „C” és „D” paneleken a fekete alapon fehér téglalap a megvilágítás időtartamát jelöli.



**10. Ábra: példa a tranziencia számítások során alkalmazott PST hisztogramra.** Az akciós potenciálok időegység (bin=10ms) alatt bekövetkezett számát (counts/bin) ábrázoljuk az idő függvényében, az ábra alján elhelyezkedő fekete-fehér sáv a fénystimulus be- (fehér zóna; 0-500ms) és kikapcsolását (fekete) jelzi.

A rögzített fényválaszok időbeli karakterisztikájának jellemzésére az ún. tranzienciát használtuk mérőszámként. A tranziencia, mint megnevezés, egyelőre nem tekinthető általánosan elfogadottnak a szakirodalomban, használatára elvétve találunk példát. A dolgozatban közölt eredmények azonban rávilágítanak, hogy a dúcsejtek szintjén jellemzően használt kétkategóriás megközelítés nem feltétlenül célravezető, így munkánk jelentős részét képezte a tranziens és fenntartott karakterisztikák mérése és számosítása (Ganczer és mtsai. 2017), melynek kvantitatív mutatója a tranziencia értéke lett. A megbízhatóság érdekében minden olyan fényválaszt, mely az analízis részét képezi, manuálisan és egyénileg elemeztünk. Ez egyrészt lehetőséget adott a tranziencia megállapítására használt módszerek átfogó összehasonlítására, másrészt lehetővé tette, hogy az adatelemzés során felmerülő, adott számítási módszerrel fals eredményhez vezető jellegzetességeket is rögzítsük az egyes sejtek egyedi fényválaszát tekintve. A dolgozatban közölt minden olyan eredmény, mely a módszertani összehasonlítást követően kerül leírásra, a  $PSTH\tau$  (a  $\tau$  jelölés a görög ABC-ből kölcsönzi a szimbólumot, ejtsd: tau) számítási módszerével számítottuk ki. Ebben az esetben az alábbi, 11. ábrán bemutatott hisztogram (PSTH) segítségével megállapítottuk a csúcsaktivitás értékét (időegység alatt bekövetkezett akciós potenciálok legmagasabb száma; az ábrán A1, mint első amplitúdó) és bekövetkezésének időpontját (T1), majd kiszámítottuk a csúcsaktivitás értékének  $1/e$ -ad részét. A csúcsaktivitás elérésének időpontja és az  $1/e$ -adra csökkenés között eltelt idő adja meg a tranziencia értékét ( $PSTH\tau$ ) Az „e” az Euler-szám néven is ismert matematikai állandó, melyet a neurobiológiában az időkonstans ( $\tau$ ) megállapításakor

használnak. Fontos megjegyezni, hogy a tranziencia általunk alkalmazott számítása és az időkonstans megállapításának módszere egymással analóg, de nem egyenértékű, éppen ezért a félreértések elkerülése végett a tranziencia tárgyalásakor minden esetben a  $PSTH\tau$  jelzést alkalmazzuk.



**11. Ábra: a  $PSTH\tau$  számításának szemléltető ábrája.** A csúcstartás ( $A1$ ) bekövetkezésének idejétől ( $T1$ ) az amplitudó  $1/e$ -ad részre való csökkenésig ( $A2$ ) eltelt idő ( $T2-T1$ ) adja meg a tranziencia értékét. A tranziens válasz alacsony ( $\sim 50ms$ )  $PSTH\tau$  értékkel rendelkezik, a fenntartott válasz ennek többszöröse lehet (jellemzően  $150ms$  felett) az ingerlés időtartamától függően. A „D” jelzés a fényválasz időkécsését jelzi, mely szintén fontos fiziológiai karakterisztikája a dúcsejt fényválaszának – a dolgozathoz azonban közvetlenül nem kapcsolódik, ezért a későbbiekben csak említészerűen térünk rá ki.

### 3.6 Statisztikai elemzések

A szükséges statisztikai tesztek elvégzésére az IBM SPSS Statistics (IBM, USA, Armonk NY) és az Origin (OriginLab, USA, Northampton MA) szoftvereket használtuk. Adatsoraink normál eloszlást egyetlen esetben sem mutattak, ezért minden esetben nem-parametrikus tesztet használtunk az általunk vizsgált csoportok összehasonlítására (Wilcoxon előjel-teszt, Mann-Whitney-U, másnéven Mann-Whitney-Wilcoxon teszt). Az elvégzett próbák pontos eredményei a Függelékben tekinthetőek meg.

### 3.7 Ábrák és grafikonok

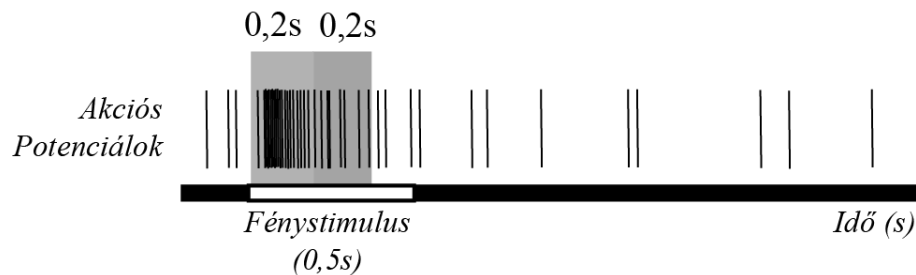
Az elvégzett kísérletes munka dokumentálására és szemléltetésére a következő szoftvereket vettük igénybe: Origin (OriginLab, USA, Northampton MA), Adobe Illustrator (Adobe Inc. USA, San Jose CA) és Microsoft Office termékcsalád (Microsoft Corp. USA, Redmond WA).

## 4. Eredmények

### 4.1 A tranziencia mérése különböző módszerekkel

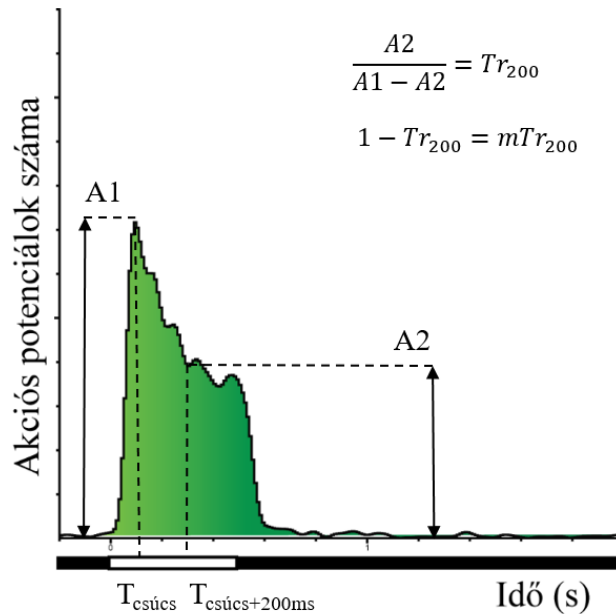
A retina dúcsejtjeinél a fényválasz tranziens vagy fenntartott kinetikáját a sejt által leadott akciós potenciál sorozat lecsengésének (vagy megszűnésének) sebessége határozza meg, így adott dúcsejt kategorizálásához az akciós potenciálok extracelluláris elvezetését elégségesnek ítéltük meg. Munkánk kezdetekor a tranziens/fenntartott karakterisztika mérésére és számítására korábban is tettek kísérleteket (Zeck és Masland 2007, Zhang és mtsai. 2009, Farrow és Masland 2011), azonban egyik módszer sem vált általánossá.

Zhang és munkatársai az ún. fenntartott/tranziens indexet alkalmazták (sustained/transient index, STI; Zhang és mtsai. 2009) amely a fénystimulus első és második felében generált akciós potenciálok átlagfrekvenciájának arányával méri a sejt elektromos aktivitásának csökkenését. Az általuk felállított skálán a 0-hoz közelebb eső értékek jelezték a tranziens, gyorsan lecsengő válaszokat, míg fenntartott válasz esetén a két érték hányadosa egyre növekedve elérhette a maximális 1-et. A módszer egyik hátránya, hogy nem veszi figyelembe az elektromos válasz késését, ez pedig rövidebb idejű megvilágítás (néhány száz ms) esetén jelentős torzításokhoz vezethet a magas latenciával rendelkező sejteknél. Mivel mérési eredményeinkben nagy változatosságot tapasztaltunk a dúcsejtek válaszkésésének tekintetében (Tengölics és mtsai 2019), a módszer alkalmazása előtt a következő módosítást tettük: az első szakaszt minden esetben az adott sejt csúcstartó aktivitását követő 200ms időtartamban állapítottuk meg, a második szakasz pedig az ezt követő 200ms alatt bekövetkezett akciós potenciálokat foglalta magába (módosított STI módszere, mSTI; 12. ábra). Az általunk mSTI-ként jelölt számítási mód így alkalmazhatóvá vált a kísérleti összeállításunkban alkalmazott 500ms megvilágítás mellett rögzített fényválaszokra is, illetve stabil kiindulási pontot nyújtott az ON válaszok mellett az OFF válaszok értékeléséhez. Bár a módszer jól alkalmazhatónak bizonyult a fenntartott válaszok értékelésére, a tranziens válaszokat sok esetben képtelen volt megkülönböztetni egymástól, amikor a második szakaszban nem regisztráltunk akciós potenciálokat. Mindezek alapján úgy tűnhet, hogy a 200ms-os határ ideális lehetne a tranziens/fenntartott válaszok „igen/nem” jellegű elkülönítéséhez, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a hisztogramok tanúsága szerint az egyértelműen tranziens válaszok az 50-100ms értéktartományon belül mozognak, így a 200ms-os tranziens/fenntartott határvonal meghúzása nem tűnt megalapozottnak.



**12. Ábra: a módosított STI (mSTI) számításának szemléltető ábrája.** A fekete alapon fehérrel jelölt vízszintes sáv mutatja a megvilágítás idejét. Az index számításakor a második 0,2s-os periódus alatt bekövetkező akciók potenciálok számát osztjuk el a megvilágítás kezdetétől számított első 0,2s időtartam alatt regisztrált akciók potenciálok számával.

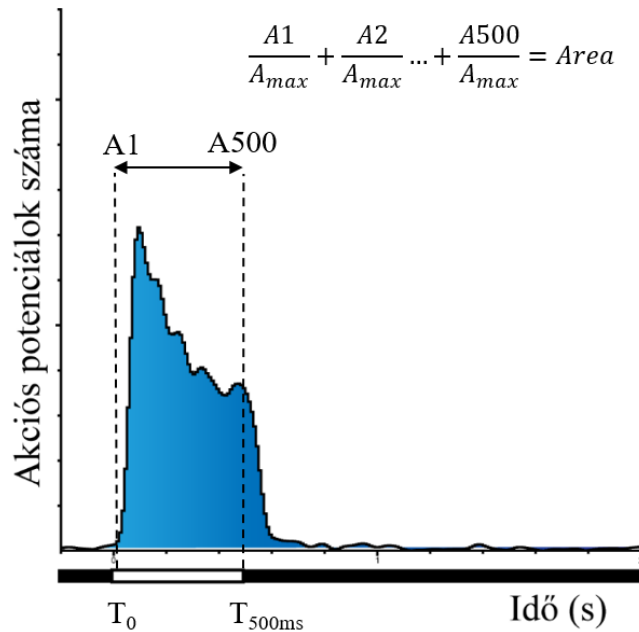
Ugyanez a probléma merült fel, amikor a kutatócsoportunk által megalkotott első számítási módszert alkalmaztuk a kísérletek során rögzített adatokra: esetünkben a csúcshatáshoz képest bekövetkezett változást egy előre meghatározott időpontban vizsgáltuk, amely minden esetben  $T+200\text{ms}$  volt (13. ábra). Az amplitúdó nagymértékű csökkenése tranziens válaszokat jelzett, a tranziencia számítása pedig a következőképp zajlott:  $Tr_{200} = (A1-A2)/A1$ , ahol  $A1$  a csúcshatás hisztogramon jelzett amplitúdója,  $A2$  pedig a csúcshatást követő 200ms leteltekor mért amplitúdó értéke. A mSTI értékelésével ellentétben a  $Tr_{200}$  esetén az 1-hez leginkább közel eső értékek jelölték a tranziens választ adó sejteket, egyértelmű elválást azonban a tranziens és fenntartott populáció között nem tapasztaltunk. A mért értékekben tapasztalt variabilitás arra enged következtetni, hogy a dúcsejtek esetén a fényválasz időbeli lecsengése egy összetett, több különböző ponton szabályozott folyamat eredménye. A  $Tr_{200}$  alkalmazását a későbbiekben elvetettük, mivel nem bizonyult megbízhatónak a hisztogramon megjelenő, de az időbeli lefolyást nem befolyásoló lokális minimum és maximum értékek kiszűrésében.



**13. Ábra: a  $Tr_{200}$  jelzéssel ellátott számítási módszer szemléltető ábrája.** A csúcstartívitás ( $A1$ ) bekövetkezésétől számított 200ms-ot követően ismét leolvastuk az amplitúdó értékét ( $A2$ ), majd a két érték különbségét ( $A1-A2$ ) a csúcstartívitás értékével osztottuk.

A fent leírtakkal szemben lényegesen ígéretesebbnek bizonyult az a Farrow és Masland (2011) által leírt számítási módszer, mely minden esetben a hisztogramon kirajzolt görbe alatti területet veszi figyelembe a tranziencia meghatározásához (14. ábra). A területszámítás jól kezeli az egyéni különbségeket, ugyanakkor lényeges eltéréseket okozhat kísérletenként a számítás kezdeteként megjelölt kezdőpont és a végpont megválasztása: a dúcsejtek eltérő válaszkésése lényegesen befolyásolhatja az eredményeket, ha az ON válaszok területszámítását a fény bekapcsolásától a kikapcsolásáig végezzük el.





**14. Ábra:** a tranziencia megállapítása a görbe alatti terület megadásával. Az értékek normalizálását követően a fény bekapcsolásától a kikapcsolásig eltelt 500ms alatt kirajzolt terület nagysága adja meg a tranziencia értékét.

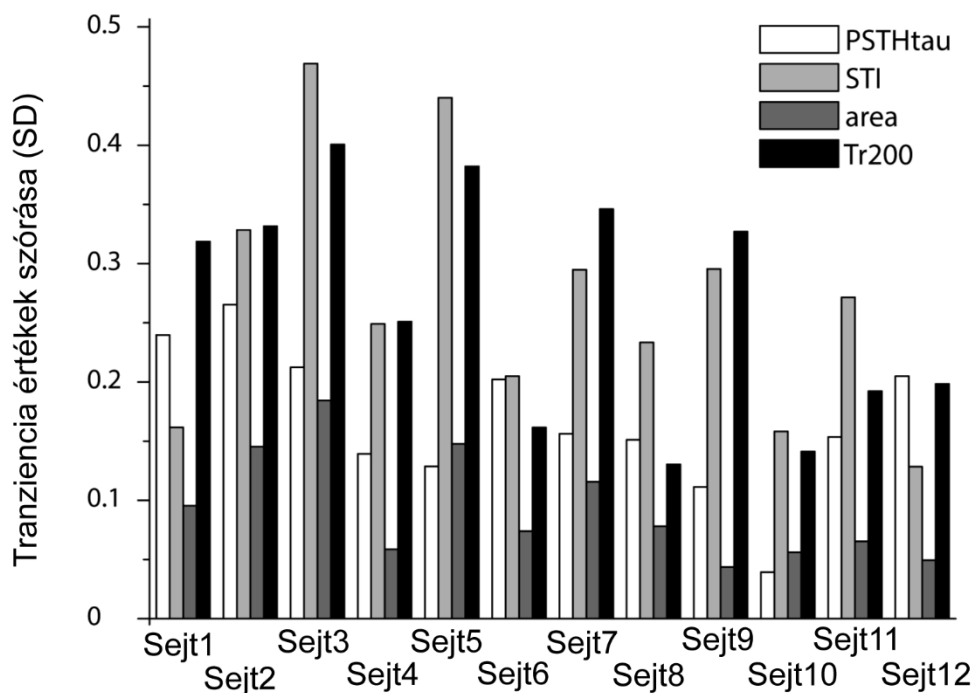
Próbára tettünk egy negyedik megközelítést is ( $PSTH\tau$ , lásd: 3.5 alfejezet) mely egy Zeck és Masland (Zeck és Masland 2007) által korábban publikált számítási módszerhez hasonló. Az akciós potenciálok rögzítő felvételből ebben az esetben is egy hisztogram készül (PSTH), amely az időskálán az általunk megadott beosztás szerint jeleníti meg az adott időtartamra eső (bin=10 ms) akciós potenciálok átlagos számát (11. ábra). A tranzienciát az az érték adja meg az idő tengelyen, ahol az adott sejt elektromos aktivitása a csúcsaktivitás 1/e-ad részére csökken.

#### 4.2 A tranzienciát mérő módszerek szórásának összehasonlítása

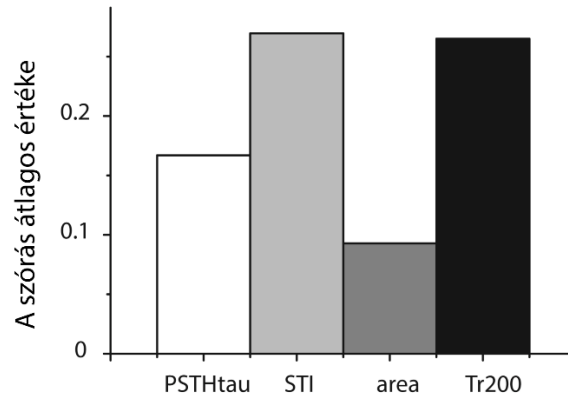
Ahhoz, hogy a négy fent leírt módszert megfelelően össze tudjuk hasonlítani, további módosításokat kellett bevezetnünk a  $Tr_{200}$  értékek számítása esetén: mivel a három másik általunk tesztelt skálán a tranziens választ a 0-hoz közelebb eső értékek jelölik, ezért az egyértelműség és a könnyebb összehasonlítás kedvéért a  $Tr_{200}$  értékeket tartalmazó adatsort a következőképp transzformáltuk: végleges tranziencia =  $1 - Tr_{200}$ .

Az összehasonlításhoz 12 példasejtet alapul véve mind a négy módszerrel kiszámítottuk a 6 egymást követő stimulusra adott válasz tranzienciáját és az ezekhez társuló szórás értékét (16. ábra). Ideális esetben az egyes módszerek hasonló eredményt szolgáltatott volna, ebben az esetben lehetőségünk lett volna kijelenteni, hogy a korábban leírt és bemutatott négy megközelítés az egér retina dúcsejtjeit tekintve a tranziencia mérésére egyaránt alkalmas. Ezzel

szemben azonban mind az mSTI, mind pedig a  $Tr_{200}$  módszerek rendkívül ingadozónak bizonyultak, így ezek használatát teljes mértékben elvetettük a későbbiekre vonatkozóan. Bár a legkisebb átlagos szórást a területszámítási módszer adta (lásd 17. ábra), választásunk a további kísérletes munka során mégis a PSTHt számítására esett, ezért a továbbiakban közölt tranziencia értékek minden esetben ezzel a módszerrel kerültek kiszámításra. Az időskála felbontását 10, 20 és 30ms-os tartományokban teszteltük. A 10ms-ot meghaladó felbontás esetén a tranziens válaszok jelentős hátrányba kerülnek a fenntartott válaszokkal szemben, így az általunk alkalmazott felosztást a későbbiekben is 10ms-os egységekben szabtuk meg.



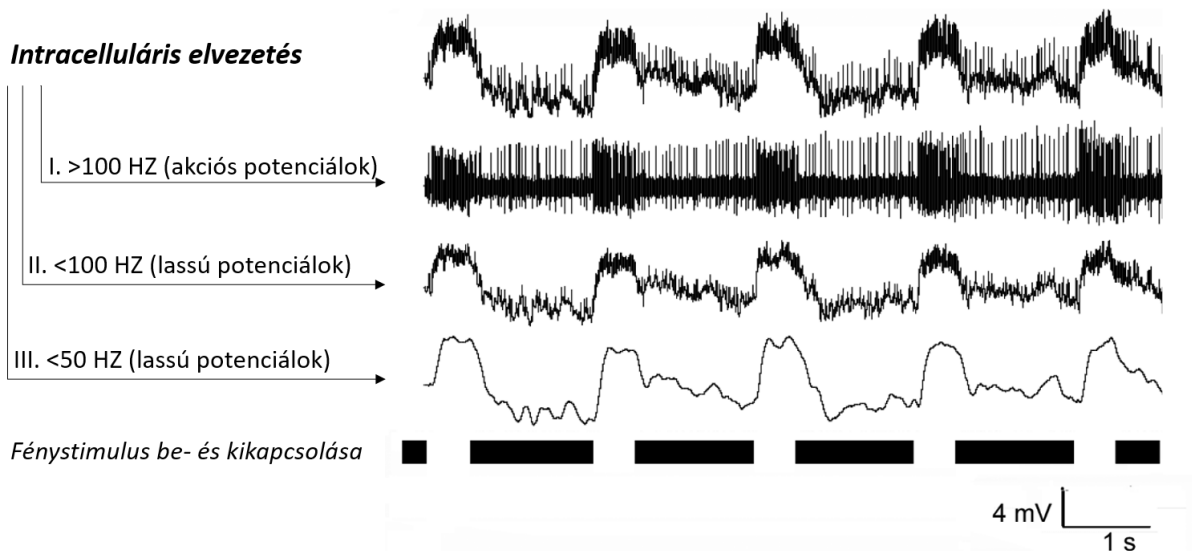
**16. Ábra:** a dolgozatban vizsgált négy számítási módszer (mSTI,  $Tr_{200}$ , területszámítás és a PSTH $\tau$ ) szórásának összehasonlítása. A szórás számításához ugyanazon sejten hatszor végeztünk fényingerlést, majd kiszámítottuk a fényválaszok egyéni tranziencia értékeit és a szórást mind a négy módszer esetén megadtuk. A legkisebb szórás értékeket jellemzően a PSTH $\tau$  és területszámítási módszerek adták.



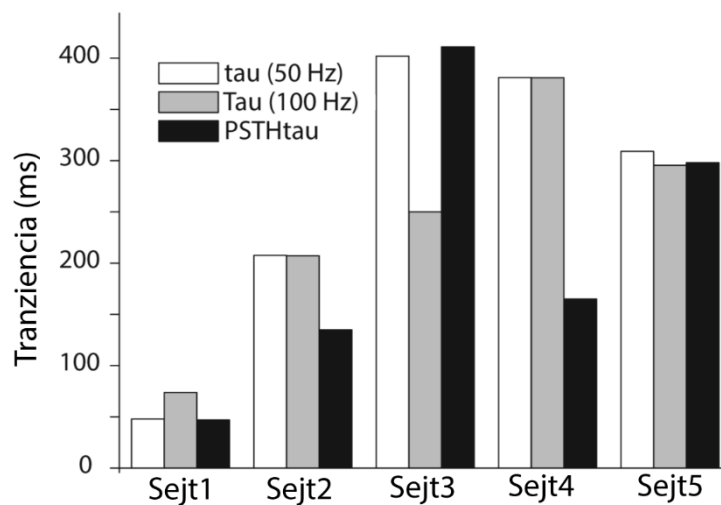
*17. Ábra: ismétlődő fényingerlés esetén mért egyéni tranziencia értékek összehasonlítása a 4 bemutatott módszer esetén. Bár a legalacsonyabb szórást az általunk preferált PSTHτ módszer produkálta, egyszerű kezelhetőségének és gyors alkalmazhatóságának köszönhetően előnyösebbnek érezzük a területszámítási megközelítésnél.*

### 4.3 PSTH $\tau$ összehasonlítása az időkonstanssal

5 példasejt esetén az extracelluláris elvezetések mellett intracelluláris elvezetést is alkalmaztunk a dúcsejtek fényválaszának regisztrálásánál, hogy a lassú potenciálokra mért időkonstans ( $\tau$ ) értékét összehasonlíthassuk az általunk számolt PSTH $\tau$ -val (full-field megvilágítás,  $\lambda = 480$ ;  $I = 5000$  Rh/rod/sec). A kísérlet háttérében a következő indoklás állt: a tranziens/fenntartott kettőség a bipoláris sejtek szintjén is nyomon követhető (Borghuis és mtsai. 2014; Lindstrom és mtsai. 2014) és akár dúcsejtek tranzienciájának meghatározásában is szerepet játszhat, ugyanakkor esetükben nem mérhetünk akciós potenciálokat, tehát a PSTH $\tau$  módszer alkalmazása a bipoláris sejt tranziencia számítására értelmetlen lenne. Jövőbeli lehetséges összehasonlítás céljából tehát fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy a  $\tau$  és PSTH $\tau$  értékek összehasonlíthatóak lennének-e egymással: a lassú potenciálok szűréséhez a dúcsejtekből elvezetett felvételeken 50Hz illetve 100Hz „aluláteresztő” (lowpass) filtert alkalmaztunk (18. ábra), lehetővé téve az adott válaszra jellemző egyéni és átlagolt időkonstans kiszámítását. Az így kapott lassú potenciálokra vonatkoztatott  $\tau$  és az akciós potenciál sorozatokra („felüláteresztő”, highpass szűrővel nyerve) számolt PSTH $\tau$  értékek összehasonlítását a 19. ábra mutatja. Az adatelemzés során felfigyeltünk arra a jelenségre, hogy a válasz késésében különbséget tapasztaltunk a lassú potenciálokra mért értékek és a PST hisztogram között, amely arra utal, hogy a sejt már a lassú potenciál felszálló szára alatt elérte az akciós potenciálok csúcshézfekvenciáját. Megjegyzendő, hogy ezen megfigyelés tisztázása a későbbiekben további kísérletes munkát igényel, jelen dolgozatban csupán érdekességként és említés szintjén szerepel.



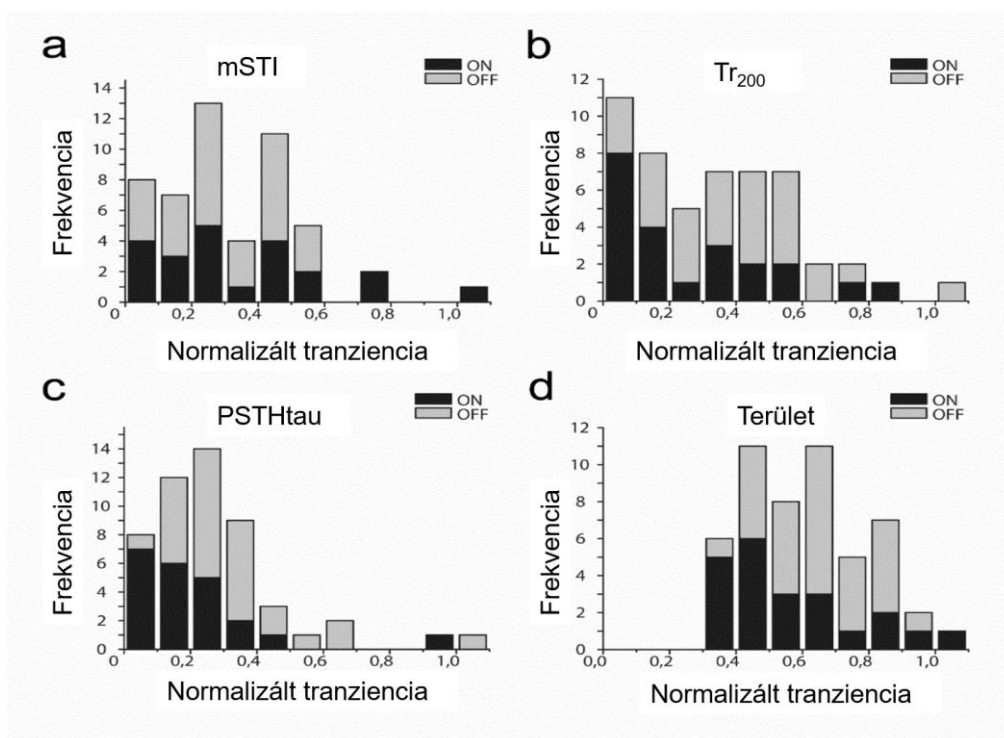
**18. Ábra:** Az intracelluláris elvezetéseken alkalmazott módosítások szemléltető rajza. A felső sorban egy intracelluláris elvezetéssel készült felvétel látható, melyből egyaránt kinyerhetőek az adott dúcsejt által generált akciós (középen; >100Hz felüláteresztő vagy high-pass filter alkalmazása) és a lassú potenciálok (alul; <50Hz és <100Hz aluláteresztő vagy low-pass filter alkalmazása). A legalsó sorban húzódó váltakozó fehér és fekete sávok a fényingerlések idejét (fehér sáv) és a köztük sötétben eltelt időt (fekete sáv) jelzik.



**19. Ábra:** Lassú potenciálok  $\tau$  értékek összehasonlítása a PSTH $\tau$  értékeivel. A  $\tau$  számításánál két különböző aluláteresztő szűrőt (<50Hz és <100Hz) is alkalmaztunk.

#### 4.4 Tranziens és fenntartott válaszok kategorizálása

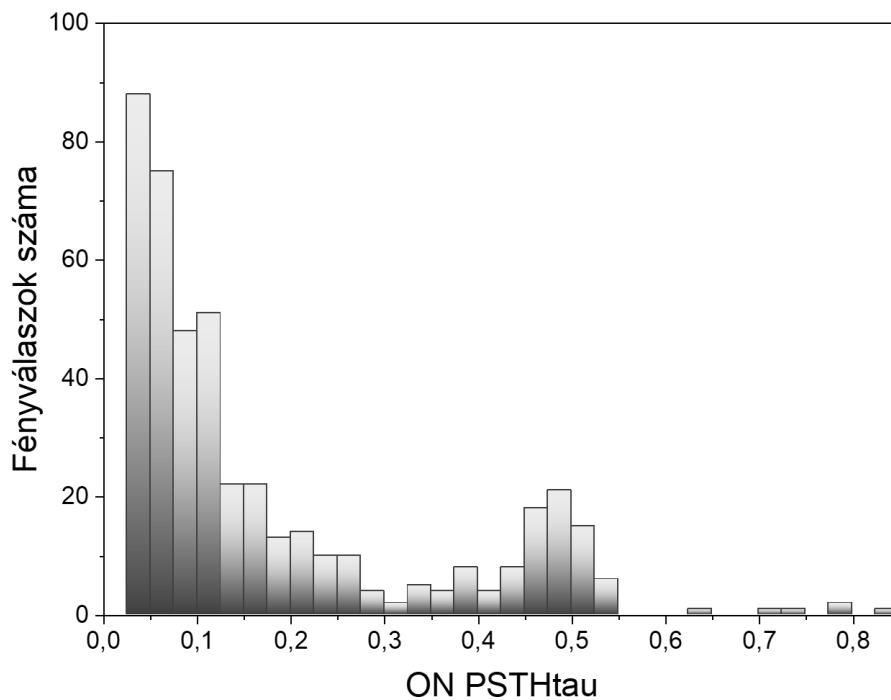
Fontos kritériumnak tartottuk a megfelelő módszer kiválasztásánál, hogy mennyire hatékonyan reprezentálja az általunk vizsgálni kívánt tranziens/fenntartott kettősséget. A négy különböző megközelítést összehasonlítva (n=51 fényválasz mind a négy módszerrel megadott tranziencia értéke) azonban azt tapasztaltuk, hogy egyik sem választja el egymástól megbízhatóan a tranziens és fenntartott válaszokkal operáló sejtek populációját (20. ábra). Éles elválást – a várakozásokkal ellentétben – nem tapasztaltunk a tranziens és fenntartott válaszok között, egy lehetséges válaszvonal meghúzása minden esetben önkényesnek tűnt inkább, mintsem valóban reprezentatívnak. Mind a négy összehasonlított módszer esetében egy viszonylag széles és folyamatos értéktartományt kaptunk a tranziencia lehetséges értékeire vonatkozóan, amely lényegesen megnehezíti a vizsgált fényválasz megfelelő, megbízható és reprodukálható besorolását a tranziens vagy fenntartott kategóriák egyikébe.



20. Ábra: a 4 különböző számítási módszerrel kapott tranziencia értékek eloszlási hisztogramja.

#### 4.5 Variabilitás a retinális dúcsejtek ON és OFF kinetikájában

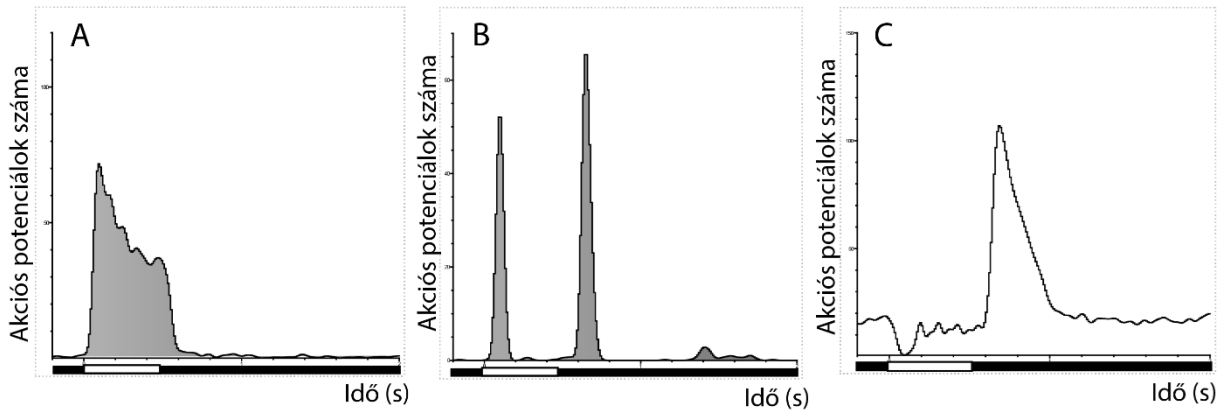
Az mGluR<sub>6</sub> tranziencia meghatározásában játszott szerepének megállapításához ON dúcsejtek elektromos aktivitását vezettük el egyelektródás extracelluláris elvezetésekkel, illetve 64 és 128 csatornás MEA technikát alkalmazva. A megvilágítás módja full-field volt, tehát a fénystimulus a retina egészét és nem csak meghatározott részeit érintette. Az elvezetett akciós potenciálokról a PSTH $\tau$  módszernél ismertetett módon (9. és 11. ábra) hisztogramot készítettünk, amely lehetővé tette a PSTH $\tau$  kiszámítását.



**21. Ábra:** a tranziencia értékének eloszlása ON válaszok esetén. A vízszintes tengely 25ms-os tartományonként ábrázolja a mérések során regisztrálható PSTH $\tau$  értékeket, míg a függőleges tengelyen az adott tartományba eső mérési értékek száma látható.

Az első két fontos megfigyelés, amelyet az ON válaszok kinetikájáról közölnünk kell, az a széles lefedett skála és a nagyfokú változatosság a tranziencia számított értékében (21. ábra). A kapott PSTH $\tau$  értékek széles határok között mozogtak (40ms – 800ms), dacára az mGluR<sub>6</sub> egyeduralkodó szerepének a fotoreceptor – ON bipoláris jelátvitelben. Amellett, hogy a tranziencia-skála két ellenpontja mennyire távol esik egymástól, szintén fontos megjegyeznünk, hogy a tranziens és fenntartott fényválaszok két jellegzetes csoportja nem különül el egymástól a mérési eredményeinkben. A kapott tranziencia értékek lényegében a skála bármely pontjára eshetnek, kirajzolva ezzel egy „átmeneti” csoportot (PSTH $\tau$  100-200ms között), amely nem sorolható egyértelműen egyik korábban leírt tartományba sem: ahhoz, hogy

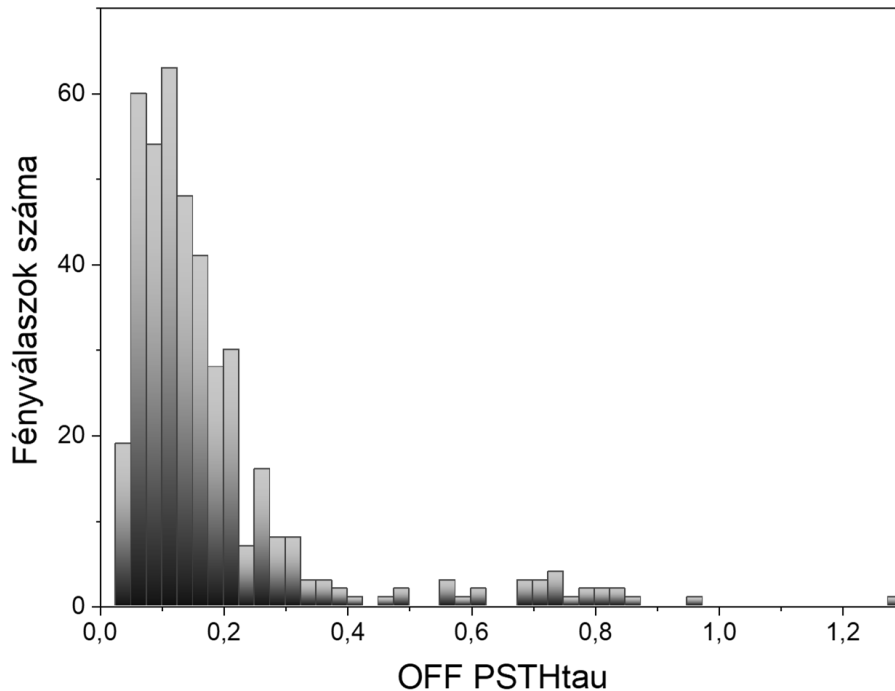
tranziensnek tekintjük, túlságosan elnyújtott, ugyanakkor a hisztogramon kirajzolt görbe nem követi a jellegzetes plató fázist sem, amelyet egy fenntartott válasz esetén várnánk (22. ábra). A kiugróan magas tranziencia ( $>0,5s$ ) értékeket olyan esetben tapasztalhatjuk, amikor a sejt viszonylag erős spontán elektromos aktivitásának köszönhetően a csúcspont huzamos ideig nem csökken az  $1/e$ -ad rész alá.



**22. Ábra: példa a fenntartott (A), tranziens (B) és átmeneti (C) kategóriába sorolható válaszokra. A megvilágítás idejét (500ms) fekete alapon fehér négyzetek jelzik.**

Érdeemesnek tartottuk az OFF válaszok tranzienciáját is feltérképezni, hiszen esetükben két, hasonló elven, de mégis különböző kinetikával működő (deVries 2000) ionotróp glutamát receptort találunk a poszt-szinaptikus oldalon: az OFF bipoláris sejtek membránjában egyaránt helyet foglalnak AMPA és kainát receptorok, ez a kettősség pedig elméleti szinten akár magyarázhatná az elkülönülő tranziens és fenntartott fényválaszok kialakulását OFF sejtekben. Az OFF válaszok szintjén tapasztalt variabilitás feltárására szintén fotopikus intenzitású, full-field tartományba eső megvilágítás mellett mértük dűcsejtek fényválaszát egyelektródás elvezetésekkel és 64 illetve 128 csatornás MEA rendszert alkalmazva. Ki kell jelentenünk azonban, hogy az OFF válaszok tranzienciáját tekintve szintén nem találtunk egyértelmű csoportosulást a skála két diszkrét pontja között: az OFF válaszok esetén sem tudunk egyértelmű határt húzni a tranziens és fenntartott válaszok közé (23. ábra). Elegáns és kézenfekvő megoldás lenne, ha az átmeneti tartomány megjelenését az AMPA és a kainát receptorok eltérő keveredési arányával magyarázhatnánk, ez azonban sajnos továbbra sem világítana rá az ON válaszok eloszlásában tapasztalt hasonlóan széles spektrum (21. ábra) kialakulásának okára.





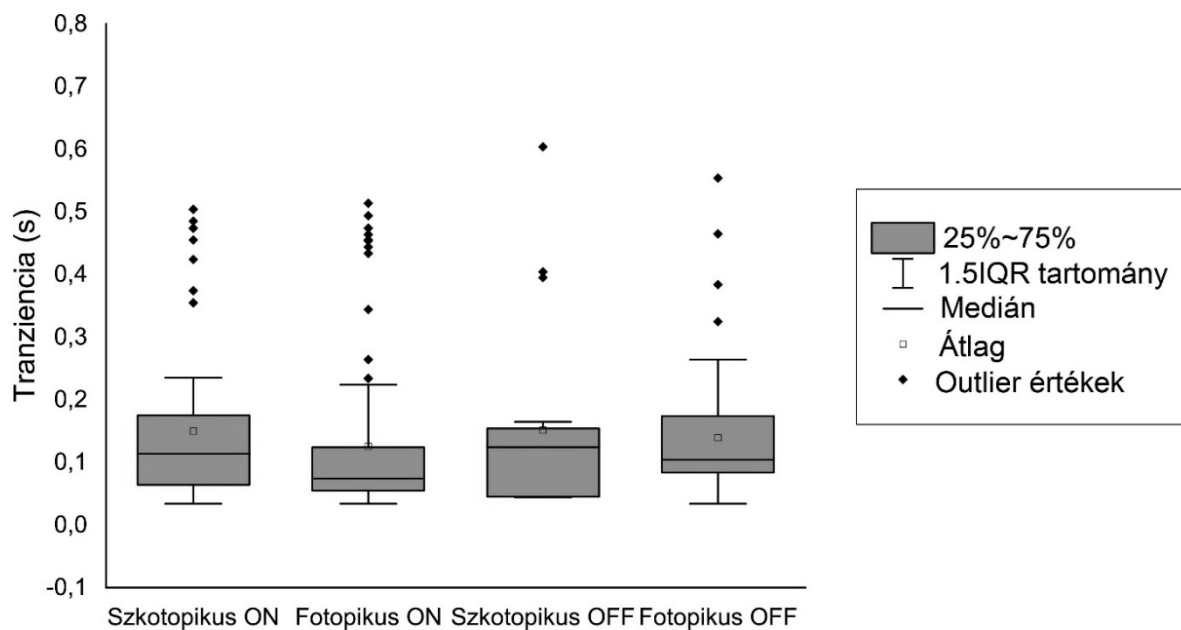
**23. Ábra: a tranziencia értékének eloszlása OFF válaszok esetén.** A vízszintes tengely 50ms-os tartományonként ábrázolja a mérések során regisztrálható PSTH $\tau$  értékeket, míg a függőleges tengelyen az adott tartományba eső mérési értékek száma látható.

Ahogy azt a 23. ábrán bemutatott eloszlási hisztogram is szemlélteti, a korábban említett, tranziens és fenntartott válaszok között átmenetet képező válaszkinetika az OFF válaszok esetén is jelen van és a regisztrált OFF válaszok jelentős részét adja (23. ábra 100-200ms tartománya PSTH $\tau$  tartománya). Az ON és az OFF válaszok tranzienciáját összehasonlítva azonban ki kell jelentenünk, hogy a két adatsor statisztikailag szignifikánsan különbözik (Mann-Whitney-U teszt,  $p < 0,05$  szignifikancia szint esetén): a tranziencia értékei hasonló értéktartományt ölelnek fel, ugyanakkor eltérő eloszlást mutatnak a skála különböző pontjain. A hisztogramok elemzése alapján továbbá lehetségesnek ítéljük egy harmadik, köztes kategória közbeiktatását, amelyet az egyszerűség kedvéért a dolgozatban átmeneti vagy köztes néven említünk, utalva a fenntartott és tranziens karakterisztika közötti elhelyezkedésére.

#### 4.6 A tranziencia alakulása szkotopikus körülmények között

Míg fotopikus körülmények között a vizuális információ a csap útvonalak segítségével egyszerre több párhuzamos csatornán halad, addig szkotopikus fényintenzitás mellett csak az elsődleges és a másodlagos pálcika útvonal aktív. Tekintve, hogy az elsődleges útvonal csak egyetlen bipoláris sejt, a pálcika ON bipoláris közbeiktatásával működik, feltételezhetjük, hogy a bipoláris sejtípusok közötti egyéni intracelluláris különbségek kiiktatásával a dúcsejtek

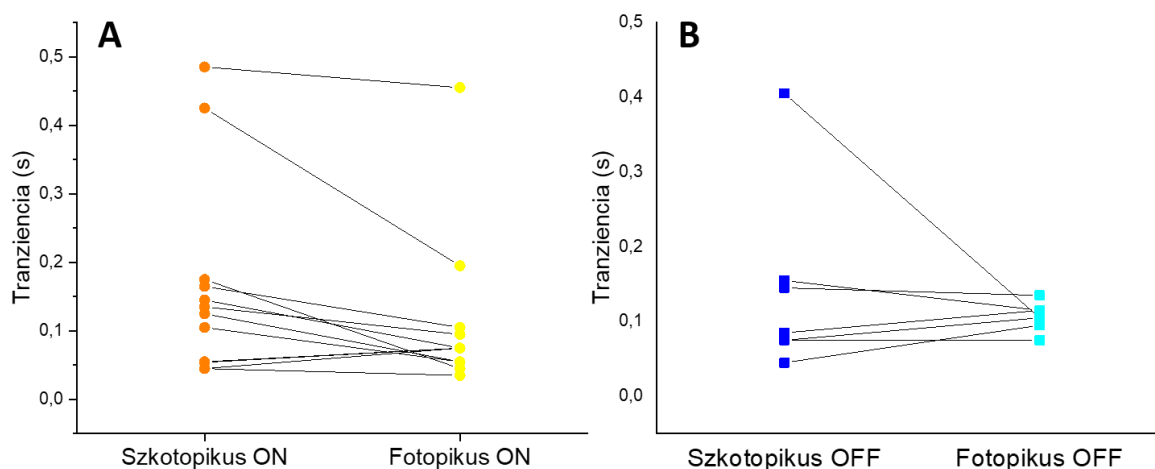
szintjén kifejeződő tranziencia variabilitása is csökken. A következő kísérleti elrendezésben a szkotopikus és fotopikus pályák közötti váltás mellett rögzítettük a dúcsejtek fényválaszait, majd az eltérő intenzitású megvilágítási körülmények között kiszámított tranziencia értékeket hasonlítottuk össze. Arra számítottunk, hogy ha a különböző bipoláris sejtek azok, amelyek a tranziencia értékét egyértelműen megszabják, akkor a stimulus változtatásakor (szkotopikus – fotopikus váltás) legalább a dúcsejtek egy jelentős részénél (vagy akár minden vizsgált dúcsejtnél) érdemleges változás lesz megfigyelhető a fényválasz lecsengésében. A hipotézis teszteléséhez először szkotopikus ( $I < 0.1 \text{ Rh}^*/\text{rod/s}$ ), majd fotopikus ( $I > 100 \text{ Rh}^*/\text{rod/s}$ ) körülmények között vezettük el ugyanazon retinális dúcsejt elektromos aktivitását. Mindkét esetben full-field megvilágítást alkalmaztunk. A szkotopikus és fotopikus fényviszonyok mellett rögzített tranziencia értékeket csoportonként lebontva a 24. ábra és a 7. táblázat szemlélteti, illetve az egymással párhuzamba állított válaszokat ON és OFF válaszokat külön ábrázolva a 25. ábra mutatja. A két tartomány között a legszembetűnőbb különbség a szkotopikus fényválaszok nagyobb késéssel történő megjelenése volt. A tranziencia változásában szignifikáns különbséget ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon előjelteszt) tudunk kimutatni az ON válaszok esetén a fényinger intenzitásának változásával, ugyanakkor az OFF válaszokat vizsgálva a szkotopikus és fotopikus adatsor nem mutatkozott egymástól statisztikailag eltérőnek.



**24.Ábra:** a tranziencia értékének alakulása ON és OFF fényválaszok esetén alacsony (szkotopikus) és magas (fotopikus) fényintenzitású megvilágítás mellett.

	ON tranziencia (s)		OFF tranziencia (s)	
	Szkotopikus	Fotopikus	Szkotopikus	Fotopikus
Átlag	0,15	0,125	0,15	0,14
Medián	0,115	0,075	0,125	0,105
Minimum	0,035	0,035	0,045	0,035
Maximum	0,505	0,515	0,605	0,555

7. Táblázat: ON és OFF fényválaszok tranzienciája alacsony intenzitású (szkotopikus) és magas intenzitású (fotopikus) fényingerlést követően.

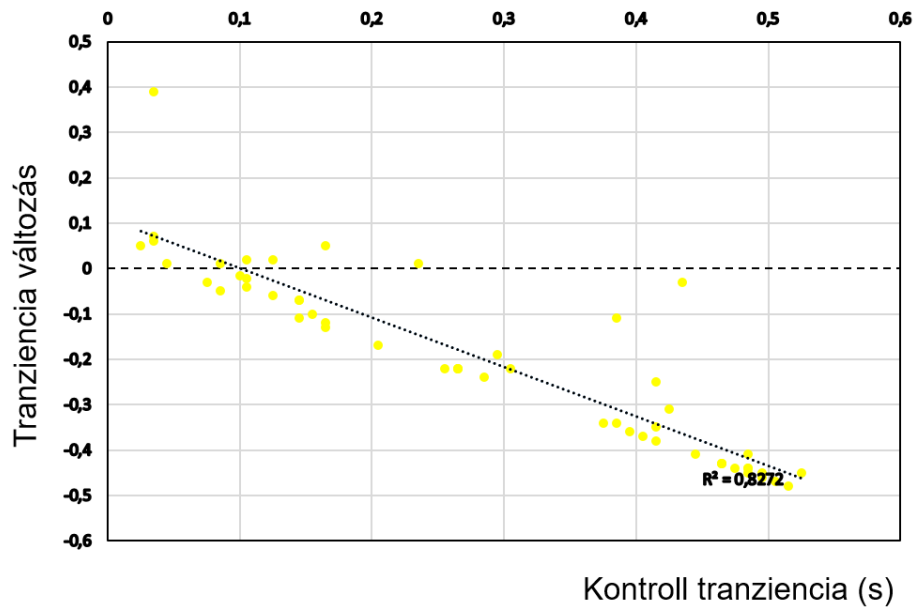


25. Ábra: A tranziencia változása ugyanazon dűcsejten szkotopikus és fotopikus ingerlési paraméterek mellett ON (n=12) és OFF (n=7) válaszok esetén.

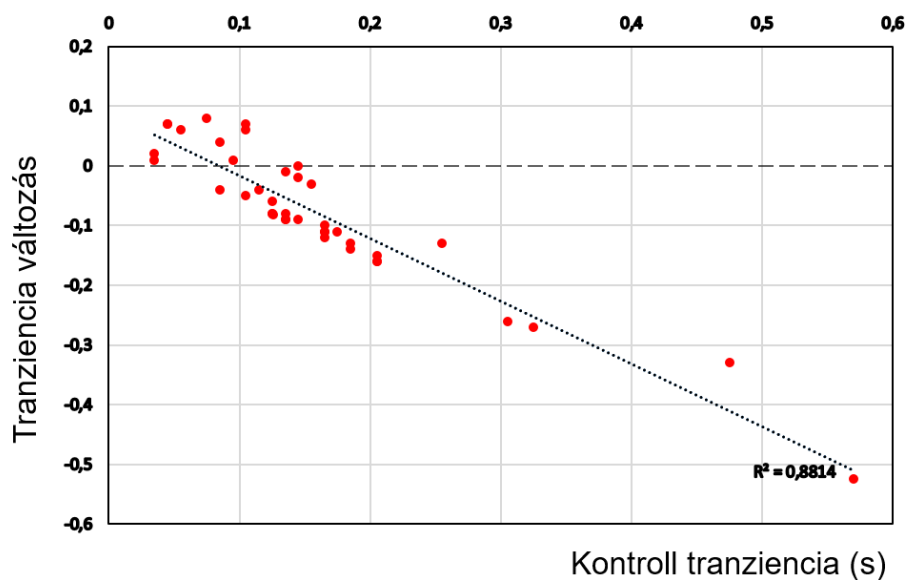
#### 4.7 Tranziencia és laterális szignalizáció

A tranziencia eredetének feltárására tett törekvéseink következő lépéseként a belső retina szinaptikus kapcsolatait vettük célba. Az amakrin sejtek által kifejtett GABA-erg inhibíció szelektív blokkolására a GABA (jellemzően GABA<sub>A</sub>) antagonistaként viselkedő pikrotixint alkalmaztunk, melyet már az 1960-as évek óta használnak retinakutatásban (Ames és Pollen 1969). Feltételeztük, hogy az amakrin sejtjei szintjén megnyilvánuló finomhangoló szabályozó hatás lehet az, mely az általunk tapasztalt széles tranziencia skálát képes lehet kialakítani a retinális dűcsejtekben. A kezelés előtti és utáni PSTH $\tau$  értékeket összehasonlítva (26. és 27. ábra) kijelenthetjük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a két adatsor között (Wilcoxon előjelteszt,  $p < 0,05$ ; a statisztikai tesztek eredményéről bővebb információ található a függelékben), vagyis a GABA-erg inhibíció farmakológia blokkolása képes a tranziencia számított értékét jelentősen megváltoztatni, amely a fényválaszok kinetikáját tekintve akár a

fenntartott válasz egyértelműen tranzienssé válását is eredményezheti. Mivel az adott fényválaszra vonatkoztatott hisztogramokat egyesével elemeztük, sikerült rögzítenünk olyan jellegzetes változásokat a dűcsejtek elektromos aktivitásában, amely bővebb információt szolgáltat a tranziens/fenntartott kettőség kialakulásáról.

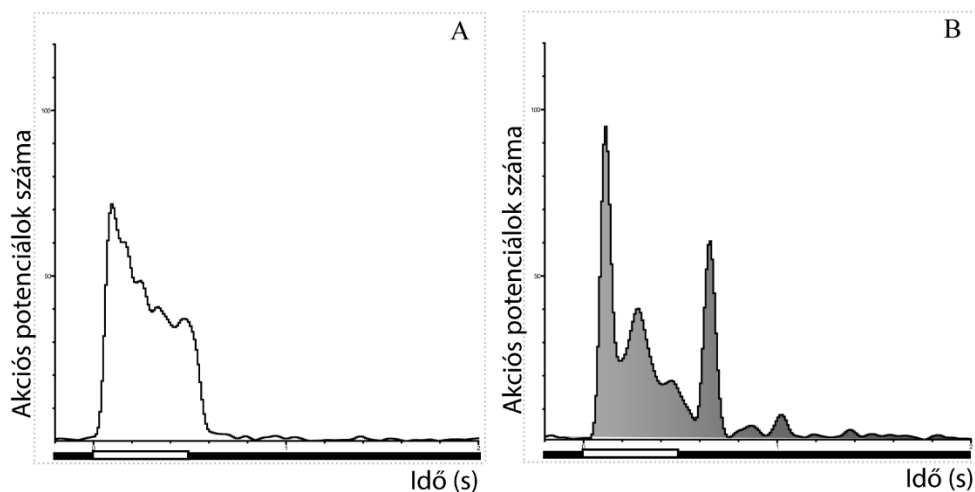


**26. Ábra: ON válaszok tranzienciájának változása PTX kezelés hatására.** Azokat a fényválaszokat, ahol a kezelés eredményezte gyors ON inhibíció megbízhatatlanná teszi a PSTHr alkalmazását, a fenti grafikonon nem ábrázoltuk.



**27. Ábra: PTX hatása a fényválasz OFF komponensére.**

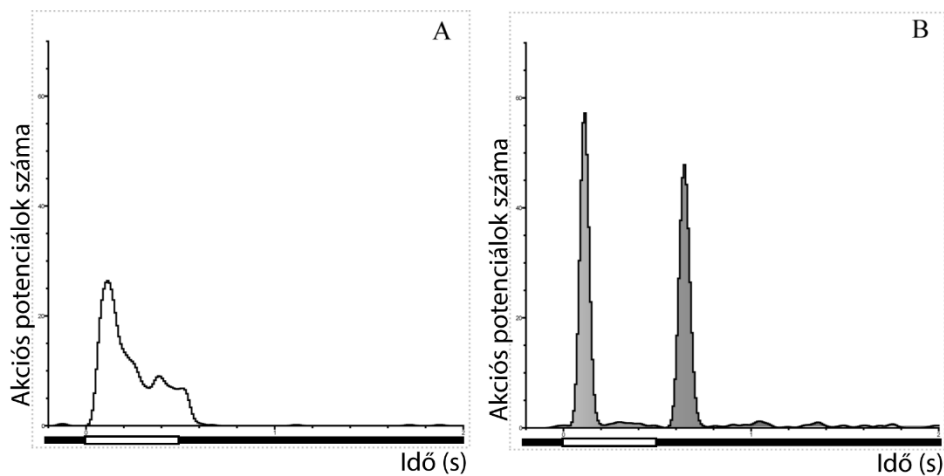
A hisztogramok elkészítésekor általános észrevételünk volt, hogy a GABA-erg transzmisszó blokkolása gyakran eredményezte az akciós potenciálok számának csúcserőtelét követő gyors, ideiglenes visszaesését, melyet a PSTH $\tau$  módszer a tranziencia egyértelmű csökkenéseként érzékel. Egy hasonló, a PSTH $\tau$  számítási módszert megtéveszteni képes fényválaszt a 28. ábra mutat be. Az adatok analízise során ezeket az eseteket külön kezeltük, hogy ne szolgáltassanak félrevezető eredmények fals fenntartotról tranziensre történő átkapcsolásról. Mindezekről eltekintve azonban általánosan elmondhatjuk, hogy a PTX kezelés a hisztogramon megjelenő csúcs elkeskenyedését eredményezte a detektált akciós potenciálok csúcstartó aktivitást követő gyors csökkenésével (28. és 29. ábra), amely egy kontrol körülmények között inaktív inhibíciós mechanizmus érvényre jutását feltételezi a széleskörű GABA-erg blokkád hatására. Ugyanezen sejtek esetében tapasztaltuk továbbá az egységnyi időre jutó akciós potenciálok számának növekedését és ezáltal a hisztogramon megjelenő aktivitási csúcsok amplitúdójának emelkedését (29. ábra).



**28. Ábra:** PTX hatására megjelenő gyors ON inhibíció és egy korábban nem mérhető OFF komponens megjelenése. Mindkét jelenség általánosan megfigyelhető a PTX kezelés eredményeképp.

Fontos megjegyeznünk továbbá, hogy a PTX kezelés nem csak a kontrol körülmények között megnyilvánuló és rögzített fényválaszokat érintette: számos esetben tapasztaltuk egy (kontroll körülmények között nem mérhető) OFF komponens megjelenését (29. ábra). Ezen OFF válaszok a kezelést követő felvételeken az ON komponenshez hasonló, bizonyos esetekben az ON válasz csúcstartó aktivitását is meghaladó intenzitással jelentkeznek rendkívül alacsony (valódi tranziens válaszokra jellemző) PSTH $\tau$  értékekkel. Esetükben nem figyelhető meg a korábban leírt, PTX kezelés után tapasztalt és elsősorban ON válaszokra jellemző gyors

inhibíciót követő újból emelkedő tüzelési aktivitás, az új OFF komponens tehát valóban tranziensnek tekinthető.

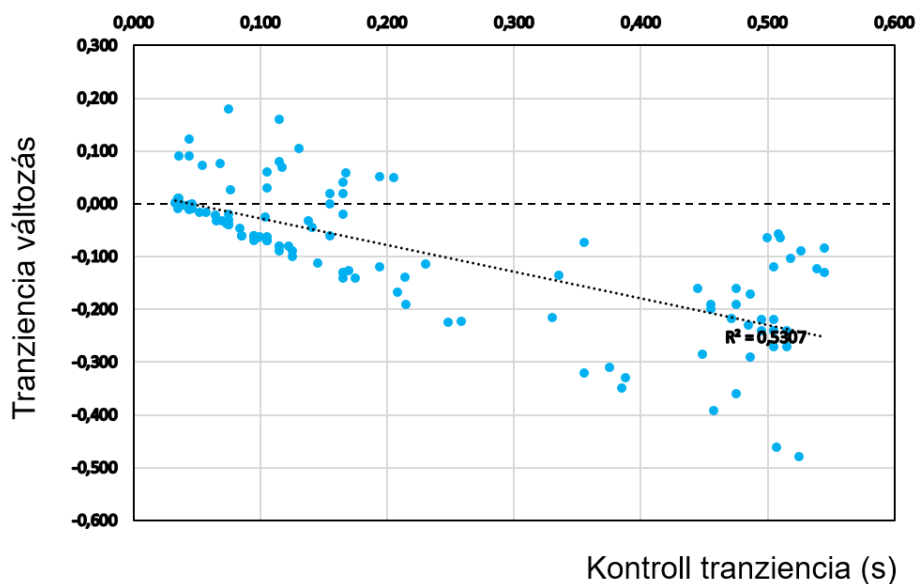


**29. Ábra: Fenntartott ON válasz (A) tranzienciájának változása és egy OFF komponens megjelenése (B) PTX hatására.**

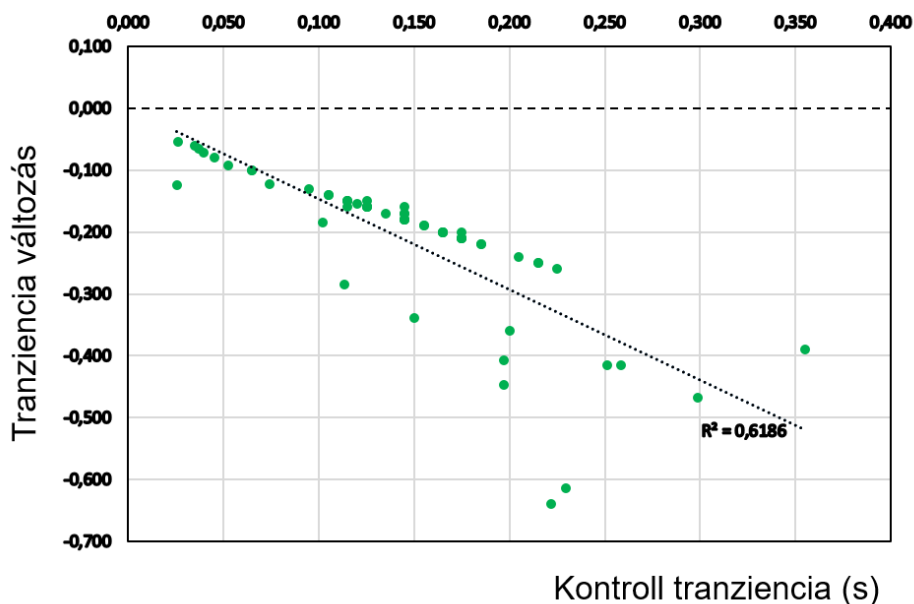
A PTX kezelés során megfigyelt tranziencia változás jellemzően a fenntartott válaszok lecsengési idejének rövidülését eredményezte, az eleve tranziens válaszok azonban csak elvétve váltak valódi fenntartott válasszá, így az általunk köztes tartományként megjelölt válaszkinetika ismét tükröződött az eredményekben. Az adatsorok közötti szignifikáns különbség ellenére a PTX kezelés hatása sem szolgáltatott egyértelmű magyarázatot a tranziencia meghatározására.

Következő lépésben a retina elektromos szinapszisait kívántuk vizsgálni a dűcsejt-tranziencia vonatkozásában. A réskapcsolatok zárására egy MFA néven ismert vegyületet alkalmaztunk és a korábbiakhoz hasonlóan összehasonlítottuk a kezelés után készített hisztogramot a kontrol felvételekkel. A  $PSTH\tau$  értékek változását a 30. és 31. ábrák mutatják be. Bár az MFA kezelés nem eredményezett a PTX hatásához hasonló mértékű változást, a statisztikai tesztek értelmében a kontrol és a kezelt retina dűcsejtjeinek tranzienciáját mérő adatsorok között szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni (Wilcoxon előjelteszt,  $p < 0,05$ ), tehát az MFA alkalmazása és a retina elektromos szinapszisok normál működésének megzavarása szintén képes megváltoztatni a dűcsejtek tranzienciáját, esetenként akár egy teljes fenntartott-tranziens átkapcsolást is okozva. Kiemelkedően széles skálán mozog a  $PSTH\tau$  értékekben tapasztalt változás az MFA kezelést követően ON válaszok esetén (30. ábra), valódi tranziensről fenntartottra váltást azonban itt sem tapasztalunk gyakran – helyette a tranziens válaszok lecsengési idejének kisebb mértékű elnyúlása következik be, amely az esetek

többségében a korábban emlegetett köztes, vagy intermedier karakterisztikát tükrözi a hisztogramon. Az MFA-kezelt OFF válaszok esetén (31. ábra) egyedülállóan a tranziencia értékének garantált csökkenését jegyeztük fel, az tranziens válaszok lecsengési kinetikájára a réskapcsolatok blokádja ebben az esetben nem volt számottevő hatással.

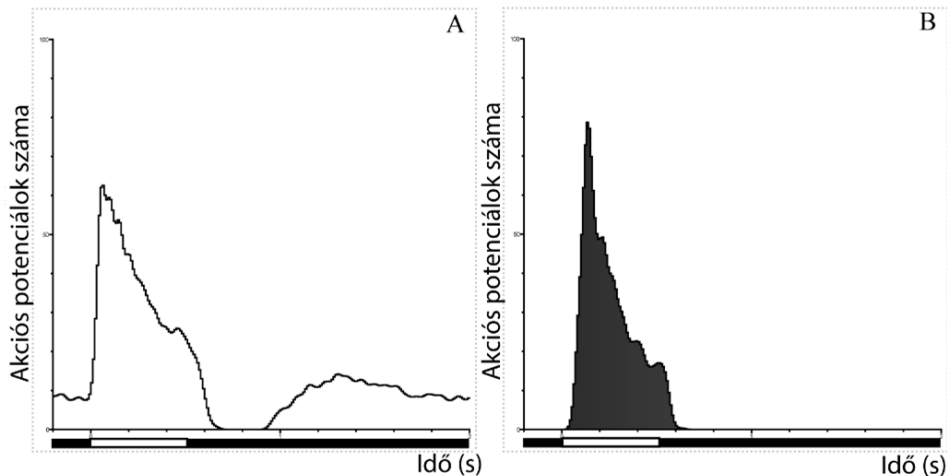


30. Ábra: MFA hatása ON válaszok tranzienciájára.



31. Ábra: MFA hatása OFF válaszok tranzienciájára.

Az MFA jellegzetes hatásai között említhetjük még a spontán aktivitás teljes megszűnését vagy jelentős mérsékelődését (32. ábra). A réskapcsolatok zárása megakadályozza a sejtek közötti gyors elektromos kommunikációt és akadályozza a populációs kód létrehozását, így a dúcsejt leginkább csak a vele közvetlen szinaptikus kapcsolatban álló bipoláris sejteken keresztül kap bemenetet, amely csökkenti a spontán, azaz nem fényinger hatására kialakuló akciós potenciálok számát.



32. Ábra: MFA hatása (B) egy kontroll fényválasz (A) tranzienciájára és spontán elektromos aktivitására.

#### 4.8 Párhuzamos pályák egymásra hatása

Az eddig leírt kísérletes eredmények mind arra utaltak, hogy a tranzienciát a dúcsejtek szintjén konvergáló és egymással interakcióba lépő szignálok együttesen határozzák meg. Annak érdekében, hogy az ugyanazon a dúcsejthez futó párhuzamos pályák konvergenciájának jelentőségéről bizonyosságot nyerjünk, OFF-center dúcsejtek fényválaszait hasonlítottuk össze szkotopikus, mezopikus és fotopikus megvilágítás mellett. Jelenlegi információink szerint kellően alacsony intenzitású fényinger csupán az elsődleges pálcika útvonalat aktiválja, míg a mezopikus tartományban már a másod- és harmadlagos pálcika útvonalak is aktív válnak a csap útvonalak mellett. Az ok, amiért csupán OFF válaszok kinetikáját elemeztük a kísérletes munka ezen szakaszában az általunk alkalmazott kísérleti protokollban keresendő: a kísérletek során APB-t alkalmaztunk, mely specifikusan a metabotróp glutamát receptorokkal (mGLUR<sub>4/6/7/8</sub>) operáló pályák működését szünteti meg. Esetünkben tehát az OFF csap útvonal mellett intakt maradhat a másodlagos és harmadlagos pálcika útvonal, ugyanakkor az ON bipolárisok (csap és elsődleges pálcika útvonalak) jeltovábbítása felfüggesztődik.

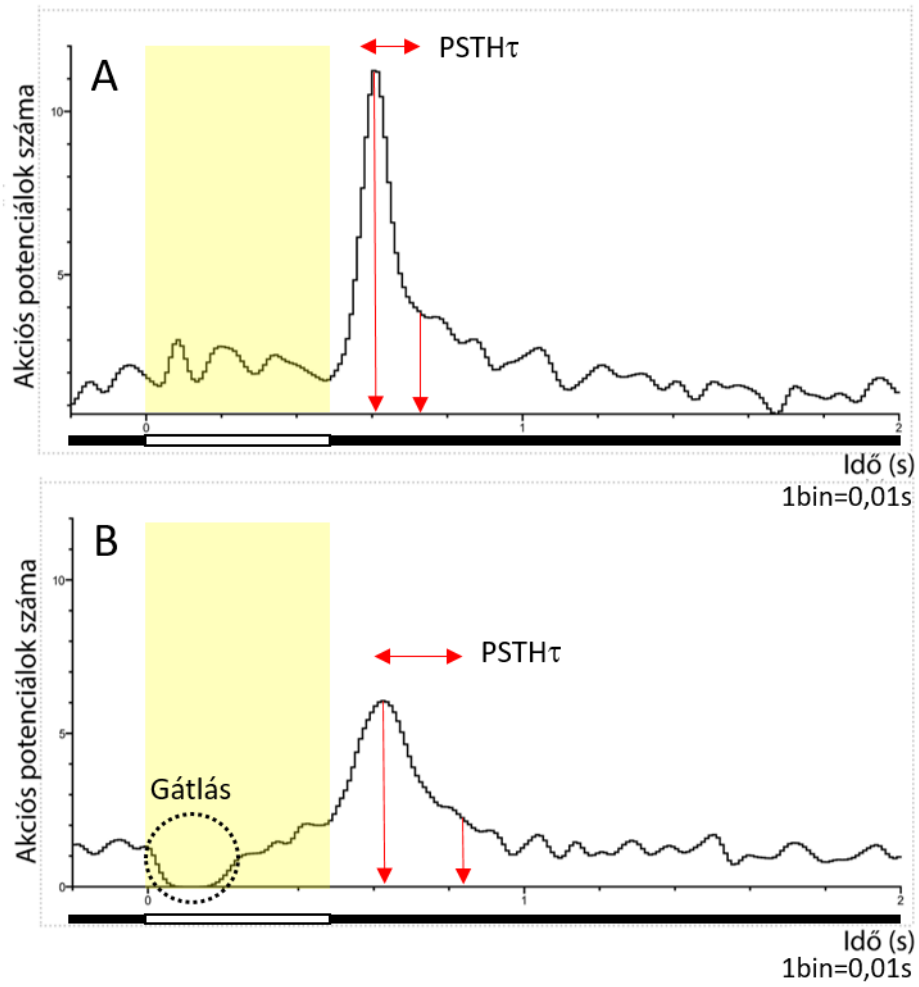


A hatásos APB koncentráció megállapításához először n=6 dúcsejtet vettünk alapul, melyek mindhárom általunk alkalmazott megvilágítás mellett, kontroll körülmények között egyértelműen azonosítható, PST hisztogram generálására és  $PSTH_{\tau}$  mérésére alkalmas fényválasszal rendelkeztek. Az APB-vel történő inkubációt a szkotopikus körülmények között mért fényválasz eltűnése követte, jelezve, hogy az elsődleges pálcika útvonal a kezelés hatására inaktív állapotba került. Mezopikus és fotopikus intenzitású megvilágítást alkalmazva a fényválasz továbbra is mérhető maradt, így lehetőségünk volt a tranzienciát a megváltozott körülmények között vizsgálni és a mért értékeket összehasonlítani (8. táblázat).

	Szkotopikus intenzitás		Alacsony mezopikus		Magas mezopikus		Fotopikus intenzitás	
	Kontroll	APB	Kontroll	APB	Kontroll	APB	Kontroll	APB
Sejt 1	0,155		0,185		0,185	0,425	0,115	0,165
Sejt 2	0,075		0,105	0,145	0,325	0,075	0,095	0,215
Sejt 3	0,145	0,045	0,145	0,045	0,195	0,065	0,095	0,205
Sejt 4	0,145		0,105	0,105	0,105	0,065	0,055	0,115
Sejt 5	0,045				0,065	0,055	0,065	0,105
Sejt 6	0,175		0,085	0,205	0,085	0,065	0,085	0,125

**8. Táblázat: a tranziencia alakulása 50 $\mu$ m APB kezelést követően.** Négy intenzitási tartományban mértük a sejtek tranzienciájának változását APB kezelést követően hat példasejt esetén: szkotopikus (pálcika útvonal aktív), alacsony mezopikus (csap útvonal kis mértékben aktív), magas mezopikus (pálcika útvonal kis mértékben aktív) és fotopikus (csap útvonal aktív). A tranziencia csökkenését APB hatására piros, emelkedését kék szín jelzi.

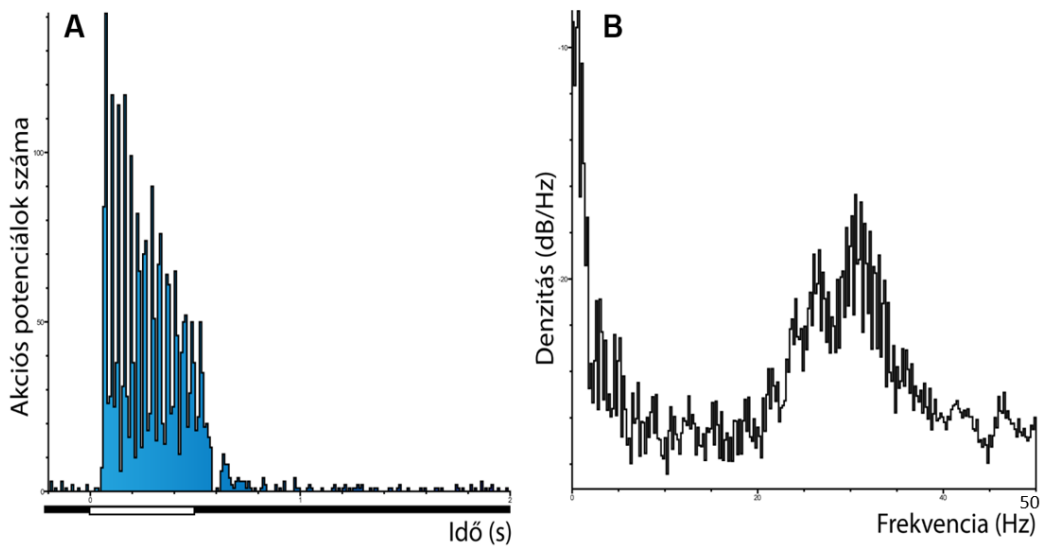
Eredményeink tanúsága szerint a tranziencia - és ezáltal a  $PSTH_{\tau}$  értéke - intenzitástartományonként változik, a változás azonban jellemzően (és meglepően) nem egyirányú. Az általunk vizsgált dúcsejtek esetében egyedül a fotopikus tartományban rögzített válaszok esetén mutatható ki egységes irányú változás: a  $PSTH_{\tau}$  értékének emelkedését tapasztaljuk (8. táblázat és 33. ábra; páros t-teszt  $p < 0,05$ ). Mezopikus tartományokban (a skála alacsonyabb és magasabb intenzitású pontjait is figyelembe véve) a változás iránya nem egységes. Az APB kezelés eredményeként tapasztaltuk továbbá egy fény bekapcsolására jelentkező, kontroll körülmények között egyértelműen hiányzó gátló hatás jelenlétét (33. ábra). A tapasztalt gátlás átmeneti, röviddel a stimulus megjelenése után jelentkezik és jellemzően nem áll fent a fényingerlés teljes ideje alatt.



**33. Ábra:** az APB kezelés hatása PST hisztogramon ábrázolva. A fény bekapcsolásakor kontroll körülmények között (A, fent) nem tapasztalt inhibíció figyelhető meg (B, lent).

## 4.9 Retinális dúcsejtek oszcillációs aktivitása

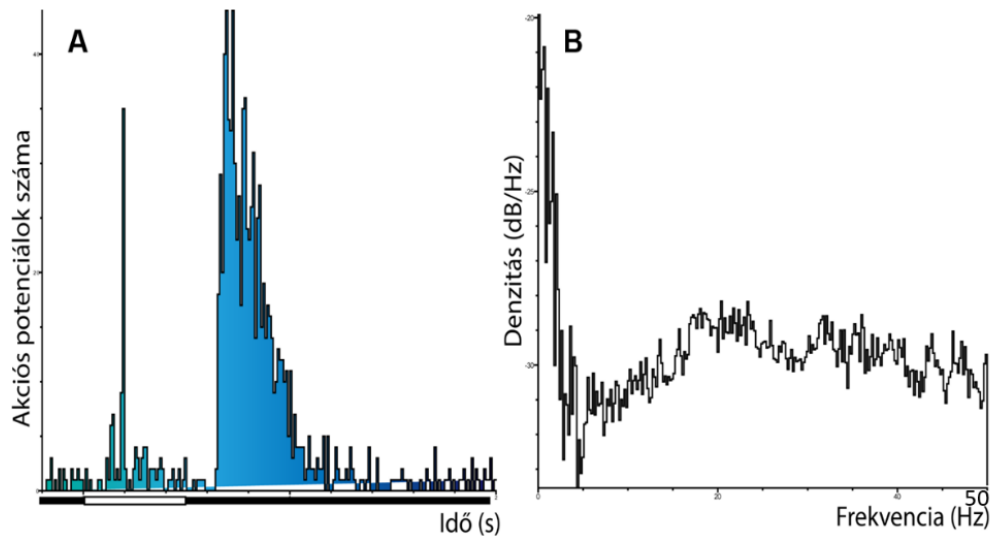
Az idegsejtek oszcillációs aktivitása több idegrendszeri struktúrában is ismert és a retinális dúcsejtek szintjén is megfigyelhető jelenség (Ishikane és mtsai. 2005; Qiu és mtsai. 2016). Retinában elsősorban békákban tanulmányozták, Ishikane és kollégái úgy vélik, elsősorban az állatok vizuális ingerek (közeledő objektum; ragadozó, mint lehetséges veszélyforrás) által kiváltott viselkedési reakcióiban játszhat fontos szerepet. Az egér retina dúcsejtjein végzett kísérleteink során az akciós potenciálok rögzítésekor mi is felfigyeltünk a fent említett oszcillációra, melynek jelenlétét később az felvételek kiértékelésénél is igazolni tudtuk (34. ábra).



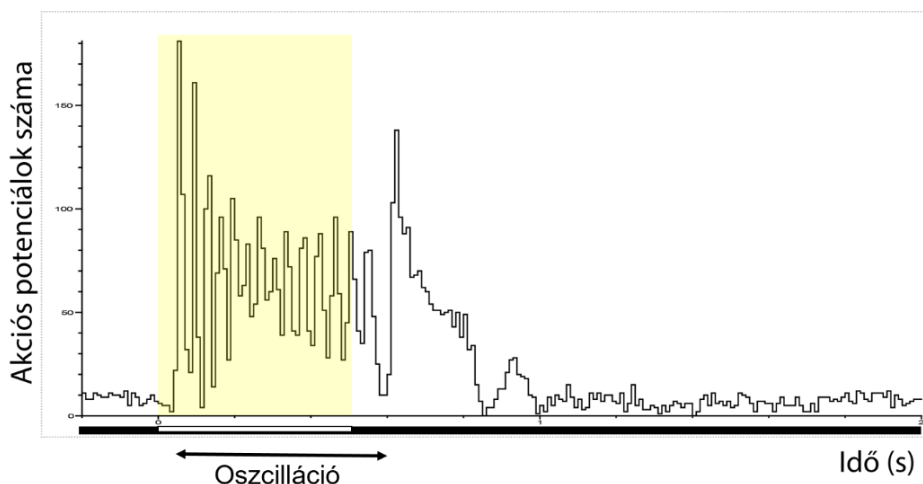
**34. Ábra: fenntartott oszcillációs aktivitás PST hisztogramja (A) és a hozzá tartozó frekvencia spektrum (power spectrum; B).** Fény be- és kikapcsolását a 35A ábra alsó részén húzódó fehér (megvilágítás, 500ms) és fekete (fény kikapcsolva) sávok jelzik. Az általunk megfigyelt oszcillációs aktivitás  $n=20$  fényválasz alapján átlagosan  $\sim 24$  Hz frekvenciával jelentkezik.

Qui és munkatársai elsősorban az elektromos szinapszisok összehangoló működését és a szinaptikus GABA-erg transzmissziót sejtették a jelenség hátterében. Az általunk végrehajtott kísérletekben MFA és PTX alkalmazásával vizsgáltuk a két említett retinális hálózati elem hatását a dúcsejtek oszcillációjára. A korábban használt peristimulus hisztogramot (PSTH) ebben az esetben további szűrők nélkül, közvetlenül a nyers adatokból készítettük el, láthatóvá téve az esetleges oszcillációs aktivitást. Bár Qui és kollégái a béka retinában mind OFF, mind pedig ON (tranziciát tekintve fenntartott) válaszok esetén megfigyeltek oszcillációt, az általunk rögzített elvezetésekben a jelenség az OFF válaszokban nem (35. ábra), csak az ON

válaszokban érhető tetten. Találunk kísérleteinkben olyan ON-OFF dúcsejteket, melyek fényválaszának ON komponense egyértelmű oszcillációt mutat, az OFF komponens esetén azonban ugyanez egyáltalán nem figyelhető meg (36. ábra). A rejtett, szabad szemmel nem érzékelhető oszcillációs aktivitás kiszűrésére frekvencia spektrumot (power spectrum) készítettünk az érintett sejtekről, amely átlagosan 24Hz frekvenciával jelentkező oszcillációt mutatott a vizsgált ON válaszok (n=20) esetében.

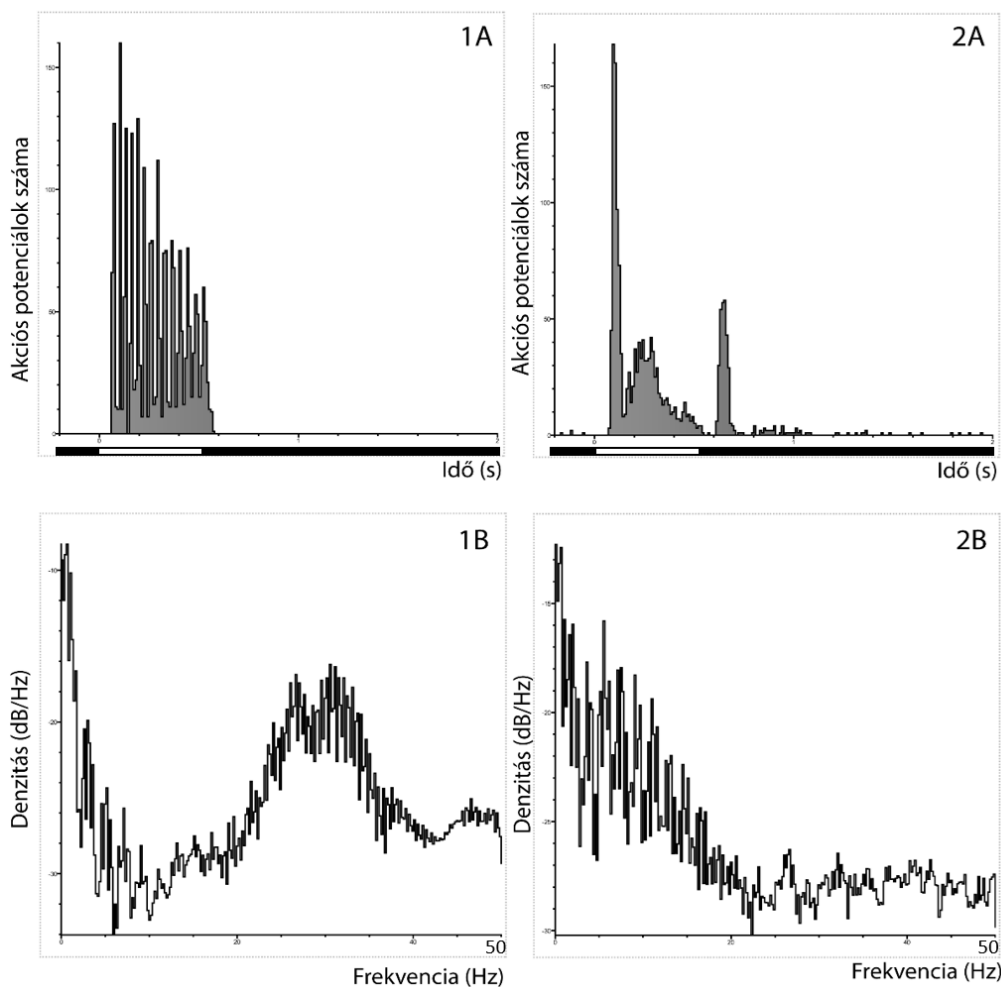


**35. Ábra:** Ozcillációt nem mutató OFF válasz PST hisztogramja (A) a hozzá tartozó frekvencia spektrummal (B). Fény be- és kikapcsolását a 36A ábra alsó részén húzódó fehér (megvilágítás, 500ms) és fekete (fény kikapcsolva) sávok jelzik.

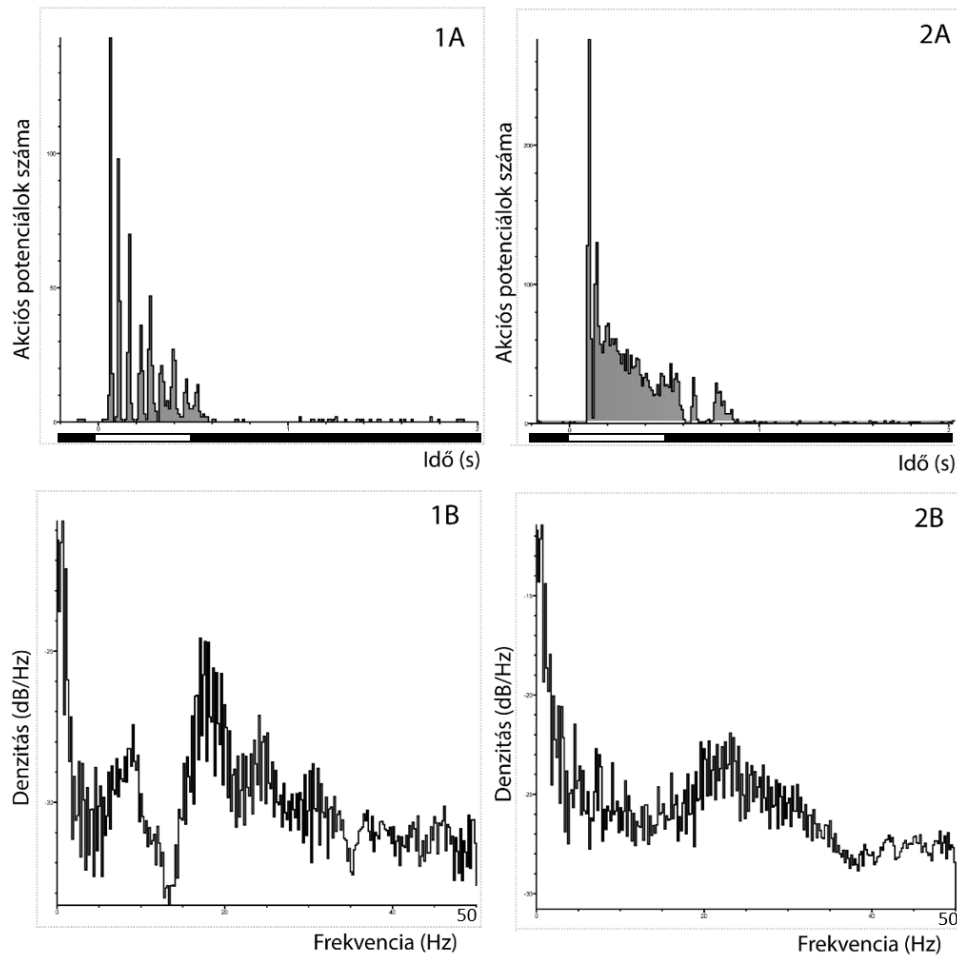


**36. Ábra:** ON-OFF dúcsejten megfigyelhető ON-oszcillációs aktivitás. A megvilágítást idejét (500ms) fekete alapon fehér sáv jelzi.

Az ON komponensek tekintetében mind a PTX, mind pedig az MFA látványos változást okozott a sejt által produkált akciós potenciálok eloszlásában. PTX esetén feltételeztük, hogy az oszcillációs aktivitás teljesen megszűnt, a frekvencia spektrum alapján azonban továbbra is kimutatható egy eltérő frekvenciájú, kevésbé erőteljes oszcilláció a válasz fenntartott komponensében (37. ábra). Ezzel ellentétben a fényválasz kezdeti szakasza a PTX hatás következtében tranziens kinetikát vett fel (átmeneti inhibíció, amely a tranzienciát alacsony értékekre csökkenti) és elvesztette az oszcillációt (a tranziens csúcs lecsengése egyenletes, a fenntartott komponens a kontrollnál alacsonyabb frekvenciával oszcillál). MFA alkalmazása ugyanakkor tüntette el, csupán mérsékelte az oszcillációs aktivitást (38. ábra).



**37. Ábra: PTX hatása az oszcillációs aktivitásra.** A kontroll felvételen (1A, 1B) jól látható fenntartott ON oszcilláció teljes átrendeződést mutat a kezelés hatására (2A, 2B). A PTX korábban megfigyelt hatásai (gyors, csúcsaktivitást követő ON inhibíció és kontroll körülmények mellett nem látható OFF aktivitás) mellett megfigyelhető a szinkronizált oszcilláció szétesése és a frekvenciák balra tolódása (2B).

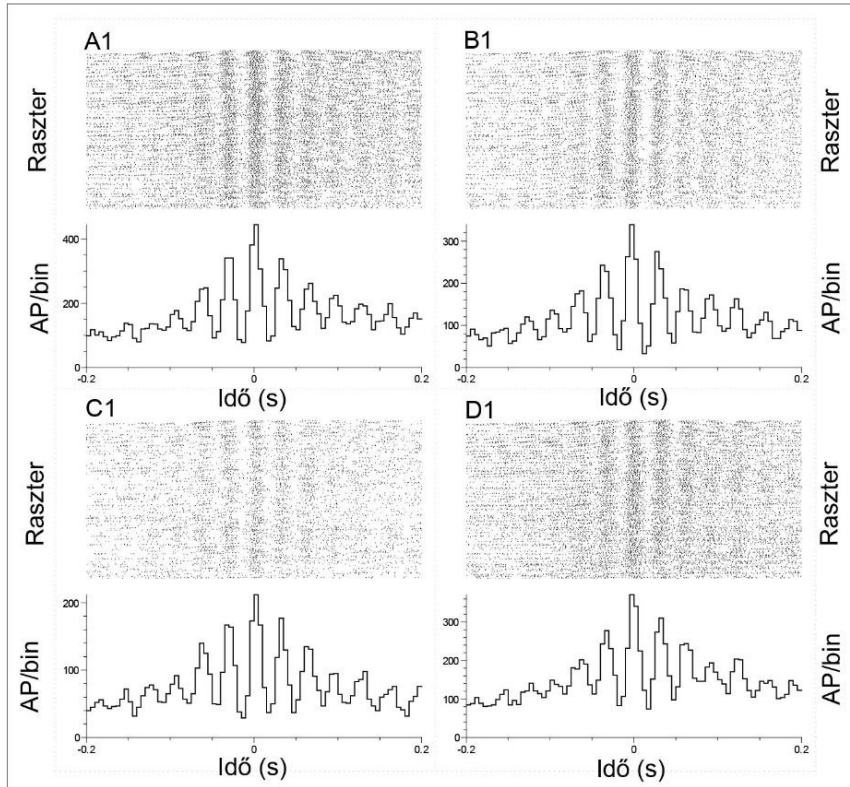


**38. Ábra: MFA hatása az oszcillációs aktivitásra.** A kontroll körülmények között tapasztalt oszcilláció (1A és 1B) nem tűnik el teljesen, csupán mérsékelődik (2A és 2B) a réskapcsolatok blokádjának hatására.

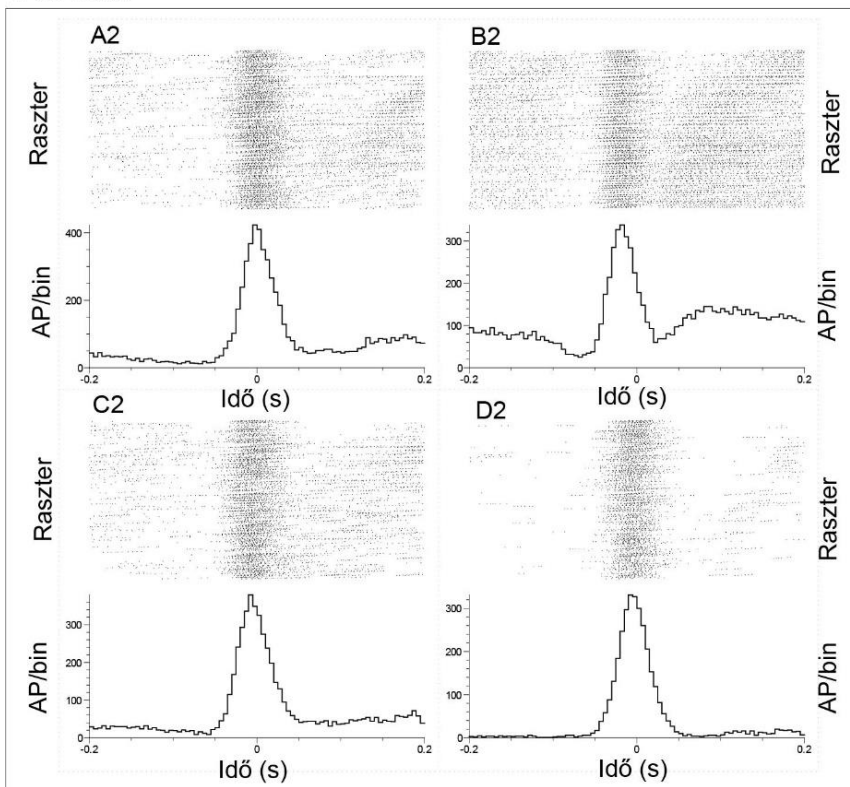
Felmerült továbbá a kérdés, hogy az egyes sejtek oszcillációs aktivitása összehangolt, vagy sejtenként külön-külön szerveződik? 4-4 sejtet hasonlítottunk össze mindkét kísérlet kontroll és kezelt csoportjából (39-40. ábra). A hisztogramon megfigyeltekkel összhangban kimutattuk, hogy:

1. az oszcilláció összehangoltan jön létre kontroll körülmények között a 4 példasejtben (39. és 40. ábra),
2. PTX alkalmazása megszünteti a kezdeti oszcillációt (37. és 49. ábra)
3. MFA az oszcillációs aktivitást mérsékeli, de teljes egészében nem szünteti meg (38. és 40. ábrák).

Kontroll felvételek

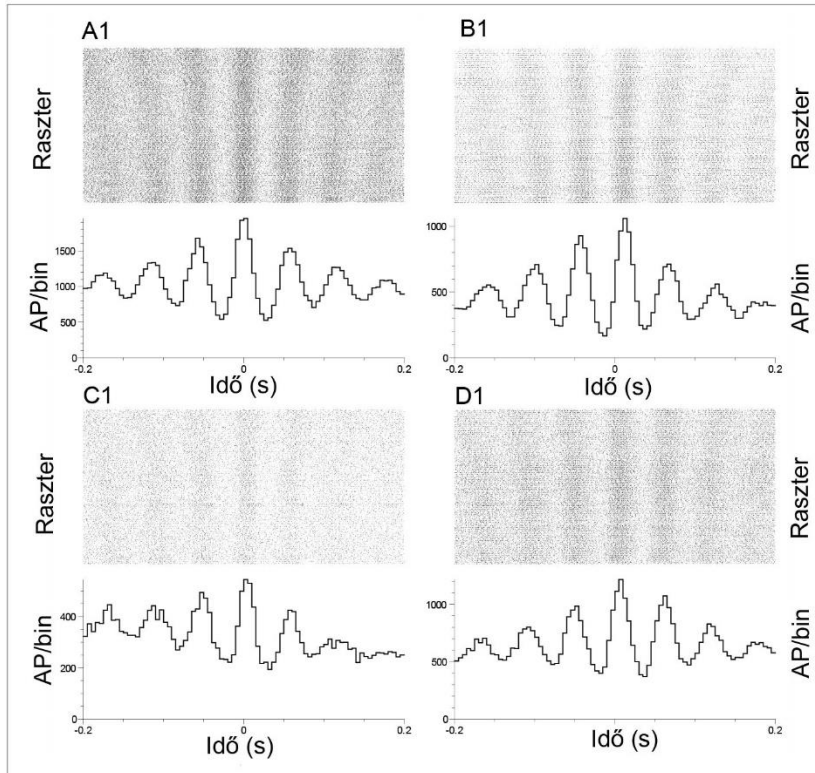


PTX hatás

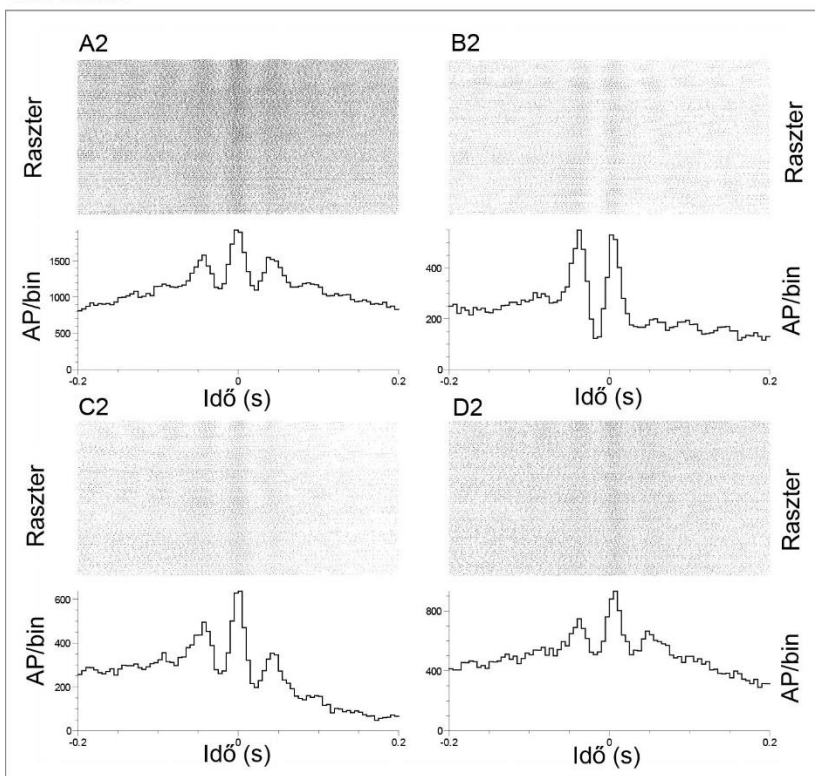


**39. Ábra: PTX hatása a szinkronizált oszcillációra.** Négy különböző, de ugyanazon mérés során rögzített retinális dúcsejt (A, B, C és D) korreláltatott elektromos aktivitása látható kontroll körülmények között (balra) és PTX hatására (jobbra).

Kontroll felvételek



MFA hatás



**40. Ábra: MFA hatása a szinkronizált oszcillációra.** Szintén négy különböző, de MFA kezelés előtt (balra) és után (jobbra) vizsgált retinális dúcsejt (A, B, C és D) korreláltatott elektromos aktivitását mutatja be az ábra. MFA hatására az oszcillációs aktivitás csökken, de nem szűnik meg teljesen.



## 5. Eredmények megbeszélése

Általánosan elfogadott, hogy a retina különböző sejtjeinek egyéni fényválaszát tranziens és fenntartott csoportokra osztjuk fel. Az elektromos aktivitás lecsengésének időbelisége olyannyira jellegzetes és fontos karakterisztikája a sejtek működésének, hogy ezen sajátosságot az egyes dúcsejt-altípusok elkülönítéséhez is szokás alapul venni (mint például az alfa sejtek egyes altípusainak megállapítása esetén). A dúcsejtek mellett a bipoláris sejtek esetében is kimutatható a potenciálváltozás kinetikájában a tranziens illetve fenntartott típus, így a tranzienciát meghatározó jelenségek feltárásával nem csak a dúcsejtek működésének megértéséhez juthatunk közelebb. A tranzienciát tárgyaló közleményekben esetenként ellentmondással találkozhatunk, hiszen a tranziencia vizsgálatára irányuló kutatásokról annyit mondhatunk el mindössze általánosságban, hogy a kutatómunkát gerinces retinán végezték.

Tekintve, hogy a tranziencia eredetét illetően a tudománynak még nem sikerült egyetértésre jutnia, jelen dolgozat elsőként megfogalmazott célja volt az egér retinális dúcsejtek tranzienciáját meghatározó tényezők azonosítása. Feltételezhetjük, hogy a retinális hálózat komplexitásából adódóan a végső kimenetet képező dúcsejt fényválaszát nem definiálhatja teljes valójában a hálózat egyetlen szinaptikus kapcsolódási pontja; helyette a dúcsejtek akciós potenciál kódja tulajdonképpen a pre-szinaptikus hálózati elemek egymásra hatásának eredményeként jöhet létre. Bemutatott eredményeink arra is rávilágítanak, hogy a dúcsejt fényválasz kinetikája a korábban elfogadott tranziens/fenntartott dichotómiánál jóval összetettebb jelenség, melyet számos tényező szabályoz és befolyásol.

### 5.1 A megfelelő számítási mód kérdése

A tranziens és fenntartott fényválasz kutatásában az első fontosabb feladat az elemzés során használt szempont- és szabályrendszer felállítása volt. Az eredmények ismertetésekor leírt számítási módszereket összehasonlítva kijelenthetjük, hogy bár egyik megoldás sem alkalmazható bizonyos mértékű hiba és torzítás nélkül, mindegyik rendelkezhet olyan tulajdonságokkal, amelyek a kísérletes megközelítéstől függően előnyösebbé tehetik a többivel szemben, ilyen lehet például a görbe alatti terület számítása szűrővel nem simítható lokális csúcsok kialakulása esetén. Figyelembe kell vennünk, hogy a dolgozatban bemutatott kísérletes munka dúcsejtekből fényingerlésre elvezetett akciós potenciálok elemzésére épült, ezért minden esetben egy adott, előre meghatározott időtartamra eső akciós potenciálok számát mértük és hasonlítottuk össze, ugyanakkor az általunk mSTI néven ismertetett, módosított fenntartott-tranziens index (eredetileg STI; Zhang és mtsai. 2009) és területszámítási (Farrow

és Masland 2011) értékek mindig nagyobb egységet ölelnek fel, így kevésbé érzékenyek az elektromos aktivitásban jelentkező lokális ingadozásokra. Ugyanezen tulajdonságukból kifolyólag azonban kevés információt szolgáltatnak a görbe lefutásáról és nehezen szűrik a sejtek spontán elektromos aktivitásaként jelentkező, fényválaszon kívül megjelenő akciós potenciálokat. Az ismétlések során a területszámítás és mellette a  $PSTH_{\tau}$  teljesített jól a megbízhatósági skálán: alacsony szórással voltak képesek reprodukálni a tranziencia értékeket (16. és 17. ábrák). Ugyanakkor a területszámítás további módosítások nélkül lényeges csúsztatásokat eredményezhet az eltérő latenciával rendelkező sejtek összehasonlításakor, amennyiben a számítást egységesen a fénystimulus be- illetve kikapcsolásához igazítjuk. fontos megjegyeznünk, hogy a fényválasz késését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a mért értékek egy rendkívül széles időbeli skálán mozognak a teljes dúcsejt-populációt vizsgálva (Tengölics és mtsai. 2019). Tekintve, hogy a területszámítás a fény bekapcsolásától kezdve számítja az aktivitást, metodikailag nem tesz különbséget az alacsony és a magas latencia értékkel rendelkező fényválaszok között. Mivel az itt bemutatott kísérletes munka során a teljes dúcsejt-populációt vizsgáltuk egy-egy csoport kiemelése helyett, a válaszkésésben tapasztalható variabilitás egy olyan tényező, mellyel általánosan számolnunk kellett az adatelemzés során. Bár a  $PSTH_{\tau}$  érzékenyek tekinthető például egy váratlan inhibíció megjelenésével szemben, a fényválasz késése ebben az esetben a kapott tranziencia értékét semmilyen szempontból nem befolyásolja, hiszen a fény be- és kikapcsolásának idejét a módszer nem veszi számításba. Mindezek alapján úgy véljük, hogy az általunk végzett kísérletes munka elemzésére a  $PSTH_{\tau}$  alkalmazása a legcélszerűbb, köszönhetően:

1. az ismétlésekkel szemben tapasztalt megbízhatóságának,
2. a görbe lefutásáról hordozott információnak,
3. a fényválasz esetleges késésével szembeni beépített kompenzációnak (lásd lent) és
4. a lassú potenciálokkal történő összehasonlítás lehetőségének.

Utóbbi szempont kiemelten fontos olyan kísérletek esetén, ahol a pre-szinaptikus, akciós potenciált nem produkáló elektromos aktivitást hasonlítanánk össze a dúcsejtek poszt-szinaptikus kisüléseivel. Említést érdemel továbbá, hogy a  $PSTH_{\tau}$  módszer nem igényli az adatok normalizálását, köszönhetően Euler-féle szám ( $e$ , mint matematikai állandó) alkalmazásának. Fenntartjuk továbbá, hogy a területszámítás egyértelmű előnybe kerül olyan kiugró esetekben, ahol pl. a dúcsejt elektromos aktivitásának ideiglenes, meredek esése a  $PSTH_{\tau}$  megtévesztését eredményezi (például egy tranziens PTX gátlás esetén).

## 5.2 A tranziencia eloszlási skálája

Bár a tranziens és fenntartott kifejezések (legalábbis angol nyelvű megfelelőik) gyakorinak számítanak, az általuk reprezentált tulajdonság (a fényválasz időbeli lefutása) nem rendelkezik hasonlóan széles körben elterjedt rövid megnevezéssel: munkánk során ezért már a kezdeti lépések kidolgozásánál elkezdjük alkalmazni a tranziencia idegen eredetű fogalmát (Ganczer és mtsai. 2017). A tranziencia tulajdonképpen nem más, mint adott dúcsejt fényválaszának időbeli lefutása egyetlen, a válasz kinetikáját tükröző számértékkel kifejezve. Eleinte a mennyiségi meghatározás kidolgozásának egyetlen célja a különböző karakterisztikájú (tranziens/gyorsan lecsengő vagy fenntartott/lassú lecsengésű) válaszok objektív, matematikai alapra helyezett elkülönítése volt. Terveink szerint a kapott értékek gyakoriságát ábrázolva éles elválást tapasztaltunk volna a tranziens és fenntartott válaszok között, amely lehetővé tette volna egy konkrét értékben megjelölhető határvonal felállítását a két csoport gyors és hatékony manuális vagy akár automatikus, szoftveres alapú elkülönítéséhez. A retinális tranziencia azonban, eredményeink alapján, nem bontható egyértelműen két csoportra a dúcsejtek szintjén: a dolgozatban leírt és bemutatott négy különböző számítási módszer közül egyik sem eredményezte a tranziens és fenntartott válaszok egyértelmű elválását, utalva arra, hogy a fényválasz időbeli lefolyása egy soktényezős, összetett szabályozási folyamat eredményeként alakul ki. A tranziens-fenntartott elválás hiánya más csoportok által publikált eredményekben is megfigyelhető (személyes kommunikáció, European Retina Meeting 2017; Federation of Neuroscience Societies konferencia 2017). Mindezek alapján a korábban ismert és elfogadott kétkategóriás gondolkodásmód helyett célszerűnek tartjuk a tranziencia fogalmának és szerepének újragondolását, illetve a kapott eredmények folyamatos skálán történő és számosított értelmezését. Úgy gondoljuk, hogy az egyes értékek között tapasztalt jelentős variabilitás származhat a dúcsejtek egyéni, vagy típusonként/altípusonként jelentkező fiziológiai különbségeiből. Feltételezhetjük, hogy az általunk megfigyelt és mért skála kiterjedéséért elsősorban utóbbi tényező tehető felelőssé, ugyanakkor a tranziens-fenntartott fényválaszok egyértelmű különválásának hiánya továbbra is érdekes kérdéseket vet fel a fényválasz kinetikáját kialakító szabályozási mechanizmusokkal kapcsolatban.

Bár lehetséges, hogy a bipoláris sejtek lassú potenciáljait elemezve egyértelmű a tranziens és fenntartott válaszok elkülönülése (a tudományos közleményekben megjelentett ábraanyag alapján; lásd Borghuis és mtsai. 2014; Lindstrom és mtsai. 2014), ezen eredmények nem kell, hogy feltétlenül ellentmondásba ütközzenek a retinális dúcsejteknél populációs

szinten tapasztalt nem-bináris tranziencia eloszlással. Ha figyelembe vesszük, hogy egy-egy dúcsejt többféle bipolárisból kaphat bemenetet, további lehetséges magyarázatot találhatunk a dúcsejtek esetében tapasztalt eltérésekre: amennyiben a sejt képes a különböző tranzienciájú (különböző késéssel rendelkező és a dendritfa eltérő területein szinaptizáló) bemenetek „összevonására”, úgy a szélsőséges értékek találkozása könnyen eredményezheti az általunk megfigyelt átmeneti tartományba eső értékek (80-150ms) megjelenését. Érdeemes megemlítenünk azonban a réskapcsolatok lehetséges szerepét, melyek horizontális irányban tesznek lehetővé intenzív kommunikációt a retina belső rétegeit felépítő amakrin sejtek és a dúcsejtek között, befolyásuk pedig elsősorban a válasz lecsengési fázisának időzítésében lehet jelentős. Megjegyzésként kerül említésre: a PTE SZKK Retinális Neurobiológiai Kutatócsoport egy másik, jelen dolgozatban nem tárgyalt kísérletes munkájának alaphipotézise, hogy az amakrin sejt–dúcsejt elektromos szinapszisok „aluláteresztő” filterként működnek (csak küszöbérték alatt engednek át) és a nagy amplitúdójú ionáramok puffereelésében vesznek részt. Ennek hatására a poszt-szinaptikus potenciál (PSP) csúcsok alacsonyabbakká válnak a réskapcsolatok nyitásával, a tranziencia mérhető értéke ugyanakkor eltolódik a fenntartott tartomány felé. Mindezek értelmében úgy gondoljuk, hogy a „tranzienst” és „fenntartott” kategóriák a dúcsejtek szintjén relatívvá válnak, alkalmazásuk elsősorban két sejtpopuláció összehasonlításakor, vagy egy farmakológiai kezelés során a kiindulási és a kísérleti állapot összevetésekor lehet célravezető. Ugyanezen két kifejezést a teljes retinális dúcsejt-populációra értelmezve félrevezető eredményeket kaphatunk, ezért korábban már javaslatot tettünk a tranziencia számértékekben megadott értelmezésére, amely a teljes lecsengési skála figyelembe vételével lényegesen több információt közölhet a fényválasz kinetikájáról, mint a korábban alkalmazott ad hoc kategorizálás (Ganczer és mtsai. 2017).

Fontos azonban kiemelni: nem a tranziens és fenntartott válaszok létezését vitatjuk, ugyanakkor a dolgozatban említett „átmeneti” kategória azonban nem csupán egyszerű gyűjtőfogalom a korábbi sémába nem illeszkedő fényválaszok elkülönítésére. A tranziencia számításához létrehozott hisztogramok tanúsága szerint a görbe lefutását tekintve három nagyobb kategóriát különíthetünk el: i) valódi tranziens válasz gyors lecsengéssel ( $PSTH\tau$  jellemzően 40-60ms), ii) valódi fenntartott válasz jellegzetes plató fázissal ( $PSTH\tau$  500ms megvilágítás esetén körülbelül 200ms feletti értéket vesz fel) és iii) elnyújtott tranziens vagy átmeneti válasz ( $PSTH\tau$  100-150ms körül) lassabb lefutással, de elhúzódó plató fázis nélkül. A korábban leírt hagyományos tranziens és fenntartott válaszok tehát továbbra is jelen vannak a dúcsejtek szintjén, ugyanakkor az i) és a ii) csoport közötti átmenet túlságosan széles tartományt

fed le ahhoz, hogy alkalmanként előforduló extrém tranziens vagy extrém fenntartott esetekként kezeljük őket. Gyakori előfordulásuk szintén nem támogatja, hogy figyelmen kívül hagyjuk a megszokott nevezéktant felborító köztes vagy átmeneti csoport létezését.

Lehetséges azonban, hogy a tranziencia eloszlási skálája egyben típus-specifikus is a dúcsejteket tekintve: elképzelhető, hogy egyes típusok vagy altípusok tranzienciája tranziens és/vagy fenntartott válasz esetén adott típusra jellemző meghatározott tartományt fedhet le. Amennyiben egy hipotetikus „A” típusú dúcsejt jellemzően gyors tranziens ( $PSTH\tau=50ms$ ) és fenntartott ( $PSTH\tau<200ms$ ) válaszokat produkál, míg „B” típusú társánál tipikusan lassabb lecsengésű válaszok ( $PSTH\tau=100ms$  és  $PSTH\tau>200ms$  körül) kerülnek előtérbe, a tranziens-fenntartott kettősség továbbra is jellemző marad, a teljes populációt elemezve azonban az ilyen tipikus különbségek összegződnek, az eloszlási hisztogramon elsimítva a két kategória közötti különbséget. Hasonló következtetésre jutottunk a fényválasz időbeli késésének vizsgálatánál is, ahol a kapott latencia értékek szintén tág (40-240ms) tartományban mozogtak (Tengölics és mtsai. 2019.)

### **5.3 A külső és belső retina szinaptikus kapcsolatainak szerepe a tranziencia alakításában**

Steven H. DeVries 2000-ben publikálta tanulmányát, melyben az OFF bipoláris sejtek szintjén tapasztalt tranziens és fenntartott potenciálváltozást a különböző típusú poszt-szinaptikus glutamát-receptorok jelenlétének tulajdonítja (DeVries 2000). Feltételezte, hogy a dúcsejtek szintjén megnyilvánuló tranziens és fenntartott fényválasz mindig adott típusú bipoláris sejt bemenetének eredménye. Így közvetve ugyan, de a retina külső rétegeibe helyezte a tranziens/fenntartott dichotómiát egyértelműen meghatározó szinaptikus kapcsolat forrását. Kísérleteiben a mormotát (*Marmota* genus) használta modellként, a temporális kettősséget pedig az egyes bipoláris sejt dendritek poszt-szinaptikus membránfelszínein domináló AMPA vagy kainát receptorok különböző deszenzitizációs érzékenységgel magyarázta. Szintén a 2000-es évben publikálta kísérletes munkáját Awatramani és Slaughter, melyben a fényválasz időbeliségét szalamandra (*Ambystoma tigrinum*) ON bipolárisok szintjén vizsgálták (Awatramani és Slaughter 2000). Közleményükben kitérnek a tranziens és a fenntartott válaszok jelenlétére és szintén diszkrét kategóriákként írják le őket, illetve említést tesznek arról is, hogy a dúcsejtek „fázikus” és „tónikus” válaszai tulajdonképpen reprodukálják a bipoláris sejtek szintjéről érkező tranziens, vagy éppen fenntartott bemenetet. Felmerül azonban a kérdés: ha az OFF válasz esetén a kettősség az AMPA és a kainát receptorok eltérő deszenzitizációs érzékenységében rejlik, hogyan képezhető le mindez az ON bipolárisok szintjére, ahol az  $mGluR_6$  az egyetlen igazoltan jelenlévő poszt-szinaptikus glutamát-receptor? Az általunk és

további kutatócsoportok által végzett mérések szintén alátámasztják a tranziens és a fenntartott fényválasz jelenlétét mind OFF, mind pedig ON típusú dúcsejtekben. További érv a bipoláris posztszinaptikus receptor tranzienciát meghatározó szerepe ellen, hogy a retinakutatásban használt modellállatokban jelentős változatosság mutatható ki az OFF bipoláris posztszinaptikus glutamát receptorok eloszlásában (Puthussery és mtsai. 2014), amely szintén megkérdőjelezi az említett fotoreceptor – bipoláris sejt szinapszis meghatározó szerepét a végső retinális tranziencia kialakításában. Szintén a deVries által korábban bemutatott külső retinális nézőpont ellen érvel a felfedezés, hogy AMPA és kainát receptorok szimultán külső retinális expresszióját sikerült kimutatni emlős retinában (Buldyrev és mtsai. 2012). Borghuis és munkatársai, továbbá, arra a következtetésre jutottak, hogy az OFF bipolárisok esetén csak a kainát receptorok szólnak bele a tranziencia alakulásába, az AMPA receptorok viszont nem befolyásolják (Borghuis és mtsai. 2014).

A bipoláris sejt glutamát receptorok meghatározó szerepét cáfolja a fentiek mellett továbbá az a megfigyelés is, hogy a szkotopikus ON válaszok szignifikánsan eltérnek fotopikus párjuktól, míg ugyanez az OFF válaszokról nem mondható el. Bár a szkotopikus ON válaszok esetén a fotoreceptorok ingerületének felfogásáért szkotopikus és fotopikus körülmények között is az mGluR6 felelős, az elődleges pálcika útvonal sajátjaiból adódóan szkotopikus körülmények között az OFF válasz kialakulásához is az ON pálcika bipoláris mGluR6 működése szükséges, tehát ebben az esetben a párhuzamos pályák közötti váltás egyben a posztszinaptikus receptor megváltozását is jelenti. Tekintve azonban, hogy méréseink során a pálcika és csap csatornák közötti váltás nem eredményezett egységes, prediktálható változást, munkánk tovább erősíti azt a hipotézist, hogy a külső retina szinaptikus kapcsolatai kis, vagy elhanyagolható befolyást gyakorolnak a fényválasz végső kinetikájának alakulására – azaz nem a csap és pálcika útvonalak közötti váltás okozza önmagában a fotopikus ON válaszok tranzienciájának csökkenését. Szintén ebbe az irányba mutat az a megállapítás, hogy a korábban említett tranziencia értékeket tükröző eloszlási folytonosság mind az ON, mind pedig az OFF válaszok esetén megfigyelhető, tehát sem az mGluR6, sem pedig az AMPA/kainát receptorok jelenléte (az eltérő működési kinetika ellenére) nem állítható egyértelmű párhuzamba a tranziens vagy fenntartott válasz kialakulásával; a két eltérő útvonal a dúcsejtek teljes populációjára nézve hasonlóan tág spektrumon produkál eredményeket.

Köszönhetően a bipoláris sejtekből készült elvezetéseknek (DeVries 2000; Euler és mtsai. 2014; Ichinose és mtsai. 2014), ismert, hogy a lokális elektromos potenciálváltozás fázisos (tranziens), vagy tónusos (fenntartott) formában nyilvánul meg. A témában közzétett

publikációk nem számolnak be ettől eltérő kinetikáról, így jogosnak tartjuk a feltételezést, mely szerint az általunk megfigyelt és leírt átmeneti kategória a dúcsejtek szintjén jelenik meg először, ugyanakkor a tranziens és fenntartott válaszok elkülönítésére szolgáló határ tetszésszerű meghúzása könnyen háttérbe szoríthatja felismerését az adatelemzés során. Egy egyébként jellemzően tranziens válasz megnyúlása vagy egy fenntartott aktivitás jelentős mérséklődése (azaz egy átmeneti csoport kialakulása) alapvetően három forrásból eredhet:

1. tekintve, hogy adott dúcsejt több bipoláristól kap bemenetet, feltételezhető, hogy egyes bipolárisok tranziens, mások pedig fenntartott választ küldenek ugyanarra a dúcsejtre
2. az amakrin sejtek által létrehozott laterális gátlás képes adott dúcsejt tranzienciáját jelentős mértékben befolyásolni
3. a bipoláris bemenetek időbeni késései és/vagy azok dúcsejt dendritfán történő térbeli eloszlása könnyen eredményezhet aszinkron bipoláris bemenetet és ezáltal a dúcsejt kimeneti impulzus fenntartott tartomány felé tolódását.

A dolgozatban rögzített eredményei alapján úgy gondoljuk, kiemelten fontos, sőt, meghatározó szerep jut a dúcsejt tranziencia szabályozásában a belső retinális hálózatoknak: már a GABA-erg transzmisszó részleges felfüggesztése is jelentős mértékben befolyásolja nem csak a tranziencia kvantitativ mutatójaként alkalmazott PSTH $\tau$  értékét, de az aktivitási hisztogramon ábrázolt görbe lefutását is. Egyetlen szabályozási pont kiiktatása képes megváltoztatni a fényválasz teljes karakterisztikáját: miközben PTX hatására jellemzően a PSTH $\tau$  értékeinek csökkenését tapasztaljuk, a válasz a tranziens tartomány felé tolódik, továbbá gyakran tapasztalunk váltást fenntartott kinetikáról valódi tranziensre. A PTX kezelés egy további sajátos következménye betekintést a fenntartott válasz kialakulásának háttérmechanizmusába: a csúcs elkeskenyedését gyakran követi az elektromos aktivitás jelentős csökkenése, illetve ideiglenes megszűnése. Mindez a hisztogram tanulsága szerint egy gyors gátló hatásnak köszönhető, melynek feloldása után a fényválasz (esetenként) csökkent intenzitással tér vissza (a kontroll körülményekhez képes is). A fenntartott válasz kialakulásához tehát elengedhetetlen a GABA-erg amakrin sejtek intakt transzmissziós aktivitása, ennek hiányában a tranziencia értékek eloszlása egyértelműen a tranziens tartomány irányába tolódik el. Ezen sejtek feltehetőleg más inhibitoros sejtek gátlásával, a gátlásoldás mechanizmusával akadályozzák meg a fényválasz idő előtti kikapcsolását. A gátlásoldásra (dizinhibíció) a belső retinális neuronális hálózatok esetén bőven van lehetőség, ugyanis az amakrin sejtek inhibitoros szinapszisainak csak kis részét teszik ki a bipoláris és dúcsejtek felé irányuló gátló szinapszisok: szinaptikus kapcsolataik jelentős része más amakrin sejtek felé

irányul (Werblin 2010; Chen és mtsai 2011). Az oldalirányú gátló szabályozás akadályozása ugyanakkor már részleges formában is elegendő lehet adott dúcsejt elektromos aktivitásának növeléséhez: a picrotoxin kezelés előidézi az egy időegységre jutó akciós potenciálok számának növekedését, amely a hisztogramon magasabb amplitúdó megjelenését eredményezi. Összességében tehát a GABA-erg transzmisszió gátlása az esetek jelentős részében fókuszált, gyors választ eredményez a dúcsejt részéről, mondhatni kiiktatja a környező „zavaró” hatásokat, melyek elhúzódó elektromos aktivitáshoz és lassabban lecsengő fényválaszhoz vezetnének.

#### **5.4 A tranziencia eredete az emlős retinában**

A retinális hálózatok komplexitásából adódóan a dúcsejtekre számos bemenet érkezik akár felerősítve, akár mérsékelve vagy megszakítva az elsődleges parallel pályákon érkező eredeti üzenetet. Mindennek tudatában nem érezhetjük meglepőnek, hogy egy tetszőleges dúcsejt fényválaszának időbeli lecsengése is hasonlóan összetett, nehezen megfejtendő és többszereplős folyamat eredményeképp jön létre. A különböző kutatócsoportok lépésenként haladtak előre, újabb és újabb hipotéziseket megfogalmazva, mindig egyetlen pontot kijelölve a tranziens/fenntartott kettőség meghatározójaként. Időben elsőként az amakrin sejtek bipolárisok felől érkező bemenetére kifejtett gátló hatását feltételezték magyarázatként (Caldwell és Daw 1978; Bonaventura és mtsai. 1980), illetve dopaminerg hatás lehetséges befolyása is vizsgálatok tárgyát képezte (Jensen és Daw 1985). Később felmerült a lehetőség, hogy a tranziens és fenntartott választ produkáló dúcsejtek különböző feszültségfüggő membráncsatornákkal rendelkeznek, a tranzienciát tehát lényegében a vizsgált dúcsejt sejtmembránja definiálja (Mobbs és mtsai. 1992). Awatramani és Slaughter a különböző fiziológiájú ON-bipoláris típusokban látta a megoldást, melyek a glutamát megvonására eltérő mértékű depolarizációval reagálnának (Awatramani és Slaughter 2000). Az ionotróp glutamát receptorok is többször az érdeklődés középpontjába kerültek a tranziencia alakítását illetően (Ikeda és Sheardown 1982; Slaughter és Miller 1983; Lukasiewicz mtsai. 1995), illetve tanulmányozták a glutamát szinaptikus visszavételének kapcsolatát is a tranziens fényválaszok kialakulásával összefüggésben (Higgs és Lukasiewicz 1999; Matsui mtsai. 1999).

Zhao és kollégái a fent említett lehetőségeken túl további öt lehetséges támadási pontot jelöltek meg a tranziencia vizsgálatában (Zhao és mtsai. 2017), munkájukat azonban szűkebb, előre meghatározott dúcsejt csoportokra (illetve típusokra) alapozták. Ha figyelembe vesszük, hogy a jelenlegi legalacsonyabb becslés is 30 fölé helyezi az emlős retinában található dúcsejtek számát, felmerül a kérdés: vajon a korábbi vizsgálatok során (és jelen dolgozatban) alkalmazott



véletlenszerű mintavétel célravezető, vagy célzott dúcsejt-populációkra irányuló részletes kutatás? Míg a Zhao és munkatársai által részletesen vizsgált fényérzékeny dúcsejtek (ipRGC) nem, vagy alig mutatattak érzékenységet a GABA-erg gátlás blokádjára (Zhao és mtsai. 2017), addig saját kutatási eredményeink szignifikáns különbséget jeleznek PTX kezelés hatására. Sőt, megkockáztathatjuk, hogy talán a leglátványosabb változást jegyezhetjük kísérleteink során az amakrin sejtek hálózatába történő részleges beavatkozással. Ennél fogva kijelenthetjük, hogy bár a Zhao és munkatársai által közölt kutatómunka átfogónak tekinthető a vizsgált tranzienciát befolyásoló tényezők számbavételét tekintve, mégis csak a dúcsejtek egy kisebb (atipikus) csoportját vizsgálták. A jelen dolgozat alapjául szolgáló adatsor tehát a korábbi vizsgálatoknál jóval átfogóbb, a dúcsejtek fényválaszának kialakítására, azok kinetikájára vonatkozó általános jelenségeket vizsgál és mutat be. Munkánk értékét képezi az a tény is, hogy analízisünkhöz nem a dúcsejtek lassú potenciáljait használtuk fel (Zhao, Awatramani és DeVries patch-clamp méréseket végeztek) hanem a retina legvégső, valós kimenetétül szolgáló akciós potenciál sorozatokat.

Valószínűsíthető, hogy az egyes típusok és altípusok tekintetében tapasztalt jelentős fiziológiai és morfológiai variabilitásnak köszönhetően hosszútávon elkerülhetetlen lesz az egyes populációk egyesével történő feltérképezése, jelenleg azonban limitált hozzáféréssel rendelkezünk a típus-specifikus laboratóriumi GMO egértörzsekhez. Ez a tudományosan felettébb megosztó helyzet feltehetőleg addig nem is fog változni, amíg nem születik végső egyetértés a dúcsejt típusok (és altípusok) morfológiai/fiziológiai/molekuláris biológiai azonosítását illetően. Bár a típus-specifikus vizsgálatokból egyelőre csak kellő óvatossággal vonhatunk le következtetéseket a retinális dúcsejt-populáció teljes egészére vonatkozóan, felmerülhet a kérdés: vajon az általunk tapasztalt tranziens-fenntartott spektrum, melyet 4 különböző számítási módszer igazolt, valójában csupán a tipikus tranziencia-tartományok egybeolvadásának terméke? Mindezeket figyelembe véve Zhao és kollégái rávilágítanak arra az ismert, ám jelenleg megoldatlan problémára, hogy a tranziencia kutatásában tapasztalt ellentmondások feloldását lényegesen megnehezíti a különböző kísérleti modellállatok szintjén tapasztalt jelentős rendszertani variancia: vajon milyen mértékben vonatkoztathatjuk egy kételtű, hidegvérű szalamandrán végzett kutatómunka eredményeit egy melegvérű emlős, adott esetben a házi egér – vagy hosszabb távon az ember – fiziológiájára? Ugyanennyire fontos kérdésnek érezzük annak egyeztetését is, hogy mikor tekinthetünk pontosan egy választ tranziensnek, vagy éppen fenntartottnak? Mennyire bízhatunk a közölt adatokban, ha nincs általánosan elfogadott metódus a tranziencia meghatározására?

**A fent leírtakat összegezve kijelenthetjük, hogy:**

- 1. a tranzienciát kialakító egyéni mechanizmus nagymértékben függ attól, hogy adott dúcsejt mely dúcsejt-populáció tagja (Zhao et al. 2017);**
- 2. a tranziens/fenntartott dichotómia a retinális dúcsejtek összességét tekintve újraértelmezésre szorul (Ganczer 2017);**
- 3. nem jelölhetünk ki csupán egyetlen meghatározó tényezőt, amely a retinális dúcsejtek tranzienciáját univerzálisan és prediktálhatóan irányítja;**
- 4. a tranzienciát a dúcsejtek szintjén konvergáló és egymással interakcióba lépő szignálok együttesen határozzák meg.**

## 5.5 Kitekintés a dúcsejtek szinkronizált oszcillációs aktivitására

A szinkronizált oszcilláció (jellemzően gamma tartományba eső 20-80Hz frekvencia) funkciójának vizsgálatában Ishikane és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy az ökörbéka esetén a retinális dúcsejtek oszcillációs aktivitásának befolyásolásával erősíteni illetve gyengíteni tudják az állat menekülő magatartási reakcióját (Ishikane és mtsai. 2005). Munkájuk igazolta, hogy a GABA-erg transzmisszió (és annak megzavarása) lényeges szerepet játszik a vizsgált oszcillációs aktivitás szabályozásában, melyet a Qiu és munkatársai által publikált eredmények is megerősítettek (Qiu és mtsai. 2016). Szintén ebbe a megfigyeléssorozatba illeszkednek saját eredményeink is, melyek alapján a GABA mediálta inhibíciónak egyértelmű szerepe van a dúcsejt oszcillációk kialakításában. Mindezek ellenére úgy tűnik, az emlős és a kétéltű retina összehasonlításakor korai lenne messzemenő következtetéseket levonni: az általunk végzett kísérletek eredményei, bár nagy vonalakban átfedést mutatnak a korábbi publikációkkal, néhány jelentős különbségre világítanak rá a retina oszcillációs működéseiben. Az OFF komponens oszcillációjának hiánya az általunk végzett mérésekben érdekes kérdést vet fel. Az OFF oszcillációs aktivitás elmaradása kísérletünkben nem csak az OFF, hanem az ON-OFF sejtek fényválaszára is általános érvényűnek mutatkozott olyan esetekben is, ahol az ON komponens egyértelmű oszcillációt mutatott: bár a sejtek morfológiai azonosítására nem került sor, a fentiek értelmében biztosan kijelenthetjük, hogy a tapasztalt ON/OFF oszcillációs különbség magyarázata nem két, egymástól eltérő dúcsejt-típusban keresendő, hanem a dúcsejteket bemenettel ellátó retinális pályák működési sajátosságaiban. Már csak azért is érdekes az OFF-oszcilláció hiánya, mert az általunk is megerősített két befolyásoló tényező (GABA-erg inhibíció és elektromos szinapszisok zavartalan működése) mind az ON, mind pedig az OFF (és ON-OFF) működésű dúcsejtekre hatással van az emlős retina idegsejt-hálózatában, illetve az OFF oszcillációs aktivitást más emlősökben már sikerült leírni (Neuenschwander és mtsai. 1999). Mindezek alapján tehát szükséges olyan, további befolyásoló tényezők feltérképezése, amelyek lehetővé teszik a szinkronizált oszcilláció ON-szelektivitásának kialakítását – de legalábbis feltételezhetjük, hogy a háttérben meghúzódó mechanizmusok legalább részben eltérnek a két különböző fényválasz esetén.

Figyelembe véve az Ishikane és kollégái (Ishikane et al. 2005) által felvetett hipotézist, mely szerint az oszcillációs aktivitás fontos szerepet játszhat a közeledő ragadozó, mint veszélyforrás, felismerésében (és ezáltal a menekülési reakció kiváltásában), az oszcillációt meghatározó tényezőket érdemes lehet a fénystimulus paramétereinek változtatásában

keresünk. Ezt támasztják alá Neuenschwander és Singer korábban publikált kísérletes eredményei is (Neuenschwander és Singer 1996): bár kutatómunkájukat elsősorban a talamikus sejtek (LGN) oszcillációs aktivitására összpontosították, retinális dúcsejteken végzett méréseik szintén alátámasztották a megfigyelést, miszerint az oszcillációs aktivitás (esetükben az általában említett gamma tartományt meghaladó 60-120Hz frekvencia) kiváltásához nagyobb méretű, nem lokális és nem centralizált stimulációs kísérleti elrendezésre volt szükségük. Már ekkor előrevetítették az oldalirányú retinális kapcsolatok meghatározó szerepét is, hiszen felvételeiken megfigyelték, hogy az oszcillációs aktivitás fázisa a fénystimulus kezdetétől független.

A korábban nagyobb hangsúllyal említett GABA-erg inhibíció mellett azonban úgy tűnik, az elektromos szinapszisok működése is éppen annyira fontos szerepet játszik az oszcillációs aktivitás vezérlésében és valószínűleg meghatározó tényező a szinkronizáció kialakításában. Roy és munkatársai meggyőző érveket szolgáltatnak amellett, hogy a retina különböző – egymástól akár jelentős távolságra elhelyezkedő - pontjain bekövetkező oszcillációs aktivitás szinkronizációja az amakrin sejtek (poliaxonális amakrin sejtek példáján vizsgálva) és az általuk expresszált réskapcsolatok közvetítésével valósulhat meg (Roy és mtsai. 2017). A dolgozatban bemutatott eredmények szintén alátámasztják az elektromos szinapszisok szinkronizációban betöltött szerepét: míg a GABA-blokád elsősorban magát az oszcillációs aktivitást szünteti meg, addig az MFA alkalmazása és a réskapcsolatok zárása csupán mérsékeli annak intenzitását, miközben felborítja a kontroll körülmények között megfigyelhető koherens aktivitási mintázatot. Ismerünk továbbá adatokat arról, hogy a tárgyalt szinkronizációs oszcillációs aktivitás a viszonylag nagy stimulusméret mellett jellemzően erős intenzitású háttérvilágítás mellett jelentkezik (Saleem és mtsai. 2017; Storchi és mtsai. 2017), ez pedig további érv amellett, hogy a megfigyelt oszcilláció nem általános működési sajátosság, hanem specifikus képi információt kódol a retina működésében. Úgy tűnik, továbbá, hogy a melanopszin knockout egértörzsekben az oszcillációs aktivitás is sérül (Storchi és mtsai. 2017), így Lucas és kollégái felvázoltak egy elméletet, mely szerint a fényérzékeny retinális dúcsejtek is képesek lehetnek az oszcillációt szabályozó belső retinális hálózatokat neuromodulátorok felszabadításán keresztül befolyásolni – ugyanakkor az elmélet bizonyítást még nem nyert (Lucas és mtsai 2020).

A szinkronizáció már önmagában is érdekes és jelentős tudományos figyelmet vonzó téma az idegrendszeri működések kutatásában, az oszcillációval egybekötve azonban lehetővé teheti egy fontos vizuális funkció kódolását: a nagyméretű objektumok elkülönítése a háttértől

(Singer és mtsai. 1997). Ehhez azonban egyszerre több szabályozási folyamatnak kell megvalósulnia, melyek lehetővé teszik az az emlős retinában is megfigyelhető gamma-oszcilláció kialakítását. Érdekes összefüggésnek véljük, hogy a tranzienciát kísérleteinkben szignifikánsan befolyásoló tényezők az oszcillációra is hatással vannak: oszcillációt elsősorban fenntartott ON válaszoknál tapasztalunk, azt azonban egyelőre nem tudjuk bizonyítani, hogy a PTX kezelés során a 20-30Hz oszcilláció eltűnése egyértelműen a fényválasz tranzienssé válásának a következménye lehet-e.

**Tehát, a szinkronizált oszcilláció kialakításában részt véve mechanizmusok a következőek lehetnek:**

1. A retinális dúcsejtek szinkronizált oszcillációs aktivitásáért felelő neuronális körök a belső retinában találhatóak.
2. Az ON oszcillációs mintázatot az amakrin sejtek felől érkező GABA-erg inhibíció képes kialakítani.
3. Ahhoz, hogy az oszcillációs aktivitás képes legyen betölteni funkcióját, a dúcsejtek közötti globális szinkronizáció megvalósulása szükséges, melyet az amakrin sejtek által működtetett réskapcsolatok hálózata tesz lehetővé (fontos, hogy a kapcsolat lehetőleg közvetlen áthidalással és ne közbeiktatott sejteken átterjedve valósuljon meg; Roy és mtsai. 2017).
4. A szinkronizált oszcillációs aktivitás kiváltásához a bipoláris sejtek szintjéről érkező előzetes bemenet és a kémiai, illetve elektromos szinaptikus jelátvitel együttesen szükséges (Trenholm és mtsai. 2014).
5. Az ON és az OFF válaszok esetén az oszcilláció eltérő mechanizmussal valósulhat meg.

## 6.1 Összefoglaló

Hagyományos érzékeink közül kétségtelenül a látás az, amelyre egy átlagember leginkább támaszkodik a mindennapok során, látórendszerünk működése éppen ezért hosszú ideje foglalkoztatja a tudományt. Régóta ismert, hogy az általunk vizsgált dúcsejtek adekvát fénystimulusra két specifikus időbeli karakterisztikával reagálnak (Werblin és Downling 1969; Kaneko 1970): bizonyos esetekben a fényválasz gyors, az akciós potenciálok száma hirtelen emelkedik és a csúcsteleaktivitás elérése után szintén gyors ütemben csökken (tranziens válasz), más esetekben azonban a sejt akár stimulus teljes ideje alatt fenntarthatja elektromos aktivitását (fenntartott válasz). A tranziens/fenntartott kettősség kialakulási mechanizmusa azonban jelenleg még nem tisztázott. A dolgozat elsődleges célja volt tehát a retinális dúcsejtek tranzienciájának vizsgálata.

Munkánk során négy különböző számítási módszert hasonlítottunk össze, célunk egy megbízható és széles körben alkalmazható módszer megalkotása volt a tranziencia, mint karakterisztika számosítására. Úgy gondoljuk, az általunk PSTH $\tau$  néven jegyzett módszer, mely egyedülálló módon lehetővé teszi a dúcsejtek tranzienciájának összehasonlítását a bipoláris sejteken mért lassú potenciálokkal is (PSTH $\tau$  vs tau, mint időkonstans), megfelel a megbízhatóság és alkalmazhatóság szintjén támasztott elvárásainknak. Kísérletes eredményeink ugyanakkor arra engednek következtetni, hogy az ismert tranziens/fenntartott kettősség a dúcsejtek szintjén a feltételezettnél lényegesen összetettebb formában nyilvánul meg, ezért indokoltnak látjuk egy harmadik, korábban nem jegyzett átmeneti/köztes kategória bevezetését. Nem jelölhetünk ki továbbá egyértelmű meghatározó tényezőt a dúcsejt-tranziencia mögött: kutatómunkánk végkövetkeztetése, hogy az egyéni szabályozó mechanizmusokkal szemben a tranzienciát a dúcsejtre érkező bemenetek (vertikális parallel pályák és laterális inhibíció) együttesen és típus-specifikusan határozzák meg.

A fényválasz kinetikáját tekintve vizsgáltuk még munkánk során a dúcsejtek oszcillációs aktivitását. Bár OFF válaszok szintjén az oszcillációt az egér retinában nem sikerült kimutatnunk, az ON válaszokat tekintve kijelenthetjük, hogy az oszcillációs mintázat kialakításért elsősorban az amakrin sejtek által létrehozott laterális hatások felelősek, ugyanakkor a retina különböző pontjaira kiterjedő szinkronizációt az elektromos szinapszisok hozzák létre.

## 6.2 Summary

Out of all known sensory perceptions, an average person relies most heavily on their vision to navigate the surrounding world. Regardless of the continuous extensive research targeting our visual system, many questions remain unanswered – one of them being the matter of retinal transiency. It is a widely-known fact that retinal ganglion cells (RGCs) respond to light stimulation either through fast, burst-like (transient) action potential trains or slow, continuously maintained (sustained) activation. As of now, it is yet uncertain what the exact defining mechanism are behind RGC transiency- The main goal of this present study, therefore, was to identify which parts of the retinal circuitry define the temporal characteristics of the RGC light response.

To ensure objectivity, we introduce the PSTH $\tau$  method as a reliable and easily accessible approach for determining transiency. The PSTH $\tau$  measures the time it takes for the peak activity to drop to a pre-specified value using a mathematical constant, which can also be used to compare RGC action potential trains and bipolar cell slow potentials. Upon examining the distribution of RGC transiency values, we found no clear division between the well-known transient and sustained categories. In fact, we found an in-between population that exists between the two aforementioned groups, which calls for the reinterpretation of how we consider RGC transiency to exist in general. At the same time, we found that there is no universal defining factor in the retinal network for RGC transiency: the vertical parallel and lateral pathways all contribute to the final result which is the sum of all retinal inputs converging on the RGC in question. However, the measure by which these differing inputs (such as lateral inhibition, synchronization through gap junction, switch in parallel pathways, etc.) contribute to transiency, in turn, seems to be RGC type-specific.

We also examined the oscillatory activity (OA) found in RGCs, which can greatly affect light response kinetics. Our findings confirm that lateral signalling plays an important role in determining OA on two different levels: i) inhibition evoked through amacrine cells plays a major role in eliciting the oscillation; and ii) gap junctions are responsible for synchronizing RGC oscillation throughout the entire retina. We found no oscillation when it came to analysing the OFF components in our recordings.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Völgyi Bélának, aki témavezetőmként és a PTE-SZKK Retinális Neurobiológia Kutatócsoport vezetőjeként megteremtette a lehetőséget, hogy ez a dolgozat elkészülhessen. Köszönöm a rengeteg segítséget, mellyel a doktori tanulmányaim mellett szakmai fejlődésemet és előrehaladásomat is segítette.

Köszönöm Prof. Dr. Gábrriel Róbertnek, a PTE TTK Biológiai Intézet igazgatójának és a Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola vezetőjének, hogy a doktori képzés során kérdéseimmel bármikor bizalommal fordulhattam hozzá.

Szeretném megköszönni Dr. Dénes Viktóriának, hogy a szakmai útmutatás mellett azt is megmutatta, hogyan állhatok helyt az egyetemi oktatásban!

Köszönöm továbbá a Retinális Neurobiológiai Kutatócsoport munkatársainak mind szakmai, mind baráti segítségüket, mellyel az évek során támogattak. Köszönöm Dr. Kovács-Öller Tamásnak, akihez az elmúlt években bármikor fordulhattam és a kezdetektől fogva figyelemmel kísérte doktori tanulmányaimat. Köszönet illeti Dr. Debertin Gábort, a kutatócsoport korábbi munkatársát, aki sokat segített a retinakutatásban használt módszerek megismerésében. Köszönöm a segítséget Dr. Tengölics Ádámnak, Szarka Gergelynek és Balogh Mártonnak, akikre szintén bármikor számíthattam tanulmányaim során és mindannyian egyedi módon járultak hozzá a dolgozatban bemutatott kísérletes munka elkészültéhez.

Köszönöm az elmúlt hónapok, évek támogatását Pöstyéni Etelkának, Bolboaca Alinának, Antal Jánosné Marikának és Faragóné Papp Máriának!

A rengeteg szakmai segítség mellett szeretnék megemlékezni arról a támogatásról, melyet Édesanyámtól, Csörgő Ildikótól és családomtól kaptam egyetemi éveim során. Őszintén köszönöm, hogy a kezdetektől a befejezésig számíthattam a segítségükre!



## 8. Irodalomjegyzék

- Ahnelt P.K., Kolb H. (2000): The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(6):711-777. doi:10.1016/s1350-9462(00)00012-4.
- Ames, A., 3rd, & Pollen, D. A. (1969). Neurotransmission in central nervous tissue: a study of isolated rabbit retina. *Journal of neurophysiology*, 32(3), 424–442. <https://doi.org/10.1152/jn.1969.32.3.424>
- Arai I., Yamada Y., Asaka T., Tachibana M. (2004): Light-evoked oscillatory discharges in retinal ganglion cells are generated by rhythmic synaptic inputs. *Journal of Neurophysiology*, 92(2):715-725. doi:10.1152/jn.00159.2004.
- Asari H., Meister M. (2014): The projective field of retinal bipolar cells and its modulation by visual context. *Neuron* 81, 641–652.
- Awatramani G.B., Slaughter M.M. (2000): Origin of transient and sustained responses in ganglion cells of the retina. *Journal of Neuroscience*, 20(18):7087-7095. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-18-07087.2000.
- Badea T.C., Cahill H., Ecker J., Hattar S., Nathans J. (2009) Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron*, 61(6):852-864. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.020.
- Baden T., Berens P., Franke K., Román Rosón M., Bethge M., Euler T. (2016): The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*, 529(7586):345-350. doi:10.1038/nature16468.
- Baden T., Euler T., Berens P. (2020): Understanding the retinal basis of vision across species. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(1):5-20. doi:10.1038/s41583-019-0242-1.
- Barnstable C.J., Dräger U.C. (1984): Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience*, 11(4):847-855. doi:10.1016/0306-4522(84)90195-7.
- Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K.W. (1979): Responses of retinal rods to single photons. *Journal of Physiology*, 288:613-634.
- Bloomfield S.A., Völgyi B. (2009): The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(7):495-506. doi:10.1038/nrn2636.
- Borghuis B.G., Looger L.L., Tomita S., Demb J.B. (2014): Kainate receptors mediate signaling in both transient and sustained OFF bipolar cell pathways in mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 34(18):6128-6139. doi:10.1523/JNEUROSCI.4941-13.2014.
- Brandstätter J.H., Koulen P., Wässle H. (1998) Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Research*, 38(10):1385-1397. doi:10.1016/s0042-6989(97)00176-4.
- Bringmann A, Syrbe S, Görner K, Kacza J, Francke M, Wiedemann P, Reichenbach A. The primate fovea: Structure, function and development. *Prog Retin Eye Res*. 2018 Sep;66:49-84. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.006. Epub 2018 Mar 30.
- Buldyrev I., Puthussery T., Taylor W.R. (2012): Synaptic pathways that shape the excitatory drive in an OFF retinal ganglion cell. *Journal of Neurophysiology*, 107(7):1795-1807. doi:10.1152/jn.00924.2011.
- Castelo-Branco M., Neuenschwander S., Singer W. (1998): Synchronization of visual responses between the cortex, lateral geniculate nucleus, and retina in the anesthetized cat. *Journal of Neuroscience*, 18(16):6395-6410. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-16-06395.1998.

- Chen X., Hsueh H.A., Werblin F.S. (2011): Amacrine-to-amacrine cell inhibition: Spatiotemporal properties of GABA and glycine pathways. *Visual Neuroscience*, 28(3):193-204. doi:10.1017/S0952523811000137.
- Cleland, B. G., Dubin, M. W., & Levick, W. R. (1971). Sustained and transient neurones in the cat's retina and lateral geniculate nucleus. *The Journal of physiology*, 217(2), 473–496. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009581>
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E., & Hendrickson, A. E. (1990). Human photoreceptor topography. *The Journal of comparative neurology*, 292(4), 497–523. <https://doi.org/10.1002/cne.902920402>
- Deniz S., Wersinger E., Picaud S., Roux M.J. (2019): Evidence for functional GABAA but not GABAC receptors in mouse cone photoreceptors. *Visual Neuroscience*, 36:E005. doi:10.1017/S0952523819000038.
- DeVries S.H. (2000): Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*, 28(3):847-856. doi:10.1016/s0896-6273(00)00158-6.
- Donner, K., Yovanovich, C. (2020). A frog's eye view: Foundational revelations and future promises. *Seminars in cell & developmental biology*, 106, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.011>
- Eckhorn R., Bauer R., Jordan W., Kruse W., Munk M., Reitboeck H.J. (1988): Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biological Cybernetics*, 60(2):121-130. doi:10.1007/BF00202899.
- Euler T., Haverkamp S., Schubert T., Baden T. (2014): Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(8):507-519. doi:10.1038/nrn3783.
- Famiglietti E.V., Jr, Kolb H. (1975): A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Research*, 84:293–300.
- Farrow K., Masland R.H. (2011): Physiological clustering of visual channels in the mouse retina. *Journal of Neurophysiology*, 105(4):1516±1530.
- Farrow, K., Teixeira, M., Szikra, T., Viney, T. J., Balint, K., Yonehara, K., & Roska, B. (2013): Ambient illumination toggles a neuronal circuit switch in the retina and visual perception at cone threshold. *Neuron*, 78(2), 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.014>
- Fell J., Klaver P., Lehnertz K., et al. (2001): Human memory formation is accompanied by rhinal-hippocampal coupling and decoupling. *Nature Neuroscience*, 4(12):1259-1264. doi:10.1038/nn759.
- Field G.D., Chichilnisky E.J. (2007): Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annual Review of Neuroscience*, 30:1-30. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094252.
- Franke K., Baden T. (2017): General features of inhibition in the inner retina. *Journal of Physiology*. 595(16):5507-5515. doi:10.1113/JP273648
- Ganczer A., Balogh M., Albert L., Debertain G., Kovács-Öller T., Völgyi B (2017): Transiency of retinal ganglion cell action potential responses determined by PSTH time constant. *PLoS One*, 12(9):e0183436. doi:10.1371/journal.pone.0183436.
- Goldman D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(7), 431–442. <https://doi.org/10.1038/nrn3723>

- Grimes W.N., Songco-Aguas A., Rieke F. (2018): Parallel Processing of Rod and Cone Signals: Retinal Function and Human Perception. *Annual Review of Vision Science*, 4:123-141. doi:10.1146/annurev-vision-091517-034055.
- Grünert, U., & Martin, P. R. (2020). Cell types and cell circuits in human and non-human primate retina. *Progress in retinal and eye research*, 100844. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100844>
- Heinze, L., Harvey, R. J., Haverkamp, S., & Wässle, H. (2007). Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *The Journal of comparative neurology*, 500(4), 693–707. <https://doi.org/10.1002/cne.21201>
- Helmstaedter, M., Briggman, K. L., Turaga, S. C., Jain, V., Seung, H. S., & Denk, W. (2013). Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. *Nature*, 500(7461), 168–174. <https://doi.org/10.1038/nature12346>
- Hartline, H.K. (1938): The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *American Journal of Physiology*, 121, 400–415.
- Hecht S., Shlaer S., Pirenne M.H. (1942): Energy, Quanta, and Vision. *Journal of General Physiology*, 25(6):819–40.
- Hutchins J.B., Hollyfield J.G. (1985): Acetylcholine receptors in the human retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 26(11):1550-1557
- Ichinose T., Fyk-Kolodziej B., Cohn J. (2014): Roles of ON cone bipolar cell subtypes in temporal coding in the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 34(26):8761-8771. doi:10.1523/JNEUROSCI.3965-13.2014.
- Ishikane H., Gangi M., Honda S., Tachibana M. (2005): Synchronized retinal oscillations encode essential information for escape behavior in frogs. *Nature Neuroscience*, 8(8):1087-1095. doi:10.1038/nn1497.
- Ivanova, E., & Müller, F. (2006). Retinal bipolar cell types differ in their inventory of ion channels. *Visual neuroscience*, 23(2), 143–154. <https://doi.org/10.1017/S0952523806232048>
- Kaneko A. (1970): Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *Journal of Physiology*, 207(3):623-633. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009084.
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M., & Langmann, T. (2015). Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Progress in retinal and eye research*, 45, 30–57. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.11.004>
- Kenyon G.T., Moore B., Jeffs J., et al. (2003): A model of high-frequency oscillatory potentials in retinal ganglion cells. *Visual Neuroscience*, 20(5):465-480. doi:10.1017/s0952523803205010.
- Kolb H. (1977): The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *Journal of Neurocytology*, 6:131–153.
- Kolb H., Cuenca N., Dekorver L. (1991): Postembedding immunocytochemistry for GABA and glycine reveals the synaptic relationships of the dopaminergic amacrine cell of the cat retina. *Journal of Comparative Neurology*, 310(2):267-284. doi:10.1002/cne.903100210.
- Kolb H. (1977): Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. *Eye (Lond)*. 1997;11(Pt 6):904-923. doi:10.1038/eye.1997.230.

- Kolb H., Nelson R. (1993): OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina: II. Neural circuitry as revealed by electron microscopy of HRP stains. *Journal of Comparative Neurology*, 329(1):85-110. doi:10.1002/cne.903290107.
- Krieger B., Qiao M., Rousso D.L., Sanes J.R., Meister M. (2017): Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. *PLoS One*, 12(7):e0180091. Published 2017 Jul 28. doi:10.1371/journal.pone.0180091.
- Kuffler, S.W. (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*. 16, 37–68.
- Laurent G. (2002): Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(11):884-895. doi:10.1038/nrn964.
- Lee S, Chen L, Chen M, Ye M, Seal RP, Zhou ZJ. (2014): An unconventional glutamatergic circuit in the retina formed by vGluT3 amacrine cells. *Neuron*, 84(4):708-715. doi:10.1016/j.neuron.2014.10.021.
- Lee S.C.S., Meyer A., Schubert T., Huser L., Dedek K., Haverkamp S. (2015): Morphology and connectivity of the small bistratified A8 amacrine cell in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, 523(10):1529-1547. doi:10.1002/cne.23752.
- Li H.B., Lam D.M. (1990): Localization of neuropeptide-immunoreactive neurons in the human retina. *Brain Research*, 522(1):30-36. doi:10.1016/0006-8993(90)91573-y.
- Lindstrom S.H., Ryan D.G., Shi J., DeVries S.H. (2014): Kainate receptor subunit diversity underlying response diversity in retinal off bipolar cells. *Journal of Physiology*, 592(7):1457-1477. doi:10.1113/jphysiol.2013.265033.
- Lucas R.J., Allen A.E., Milosavljevic N., Storchi R., Woelders T. (2020): Can We See with Melanopsin? *Annual Review of Vision Science*, 10.1146/annurev-vision-030320-041239. doi:10.1146/annurev-vision-030320-041239.
- MacLeod D.I. (1972): Rods cancel cones in flicker. *Nature*, 235(5334):173–4.
- Majumdar, S., Heinze, L., Haverkamp, S., Ivanova, E., & Wässle, H. (2007). Glycine receptors of A-type ganglion cells of the mouse retina. *Visual neuroscience*, 24(4), 471–487. <https://doi.org/10.1017/S0952523807070174>
- Masland RH. (2012): The neuronal organization of the retina. *Neuron*. 76(2):266-280. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.002.
- Mangel S.C., Dowling J.E. (1985): Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine. *Science*, 229(4718):1107-1109. doi:10.1126/science.4035351.
- Menger N., Pow D.V., Wässle H. (1998): Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, 401(1):34-46.
- Michaelis E.K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*. 54(4):369-415. doi:10.1016/s0301-0082(97)00055-5.
- Münch T.A., da Silveira R.A., Siebert S., Viney T.J., Awatramani G.B., Roska B. (2009): Approach sensitivity in the retina processed by a multifunctional neural circuit. *Nature Neuroscience*, 12(10):1308-1316. doi:10.1038/nn.2389.

- Nath, A., & Schwartz, G. W. (2016). Cardinal Orientation Selectivity Is Represented by Two Distinct Ganglion Cell Types in Mouse Retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(11), 3208–3221. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4554-15.2016>
- Nelson R., Kolb H. (1985): A17: a broad-field amacrine cell in the rod system of the cat retina. *Journal of Neurophysiology*, 54(3):592-614. doi:10.1152/jn.1985.54.3.592.
- Neuenschwander S., Singer W. (1996): Long-range synchronization of oscillatory light responses in the cat retina and lateral geniculate nucleus. *Nature*, 379(6567):728-732. doi:10.1038/379728a0.
- Neuenschwander S., Castelo-Branco M., Singer W. (1999): Synchronous oscillations in the cat retina. *Vision Research*, 39(15):2485-2497. doi:10.1016/s0042-6989(99)00042-5
- Pan, F., Mills, S. L., & Massey, S. C. (2007). Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina. *Visual neuroscience*, 24(4), 609–618. <https://doi.org/10.1017/S0952523807070472>.
- Pan F., Toychiev A., Zhang Y., et al. (2016) Inhibitory masking controls the threshold sensitivity of retinal ganglion cells. *Journal of Physiology*, 594(22):6679-6699. doi:10.1113/JP272267.
- Patel A.D., Balaban E. (2000): Temporal patterns of human cortical activity reflect tone sequence structure. *Nature*, 404(6773):80-84. doi:10.1038/35003577
- Peichl L. (2005): Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 287(1):1001-1012. doi:10.1002/ar.a.20262
- Peichl, L., & González-Soriano, J. (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Visual neuroscience*, 11(3), 501–517. <https://doi.org/10.1017/s095252380000242x>
- Peng, Y. R., Shekhar, K., Yan, W., Herrmann, D., Sappington, A., Bryman, G. S., van Zyl, T., Do, M., Regev, A., & Sanes, J. R. (2019). Molecular Classification and Comparative Taxonomics of Foveal and Peripheral Cells in Primate Retina. *Cell*, 176(5), 1222–1237.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.004>
- Pourcho R.G., Goebel D.J. (1983): Neuronal subpopulations in cat retina which accumulate the GABA agonist, (3H)muscimol: a combined Golgi and autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology*, 219(1):25-35. doi:10.1002/cne.902190104
- Puthussery T., Percival K.A., Venkataramani S., Gayet-Primo J., Grünert U., Taylor W.R. (2014): Kainate receptors mediate synaptic input to transient and sustained OFF visual pathways in primate retina. *Journal of Neuroscience*, 34(22):7611-7621. doi:10.1523/JNEUROSCI.4855-13.2014.
- Qiu X.W., Gong H.Q., Zhang P.M., Liang P.J (2016):. The oscillation-like activity in bullfrog ON-OFF retinal ganglion cell. *Cognitive Neurodynamics*, 10(6):481-493. doi:10.1007/s11571-016-9397-x.
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2020). Glia of the human retina. *Glia*, 68(4), 768–796. <https://doi.org/10.1002/glia.23727>
- Rheume B.A., Jereen A., Bolisetty M., et al. (2018): Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nature Communications*, 9(1):2759. Published 2018 Jul 17. doi:10.1038/s41467-018-05134-3.
- Ripley, D. L., & Politzer, T. (2010). Vision disturbance after TBI. *NeuroRehabilitation*, 27(3), 215–216. <https://doi.org/10.3233/NRE-2010-0599>

- Rodriguez A.R., de Sevilla Müller L.P., Brecha N.C. (2014): The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *Journal of Comparative Neurology*, 522(6):1411-1443. doi:10.1002/cne.23521.
- Roy S., Field G.D. (2019): Dopaminergic modulation of retinal processing from starlight to sunlight. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 140(1):86-93. doi:10.1016/j.jphs.2019.03.006.
- Saleem A.B., Lien A.D., Krumin M., et al. (2017): Subcortical Source and Modulation of the Narrowband Gamma Oscillation in Mouse Visual Cortex. *Neuron*, 93(2):315-322. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.028.
- Sanes J.R., Masland R.H. (2015): The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annual Review of Neuroscience*, 38:221-246. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-034120.
- Singer W., Engel A.K., Kreiter A.K., Munk M.H., Neuenschwander S., Roelfsema P.R. (1997): Neuronal assemblies: necessity, signature and detectability. *Trends in Cognitive Sciences*, 1(7):252-261. doi:10.1016/S1364-6613(97)01079-6.
- Sterling P., Freed M.A., Smith R.G. (1988): Architecture of rod and cone circuits to the on-beta ganglion cell. *Journal of Neuroscience*, 8(2):623-642. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-02-00623.1988.
- Storchi R., Bedford R.A., Martial F.P., et al. (2017): Modulation of Fast Narrowband Oscillations in the Mouse Retina and dLGN According to Background Light Intensity. *Neuron*, 93(2):299-307. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.027.
- Strettoi E., Dacheux R.F., Raviola E. (1990): Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology*, 295:449-466.
- Sümbül U., Song S., McCulloch K., et al. (2014): A genetic and computational approach to structurally classify neuronal types. *Nature Communications*, 5:3512. doi:10.1038/ncomms4512.
- Tengölics Á.J., Szarka G., Ganczer A., et al. (2019): Response Latency Tuning by Retinal Circuits Modulates Signal Efficiency. *Scientific Reports*, 9(1):15110. doi:10.1038/s41598-019-51756-y
- Thoreson, W. B., Dacey, D. M. (2019). Diverse Cell Types, Circuits, and Mechanisms for Color Vision in the Vertebrate Retina. *Physiological reviews*, 99(3), 1527-1573. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2018>
- Thoreson W.B., Witkovsky P. (1999): Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(6):765-810. doi:10.1016/s1350-9462(98)00031-7.
- Trenholm S., McLaughlin A.J., Schwab D.J., Awatramani G.B. (2013): Dynamic tuning of electrical and chemical synaptic transmission in a network of motion coding retinal neurons. *Journal of Neuroscience*, 33(37):14927-14938. doi:10.1523/JNEUROSCI.0808-13.2013.
- Trenholm S., McLaughlin A.J., Schwab D.J. et al. (2014): Nonlinear dendritic integration of electrical and chemical synaptic inputs drives fine-scale correlations. *Nature Neuroscience*, 17(12):1759-1766. doi:10.1038/nn.3851.
- Trenholm, S., & Awatramani, G. B. (2019). Myriad roles for gap junctions in retinal circuits. In H. Kolb (Eds.) et. al., *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center.
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*, 51, 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>

- Vielma A.H., Retamal M.A., Schmachtenberg O. (2012): Nitric oxide signaling in the retina: what have we learned in two decades? *Brain Research*, 1430:112-125. doi:10.1016/j.brainres.2011.10.045.
- Völgyi B., Deans M.R., Paul D.L., Bloomfield S.A. (2004): Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *Journal of Neuroscience*, 24(49):11182-11192. doi:10.1523/JNEUROSCI.3096-04.2004.
- Völgyi B., Chheda S., Bloomfield S.A. (2009): Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, 512(5):664-687. doi:10.1002/cne.21912.
- Wässle H. (2004): Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10):747-757. doi:10.1038/nrn1497.
- Wehr M., Laurent G. (1996): Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature*, 384(6605):162-166. doi:10.1038/384162a0.
- Weiss, J., O'Sullivan, G. A., Heinze, L., Chen, H. X., Betz, H., & Wässle, H. (2008). Glycinergic input of small-field amacrine cells in the retinas of wildtype and glycine receptor deficient mice. *Molecular and cellular neurosciences*, 37(1), 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.08.012>
- Werblin F.S. (2010): Six different roles for crossover inhibition in the retina: correcting the nonlinearities of synaptic transmission. *Visual Neuroscience*, 27(1-2):1-8. doi:10.1017/S0952523810000076.
- Werblin F.S, Dowling J.E. (1969): Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *Journal of Neurophysiology*, 32(3):339-355. doi:10.1152/jn.1969.32.3.339
- Yan, W., Laboulaye, M. A., Tran, N. M., Whitney, I. E., Benhar, I., & Sanes, J. R. (2020). Mouse Retinal Cell Atlas: Molecular Identification of over Sixty Amacrine Cell Types. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(27), 5177–5195. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0471-20.2020>
- Zeck G.M., Masland R.H. (2007): Spike train signatures of retinal ganglion cell types. *European Journal of Neuroscience*, 26 (2):367±380. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05670.x>.
- Zhang Y., Ivanova E., Bi A., and Pan Z.H. (2009): Ectopic Expression of Multiple Microbial Rhodopsins Restores ON and OFF Light Responses in Retinas with Photoreceptor Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(29): 9186±9196.
- Zhao X., Reifler A.N., Schroeder M.M., Jaeckel E.R., Chervenak A.P., Wong K.Y. (2017): Mechanisms creating transient and sustained photoresponses in mammalian retinal ganglion cells. *Journal of General Physiology*, 149(3):335-353. doi:10.1085/jgp.201611720

## 9. Publikációs lista

### 1. Az eljárás témakörében készült publikációk:

**Ganczer A.**, Balogh M., Albert L., Debertin G., Kovács-Öller T., Völgyi B (2017): Transiency of retinal ganglion cell action potential responses determined by PSTH time constant. *PLoS One*, 12(9):e0183436. doi:10.1371/journal.pone.0183436.

Tengölics Á.J., Szarka G., **Ganczer A.**, et al. (2019): Response Latency Tuning by Retinal Circuits Modulates Signal Efficiency. *Scientific Reports*, 9(1):15110. doi:10.1038/s41598-019-51756-y

### 2. Az eljárás témakörében készült konferencia absztraktok:

**Ganczer A.**, Szarka G., Völgyi B. (2019): Gap Junction Coupled Amacrine Cell Networks Mediate Synchronized Oscillatory Spiking in Mouse Retinal Ganglion Cells. *European Retina Meeting (ERM 2019)*.

**Ganczer A.**, Szarka G., Völgyi B. (2019): Inhibiting Inner Retinal Signal Transmission Results in Sustained-to-Transient Switch in RGC Light Responses. *A Magyar Idegtudományi Társaság konferenciája (MITT 2019)*.

**Ganczer A.**, Balogh M., Völgyi B. (2017): Temporal Response Features of Retinal Ganglion Cells are Mostly Determined in the Inner Retina. *Federation of European Neuroscience Societies konferenciája (FENS 2017)*.

**Ganczer A.**, Tengölics Á.J., Völgyi B. (2017): Response Transiency of Retinal Ganglion Cells is Maintained when Input Dominance Switches Between Parallel Signalling Streams. *European Retina Meeting (ERM 2017)*.

Tengölics Á.J., **Ganczer A.**, Balogh, M., Völgyi, B. (2017): Ganglion cell responses impose a postdictive processing of Visual Signals in the brain. *Federation of European Neuroscience Societies konferenciája (FENS 2017)*.

**Ganczer A.**, Balogh M., Atlasz T., Völgyi B. (2016): Transient and Sustained Response Characteristics of Ganglion Cells are Determined in the Inner Retina. *IBRO Workshop (IBRO 2016)*.

### 3. Az eljárás témakörén kívül készült publikációk

Szarka, G., Balogh, M., Tengölics, Á. J., Ganczer, A., Völgyi, B., & Kovács-Öller, T. (2021). The role of gap junctions in cell death and neuromodulation in the retina. *Neural regeneration research*, 16(10), 1911–1920. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.308069>

Kovács-Öller, T., Szarka, G., Tengölics, Á. J., Ganczer, A., Balogh, B., Szabó-Meleg, E., Nyitrai, M., & Völgyi, B. (2020). Spatial Expression Pattern of the Major Ca<sup>2+</sup>-Buffer Proteins in Mouse Retinal Ganglion Cells. *Cells*, 9(4), 792. <https://doi.org/10.3390/cells9040792>

Kovács-Öller T., Szarka G., Ganczer A., Tengölics Á., Balogh B., Völgyi B. (2019): Expression of Ca<sup>2+</sup>-Binding Buffer Proteins in the Human and Mouse Retinal Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9):2229. doi:10.3390/ijms20092229



Kovács-Öller T., Debertin G., Balogh M., et al. (2017): Connexin36 Expression in the Mammalian Retina: A Multiple-Species Comparison. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11:65. doi:10.3389/fncel.2017.00065

Szalai R., Ganczer A., Magyar L., Matyas P., Bene J., Melegh B. (2015): Interethnic differences of cytochrome P450 gene polymorphisms may influence outcome of taxane therapy in Roma and Hungarian populations. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(6):453-456. doi:10.1016/j.dmpk.2015.08.001

Nagy A., Sipeky C., Szalai R., et al. (2015): Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations. *BMC Genetics*, 16:108. doi:10.1186/s12863-015-0262-4

Sipeky C., Weber A., Melegh B.I., et al. (2015): Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1):280-283. doi:10.1016/j.etap.2015.05.008

Sipeky C., Matyas P., Melegh M., et al. (2014): Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention. *Molecular Biology Reports*, 41(9):6105-6110. doi:10.1007/s11033-014-3488-8

#### **4. Az eljárás témakörén kívül készült nem referált konferencia absztraktok**

Tengölics Á., Albert L., Varga D., Ganczer A., Balogh M., Völgyi B.: A retinális ganglionsejt válaszok befolyásának vizsgálata a vizuális jelek posztdiktív agyi feldolgozásában, *I. Móra Nemzetközi Interdiszciplináris Konferencia* (2017)

Tengölics Á., Ganczer A., Balogh M., Völgyi B.: Ganglion cell responses impose a postdictive processing of Visual Signals in the brain, *Federation of European Neuroscience Societies konferenciája* (FENS 2017).

## 10. Függelékek

### 10.1 Függelék „A” – Az elvégzett statisztikai tesztek jegyzéke

A dolgozatban bemutatott kísérletes munka egyetlen esetben sem eredményezte a mérési adatok normál eloszlását. A normál eloszlás tesztelésére minden esetben a Kolmogorov-Smirnov (Lillefors korrekcióval) és a Shapiro-Wilk teszteket alkalmaztuk. Bár általánosságban a Shapiro-Wilk teszt esetén nagyobbak tekinthető a próba ereje, alkalmazását elsősorban alacsony elemszám ( $N < 50$ ) mellett javasolják. A normalitás tesztelését  $p < 0,05$  szignifikancia szint mellett végeztük.

A dolgozatban szereplő statisztikai tesztek					
Adatsor	Előfordulása a dolgozatban	Normál eloszlás	Teszt	Eredmény	Értékelés
ON és OFF válaszok tranzienciája	4.4 Variabilitás a retinális dúcsejtek ON és OFF kinetikájában	Nincs	Mann-Whitney-U	$<<0,01$	Szignifikáns különbség
Szkotopikus ON és fotopikus ON válaszok	4.5 A tranziencia alakulása szkotopikus körülmények között	Nincs	Wilcoxon előjelteszt	0,04	Szignifikáns különbség
Szkotopikus OFF és fotopikus OFF válaszok	4.5 A tranziencia alakulása szkotopikus körülmények között	Nincs	Wilcoxon előjelteszt	0,903	Nincs szignifikáns különbség
Párba állított szkotopikus/fotopikus ON válaszok	4.5 A tranziencia alakulása szkotopikus körülmények között	Nincs	Wilcoxon előjelteszt	0,021	Szignifikáns különbség
Párba állított szkotopikus/fotopikus OFF válaszok	4.5 A tranziencia alakulása szkotopikus körülmények között	Nincs	Wilcoxon előjelteszt	0,916	Nincs szignifikáns különbség
PTX hatása a dúcsejtek fényválaszára	4.6 Tranziencia és laterális szignalizáció	Nincs	Wilcoxon előjelteszt	$<<0,001$	Szignifikáns különbség
MFA hatása a dúcsejtek fényválaszára	4.6 Tranziencia és laterális szignalizáció	Nincs	Wilcoxon előjelteszt	$<<0,001$	Szignifikáns különbség

1. Kiegészítő táblázat: a dolgozatban feltüntetett statisztikai tesztek és eredményeik jegyzéke