B 3196

CITOSZKELETÁLIS ÉS CITOPLAZMATIKUS FEHÉRJÉK ELOSZLÁSA A VARANGY (*BUFO MARINUS*) RETINÁBAN: SEJTES LOKALIZÁCIÓ, KVANTITATIV MORFOLÓGIA ÉS NEUROKÉMIAI KÓDRENDSZER

Készítette: **WILHELM MÁRTA**
okleveles biológa-kémia szakos középiskolai tanár

Témavezető: **Dr. STRAZNICKY CHARLES**
Associate Professor,
FLINDERS UNIVERSITY of SOUTH AUSTRALIA,
Department of Anatomy and Histology

Belső konzulens: **Dr. ERDÉLYI LAJOS**
tanszékvezető egyetemi docens,
JATE Összehasonlító Állatélettani Tanszék

Szeged, 1993.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés **1. oldal**

2. Célkitűzések **8. oldal**

3. Anyagok és módszerek **9. oldal**
Immuncitokémia 9. oldal
I. a, Egyes jelölés mikrotubuloshoz kötött 2-es fehérje (MAP2) lokalizásására 9. oldal
b, MAP2-immunreaktív ganglionsejtek azonosítása 10. oldal
c, Kettős jelöléses kísérletek 11. oldal
d, Kvantitatív analízis 12. oldal
II. a, Egyes jelölések neuron-specifikus enoláz (NSE) lokalizálására 12. oldal
b, Elektronmikroszkópia 13. oldal
c, Specificitás kontroll kísérletek 15. oldal
d, Kettős jelölés gliális savas protein (GFAP) és NSE elleni antitestekkel 15. oldal
e, Kvantitatív analízis 16. oldal

4. Eredmények **17. oldal**
I. A MAP2 eloszlása a retinában 17. oldal
II. A MAP2-pozitív amakrin sejtek transzmitter tartalmának meghatározása 19. oldal
III. NSE-immunreaktivitás különböző gerinces fajok retinájában 20. oldal
IV. Kettős jelölés anti-NSE és -GFAP antitestek használatával 22. oldal
V. Fénymikroszkópia: a Müller sejtek morfológiája és eloszlása a *Bufo marinus* retinájában 23. oldal
VI. A retina neuronális elemeinek gliális szigetelése 25. oldal

5. Az eredmények megbeszélése **28. oldal**
I. A MAP2 tartalmú sejtek 28. oldal
a, Fotoreceptorok 28. oldal
b, Ganglion sejtek 30. oldal
c, Amakrin sejtek 30. oldal
II. A NSE tartalmú sejtek 32. oldal
a, A NSE-jelölődési mintázat egy lehetséges magyarázata 32. oldal
b, A *Bufo marinus* Müller sejtjeinek az emlősökétől eltérő morfológiai sajátosságai 34. oldal

6. Következtetések **40. oldal**

7. Az eredmények összefoglalása **42. oldal**

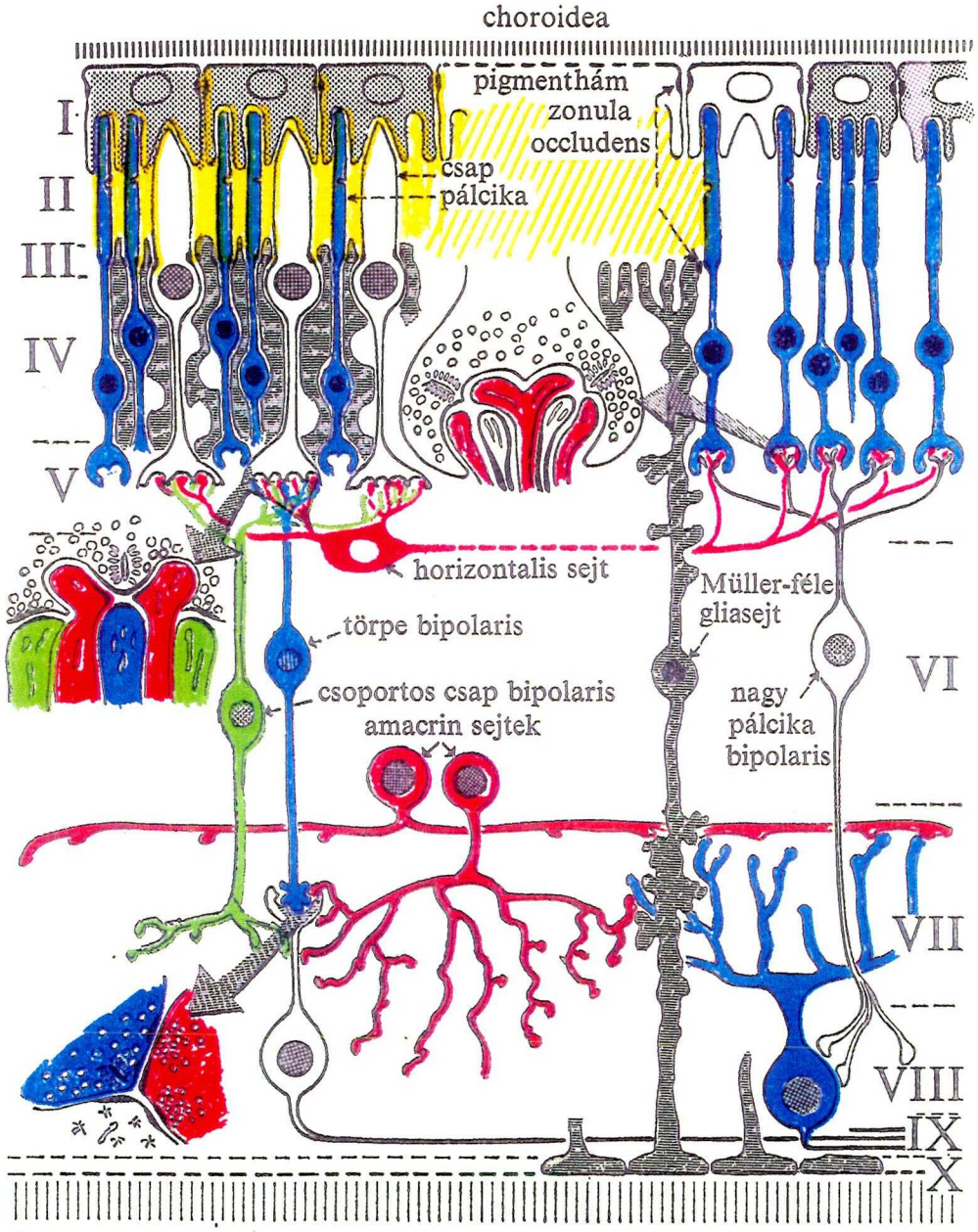
8. Irodalomjegyzék **44. oldal**

8. A disszertáció témakörével kapcsolatos saját közlemények jegyzéke **52. oldal**

1. Bevezetés

A retina a központi idegrendszer "kihelyezett" része. A szem a köztiagyból fejlődik mégpedig úgy, hogy az elsődleges szemhólyag befelé tűrődik, illetve fűződik le. A retina feladata a szembe érkező fényingerek információtartalmának elektromos jelekké alakítása, feldolgozása és továbbítása a az agyi látóközpontok felé. Elemeinek elégtelen működése illetve degenerációja esetén látáskárosodás következik be. Ezért szerkezetének és működésének pontos ismerete rendkívül fontos, hiszen az alapkutatások által nyújtott információkra építve a szem retinális eredetű betegségeire hatékonyabb gyógymódok dolgozhatók ki.

A retina szövettani szempontból vertikális rétegekre tagolható (1. ábra). A pigmenthám felől az első a fotoreceptorokat -csapok és pálcikák- tartalmazó külső sejtes réteg (outer nuclear layer; ONL), melyet a külső rostos réteg (outer plexiform layer; OPL) követ. A belső sejtes réteget (inner nuclear layer; INL) alkotja a legtöbb sejttípus. Az idegelemek közül itt találhatók az amakrin, a bipoláris és horizontális sejtek, valamint a retina legjellemzőbb gliaféleségének, a Müller sejteknek sejttestjei. Ezután a belső rostos réteg következik (inner plexiform layer; IPL), melyet a ganglion sejtek rétege követ (ganglion cell layer; GCL). Ganglion sejtek mellett ez a réteg amakrin sejteket (a szakirodalomban "displaced"-rossz helyre került- amakrin sejteknek nevezik ezt a speciális neurontípust) és mikroglia sejteket tartalmaz. Az utolsó, idegelemeket tartalmazó réteg az optikus rostok (ganglion



8/77. ábra. *A retina réteg- és neuronalis kapcsolási sémája* (*Boycott* és *Dowling* nyomán)

A *sárga* színnel jelzett terület a receptorok saját zárt szövetterét jelzi; a többi szín az elektronmikroszkópi részletek identifikációjára szolgál

1. ábra. A retina réteg- és neuronális kapcsolási sémája (Szentágothai János és Réthelyi Miklós: Funkcionális anatómia c. könyvéből)

sejtek axonjainak) rétege (optic fibre layer; OFL). Az OFL-t az üvegtesttől egy gliatalpakból álló réteg határolja le.

A fényinformáció feldolgozása több lépcsőben történik. A fotoreceptorok a bipoláris és horizontális sejtek dendritjeivel vannak szinaptikus kapcsolatban az OPL-ben, míg a bipoláris sejtek axonjai az IPL-ben ganglion és amakrin sejtekhez kapcsolódnak. A fényinger tehát legkevesebb három (fotoreceptorok, bipoláris és ganglion sejtek) retinális idegsejttípus aktiválásán keresztül hozza létre azokat az elektromos jeleket, melyek a magasabb idegi központokba jutnak.

A retinában a sejteloszlás vizsgálatakor a különböző retinaterületek között anatómiai eltéréseket találtak. Ezek leírásakor elsősorban a GCL-ben lévő sejtek eloszlását vették figyelembe. Itt ugyanis a sejtek nazotemporális irányban nagyobb sejtsűrűségű csíkot hozhatnak létre, amely a teljes retinapreparátumokon (wholemountokon) már egyszerű szövettani festéssel is kimutatható. Az ún. látócsík, amely a filogenezis során alacsonyabbrendű gerincesekben jelenik meg, a magasabbrendű állatok retinájában továbbfejlődik, area illetve fovea centralisszá. Ezek a retinális sejtsűrűség-változások valószínüleg az életmóddal is összefüggésben vannak. Erre mutatnak azok az eredmények, melyek szerint már egyes halakban is megjelenik a látócsík, illetve esetenként az area centralisra emlékeztető szervezettség (Collin 1987). Az ausztráliai gyíkok különböző fajaiban különböző fokú retinális specializációk találhatók. Egyes fajok retinájában csak gyenge látócsík van a GCL-ben,

míg más fajokban area centralis is kifejlődött (Wilhelm és Straznicky 1991, 1992). Végletes specializációként megemlítendők az *Anolis* gyíkok, melyeknek két foveájuk is van (Underwood 1951; Fite és Lister 1981). Mindezek megdöntötték azt a korábbi elképzelést, hogy a retinális specializációk megjelenése és fejlődése a törzsfejlődés vonalát követi, és hogy csak az emberszabású főemlősöknél jelenik meg a fovea centralis.

Laboratóriumunkban főként béka retinákat (*Bufo marinus* és *Xenopus laevis*) használunk kísérleteinkhez. A két állatfajnak különböző centrális specializációt mutató retinája van. A *Xenopus* retinában valamennyi sejttípus csaknem egyenletesen oszlik el a retina teljes felszinén. Ezzel szemben a *Bufo* retinájában megjelenik a látócsík, ami azt jelenti, hogy mind a ganglion sejtek, mind az amakrin sejtek a retina középső részén, nazotemporális irányban, sokkal sűrűbben helyezkednek el, mint a dorzális vagy a ventrális pólus felé (Zhang és Straznicky 1991).

A farkatlan kétéltűek retinája nem tartalmaz véredényeket; a tápláló véredények vagy az üvegtestben vagy az érhártyában futnak (Beach és Jacobson 1979; Miodonski és Bär 1987a,b). Ennek következtében nagyon valószínű, hogy ezen fajok retinájából a rostos és protoplazmás asztrocita gliák hiányoznak, és az csak Müller sejteket, mint egyetlen velőcső-eredetű glia elemet tartalmaz. A Müller sejtekben a gliasejtek általánosan jellemző neurokémiai markerei kimutathatók. Ezek pl. a gliafilamentum savas proteinje (glial fibrillary acidic protein; GFAP), a vimentin és

glutamináz enzim (Linser és Moscona 1979, 1981; Reichenbach és mtsai 1991; Ripps és Witkovsky 1985). A Müller sejtek eloszlását fénymikroszkópos szinten számos gerincesben tanulmányozták már az előbb említett markerek kimutatásával (Bignami 1984; Dräger és mtsai 1984; Dreher és mtsai 1988; Gaur és mtsai 1988; Reichenbach és mtsai 1991; Robinson és Dreher 1990; Schnitzer 1988; Vaughan és Laseter 1990).

Az emlősökben a Müller sejtek nem egyenletesen oszlanak el a retinában. A legmagasabb sejtsűrűség-értékeket a látócsík/area centralis területén találták, mely a nyúlban 15000 (Reichenbach és Wohlrab 1983; Robinson és Dreher 1990), egérben 12000 (Dräger és mtsai 1984), majomban pedig 17000 (Krebs és Krebs 1987). Ezek az értékek a retina perifériáján kb. harmadrészükre lecsökkennek. Ezzel szemben a teknős retina Müller sejtjei egyenletesen oszlanak el, és az átlagos denzitást 1600/mm^2-re becsülték (Gaur és mtsai 1988). Figyelemre méltó, hogy ugyanakkor a teknős jól fejlett látócsíkkal bír (Peterson és Ulinski 1979).

Bár korábbi közleményekben leírták a farkatlan kétéltűek jónéhány retinális sejttípusának morfológiáját, eloszlását, transzmitter tartalmát és fejlődését (Frederick és mtsai 1989; Jagger 1988; Nguyen és Straznicky 1989; Sarthy és mtsai 1981; Tóth és Straznicky 1989; Zhu és mtsai 1990), hasonló adatok a gliasejtek eloszlásáról nem álltak rendelkezésünkre.

További lendületet adott a kutatásnak, hogy az irodalomban az elmúlt néhány évben újabb citoszkeletális proteineket valamint enzimeket írtak le, melyek egyes

retinális sejttípusokban szelektíven fordulnak elő. Ilyen citoszkeletális proteinek például a mikrotubulusokhoz kötött fehérjék (microtubule-associated proteins; MAP-ok), melyek a neuronok vázának integráns részei (Herzog és Weber 1978; Matus 1988). A MAP-ok közül egyesek a szóma és a dendritek, mások az axon vázrendszerében fordulnak elő (Huber és Matus 1984). Az elképzelések szerint a MAP-ok kereszthidakként szolgálnak a neurofilamentumok és a mikrotubulusok között (Herzog és Weber 1978; Kim és mtsai 1979). A MAP-ok egyik ismert képviselője a MAP2 fehérje család, amely elsősorban sejttestekben és dendritekben fordul elő (De Camilli és mtsai 1984). Itt kapcsolják össze a citoszkeleton tubuláris és filamentáris elemeit. Ezt a C-terminálisukon lévő háromszor ismétlődő 18 aminosavból álló polipeptid-szegment teszi lehetővé úgy, hogy az a tubulinhoz kapcsolódik. A MAP2-család két nehéz (a, b) és egy könnyű (c) molekulasúlyú proteint foglal magában, melyek a törzsfejlődés során alig változnak (Viereck és mtsai 1988). A MAP2c a MAP2b-ből jöhet létre a középső peptidszekvencia kivágódásával. Ez igazolni látszik azt a korábbi felismerést, hogy a MAP2 valamennyi epitópja egyetlen gén terméke. Gerincesekben a központi idegrendszeri neuronok dendritfájának kifejlődéséhez a MAP2 nélkülözhetetlen (Binder és mtsai 1984; Garner és mtsai 1988).

A MAP2-immunreaktivitás a retinában nagyon korlátozott. Csak a nagyméretű ganglion és amakrin sejtek szómája tartalmaz MAP2-t (De Camilli és mtsai 1984; Okabe és mtsai 1989). A retina fejlődése során ugyanezen sejteket találták

MAP2-pozitívnak mind a patkányban (Okabe és mtsai 1989; Tucker és mtsai 1988), mind a fürjben (Tucker és Matus 1987). A fényérzékeny sejtek pedig a késői embrionális és a korai újszülött állapotban mutatnak MAP2-immunreaktivitást. A MAP2-tartalmú sejtek létéről és eloszlásáról nincsenek adataink a halak, kétéltűek és hüllők esetében. Az a lehetőség, hogy a különböző, már ismert transzmitter-tartalmú neuronok MAP2-immunreaktivitásuk alapján alcsoportokba sorolhatók, ezidáig még nem képezte vizsgálat tárgyát egyetlen gerinces fajban sem.

Egyike a jól ismert citoplazmatikus markereknek, a neuron-specifikus enoláz (NSE). A NSE a glikolitikus enoláz enzim (2-foszfo-D-glicerin hidroláz) idegszövet-specifikus izoenzimje, míg izoenzimpárja a nem-neuronális enoláz (NNE) van jelen minden egyéb szövetben (Cicero és mtsai 1970a; Marangos és mtsai 1979; Moore 1972, 1973). A NSE és a NNE strukturálisan különbözőek. Mindkettő két polipeptid alegység homodimerje, melyeket két különböző gén termel (Marangos és mtsai 1979). A NSE-t kimutatták már a pajzsmirigy, a hasnyálmirigy és a tobozmirigy neuroendokrin sejtjeiben, valamint a perifériás idegrendszerben is (Schmechel és mtsai 1978a, b). A NSE-t lokalizálták már számos emlős faj neuronjaiban, de a gliasejtekben sosem, mert a gliák NNE-t tartalmaznak (Pickel és mtsai 1976; Schmechel és mtsai 1978b). Ennek megfelelően a morfológiailag normális emberi retina valamennyi idegsejtjében a NSE kimutatható; ugyanakkor a Müller sejtek nem tartalmaztak NSE-t (Kivela 1986; Molnar és mtsai 1984).

A NSE azonban nem egyenletesen oszlik el valamennyi agyterület neuronjaiban. A patkány, az ember (Bishop és mtsai 1985) és a sertés (Scheuermann és mtsai 1989), valamint a teknős (Timmermanns és mtsai 1991) bélcsatornájában elsősorban Dogiel 2-es típusú neuronokban fordul elő. Bizonyos neuron populációk a patkány agytörzsben (Pickel és mtsai 1976), az egér gerincvelőben (Schmechel és mtsai 1980a) valamint az egér és patkány agykéregben (Vinores és mtsai 1984) tartalmazzák ezt az enzimet, míg mások nem. Ezek az eredmények magukban hordják azt a lehetőséget, hogy a különböző filogenetikai fejlettségű gerincesek egyes retinális neuronjai szelektíven jelölhetők anti-NSE antitesttel, s így morfológiájuk, eloszlásuk és transzmitter-tartalmuk feltérképezhető lesz.

2. Célkitűzések

Immuncitokémiai kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy

1. A MAP2 mely retinális sejttípusokban fordul elő *Bufo marinusban*.

2. A ganglionsejtek rétegében a jelölt sejtek valóban ganglionsejtek-e.

3. Milyen típusú transzmittereket tartalmaznak a MAP2-t tartalmazó sejtek.

4. Anti-NSE antitest alkalmazása esetén egy több gerinces fajt felsorakoztató összehasonlításban megállapítható-e filogenetikai trend a jelölődött sejtek típusaira és számára vonatkozóan.

5. A szelektíven jelölt Müller sejteken kívül a központi ill. a perifériás idegrendszer más gliális elemei jelölhetők-e ugyanezzel az anti-NSE antitesttel *Bufo marinus*-ban.

6. Milyen a *Bufo marinus* Müller sejtjeinek denzitási térképe, illetve fény- és elektronmikroszkópos morfológiája.

3. Anyagok és módszerek

Bufo marinus és *Xenopus laevis* békákat 12 órás világos-sötét periódusban tartottunk a laboratóriumban. *Bufo marinus*t egy Queensland-i (Ausztrália) ellátótól szereztünk be, míg a *Xenopus* faj a laboratórium tenyészetéből származott. Ivarérett 90-105 illetve 35-45 mm hosszúságú állatokat a trikain-metánszulfonát (MS222, Sigma, St. Louis, Missouri) túladagolásával öltük meg, a szemeket gyorsan kimetszettük és a retinát kiboncoltuk 0,1 M foszfát-pufferben (PB), pH 7,4-en. A fixálás 4%-os paraformaldehidben történt (0,1 M PB-ben oldva) 4°C-on, 6 órán át. GABA és glicin/MAP2 kettős jelölések esetén 0,2% glutáraldehidet adtunk a fixálóhoz. Hat-nyolc mosás után a retinákat 30%-os szacharóz-PB oldatba áztattuk, a fagyasztás közbeni károsodások kivédése érdekében. Azokat a retinadarabokat, amelyeket wholemount-ként kívántunk használni, megfagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd felolvasztottuk. Többszöri mosás után pufferelt glicerinbe (pH 8,6) helyeztük 1 órára, elősegítendő az antitestek bejutását a szövetbe. Ezután újra mosássorozat következett, majd fiziológiás sóval (0,65% NaCl) kiegészített 0.01 M PB-ben tároltuk egy éjszakán át 4°C-on. Más retinákból 12 μm-es fagyasztott metszeteket vágtunk.

Immunocitokémia

3. I. a, Egyes jelölés mikrotubulushoz kötött 2-es fehérje (MAP2) lokalizálására

Mind a metszeteket, mind a nagyobb retina darabokat előinkubáltuk az antitesthigító oldatban (0,1 M PB-ben 0,1%

nátrium-azid, 0,1% Triton X-100, 1% ovalbumin és 3% normál kecske szérum) egy órán át, majd a monoklonális MAP2 elleni antitesteket (egérben termelve, Sigma; 1:500 higítás) egy éjszakán át alkalmaztuk. Ez az antitest a MAP-ok közül csak a MAP2-t ismeri fel, de annak a, b illetve c típusú epitópjai között nem tud különbséget tenni. A reakciót kecske anti-egér antitestekhez kötött fluorescein-izotiocianáttal (FITC) tettük láthatóvá (Vector Laboratories, Burlingame, California; 1:1000-es higítás), mely oldatban két órán át inkubáltuk a metszeteket, szobahőmérsékleten. Preparátumainkat Leitz Orthoplan fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk és fényképeztük.

3. I. b, MAP2-immunreaktív ganglionsejtek azonosítása

Bizonyítandó a GCL-ben található MAP2 tartalmú neuronok ganglion sejt voltát, két állatban retrográd módon a nervus opticuson keresztül megjelöltük azokat 1,1'-didodecyl-3,3,3',3'-tetrametil-indokarbicianin perkloráttal (DiI, Molecular Probes, Eugene, Oregon). Az állatokat 0,3-0,4 ml 5%-os MS222-val elaltattuk, a jobb oldali nervus opticust átvágtuk és DiI-al (2,5 mg/ml 100%-os alkoholban oldva) feltöltött polietilén csövet húztunk rá 1 órára. Az állatokat a műtét után hűtőszekrényben tartottuk, 4°C-on. Ezek után a csövet lehúztuk, a sebet bevarrtuk. Hatvan órás túlélés után az állatokat túlaltattuk, a retinákat kipreparáltuk, majd azokból wholemountokat készítve a mintákat a fent leírt immunhisztokémiai módszerrel reagáltattuk, hogy a MAP2-pozitív sejteket láthatóvá tegyük.

SZEGED

A MAP2 jelenlétét jelző FITC a mikroszkópban zöld színnel, míg a DiI piros színnel fluoreszkált.

3. I. c, Kettős jelöléses kísérletek

A MAP2-pozitív fotoreceptorok típusának meghatározásához és a MAP2 tartalmú amakrin sejtek transzmitter tartalom szerinti karakterizálásához egy sor kettős jelöléses kisérleteket végeztünk. Valamennyi kísérletben monoklonális anti-MAP2 antitestet használtunk (egérben termelve), majd Texas Redhez (TR) kötött ló anti-egér antitesttel (Vector Laboratories; 1:50 higítás) tettük ezeket az epitopokat láthatóvá. A MAP2-vel párhuzamosan lokalizálni kívánt antigének ellen a következő antitesteket alkalmaztuk: 28kDa-os kálciumkötő fehérje (calcium-binding protein (CaBP), Spencer és mtsai. 1976; 1:1600); GABA (Immunonuclear, Stillwater, Minnesota; 1:1200); neuropeptid Y (NPY, Maccarone és Jarrott 1985; 1:800); substance P (SP, Morris és mtsai 1986; 1:1200); glicin (Chemicon, London, UK; 1:250); szomatosztatin (SOM, INCSTAR, Stillwater, Minnesota; 1:1600) és kolecisztokinin (CCK, Amersham, Sydney, Australia; 1:400). Valamennyi felsorolt antiszérumot nyúlban állították elő, az antigéneket pedig kecske anti-nyúl antitesthez kötött FITC-tal (Vector Laboratories; 1:100) tettük láthatóvá. Az elsődleges antitesteket egy éjszakán át hagytuk a metszeteken, míg a másodlagos antitestek esetében 2 órás inkubálási idővel dolgoztunk, szobahőmérsékleten.

Kontroll kísérleteinkben igazoltuk, hogy az elsődleges és a nekik fajspecificitás szerint nem megfelelő másodlagos antitestek között nem volt immunreakció.

3. I. d, Kvantitatív analízis

Valamennyi mérést FITC-tal jelölt retinákon végeztük. Camera lucida segítségével lerajzoltuk a retinákat, területüket egy HIPAD elektromos rajzasztalon mértük, mely egy Northstar számítógéppel volt összeköttetésben. Az immunreaktív sejteket 25x-ös nagyítású objektív lencsén keresztül számoltuk 1 mm-es lépésenként; az így analizált terület 0,07 mm^2 volt minden látómezőben. A teljes sejtszámot az átlagos sejtszámok segítségével számítottuk ki úgy, hogy a szomszédos denzitásvonalak közti területekre vonatkozó sejtszámokat összeadtuk.

3. II. a, Egyes jelölések neuron-specifikus enoláz (NSE) lokalizálására

Ivarérett aranyhal (*Carassius auratus*), axolotl (*Ambystoma mexicanum*), karmosbéka (*Xenopus laevis*), varangy (*Bufo marinus*), sárkánygyík (*Ctenophorus fionii*), csirke, tengerimalac, nyúl, patkány és macska egyedeket túlaltattunk, majd a szemeket kioperáltuk. Emberi szemeket a helyi szembanktól kaptunk, 4-6 órával a halál beállta után. A retinákat PB-ben (0,1 M; pH 7,4) kipreparáltuk a szemből, megtisztítottuk, majd 6 órán át 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk. Ezután többszöri mosás következett PB-ben, majd a

szöveteket 30 %-os szacharóz-PB oldatba tettük fagyasztás okozta károsodások elleni védelem céljából.

Fagyasztó mikrotómban 12-14 μm vastag metszeteket vágtunk, majd szobahőmérsékleten rászárítottuk azokat zselatinborítású tárgylemezekre. Egy nap elteltével kezdtük inkubálni a metszeteket, először 1% ovalbumin, 0,1% Triton X-100 és 0,1% nátrium-azid keverékében 30 percig, majd az anti-NSE antitestet (nyúlban termelt) cseppentettük fel (DAKO, Glostrup, Dánia; 1:1000 higítás). Egy éjszakán át tartó reakció után 0,1 M PB-ban 10 percenként 4-6 alkalommal mostuk a metszeteket, majd a reakciót kecske anti-nyúl antitesthez kötött FITC-tal (Seralab, Sussex, UK; 1:50 higítás) tettük láthatóvá. Többszöri pufferes mosás után a metszeteket lefedtük bikarbonát-pufferelt glicerinben (pH 8,6), majd vizsgáltuk és fényképeztük Leitz Orthoplan fluoreszcens mikroszkópban.

A GFAP kimutatására nyúl anti-GFAP antitestet (Sigma; 1:500 higítás) alkalmaztunk *a Bufo* retina metszetein, a fentivel azons körülmények között.

A retinametszeteken kívül, ugyancsak a fentivel azonos kísérleti körülmények között a tectum opticum, a gerincvelő, az első szimpatikus dúc és a gerincvelői második hátsó gyöki dúc elemeinek NSE immunreaktivitását is vizsgáltuk.

3. II. b, Elektronmikroszkópia

A rögzített (4% paraformaldehid és 0,1% glutáraldehid 0,1 M PB-ben; pH 7,4) retinákat 100-300 μm széles csíkokra vágtuk. Elősegítendő az antitestek megfelelő bejutását a

szövetbe, etanol és PB 1:1 arányú keverékével kezeltük a mintákat, 4x10 percig. Előinkubálás után az anti-NSE antitesteket 1:1200 higításban tettük a retinadarabokra. Többszöri pufferes mosás után kecske anti-nyúl biotinilált antitestet (Seralab; higítás 1:200) majd streptavidin-biotin-tormaperoxidáz komplexet (Seralab; 1:200 higítás) alkalmaztunk. A reakciót diaminobenzidinnel (DAB) hívtuk elő a következő eljárás szerint. A retina darabokat 0,05% DAB oldatban (0,1 M Tris-pufferben) 15 percig, majd a reakcióelegyben (0,05% DAB és 0,01% H_2O_2 Tris-pufferben) kezeltük 7-8 percig. Ezután többszöri mosás következett PB-ben, majd az utófixálást 1% OsO_4-dal (PB-ben) 1 órán át végeztük. Felszálló alkoholsor segítségével víztelenítettük az anyagokat, miközben blokk-kontrasztozást végeztünk, 70%-os alkoholban oldott uranil-acetáttal. A mintákat ezután tárgylemezen ágyaztuk be, Durcupan ACM gyantába (Fluka, Buchs, Switzerland); a gyanta polimerizációját 56°C-on 36 órás hőkezeléssel értük el. Félvékony (2 μm) és ultravékony metszeteket vágtunk, ez utóbbiakat ólom-citráttal kontrasztoztuk, majd megvizsgáltuk és fényképeztük Jeol 1200 EX (Tokyo, Japán) elektronmikroszkópban.

Más retinadarabokat 2,5%-os glutáraldehidben 3 órán át fixáltunk, s immunreakció végrehajtása nélkül rutin elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz ágyaztunk be. E retinadarabok kezelése minden egyéb tekintetben megegyezett azokéval, amelyeken immuncitokémiai reakciót is végeztünk.

3. II. c, Specificitás kontroll kísérletek

Az elsődleges anti-NSE antitest kihagyása illetve nem-immun szérummal történő helyettesítése után nem kaptunk reakciót a szöveteken.

Bizonyítani kívántuk, hogy az anti-NSE antiszérum a szövetekben lévő NSE-vel reagál, s nem a Müller sejtekben található egyéb epitopokkal. Ezért nyers proteinkivonatot készítettünk tengerimalac agyból úgy, hogy az állatokat dekapitáltuk, az agyat kipreparáltuk. Fagyasztva szárítás után azokat homogenizáltuk, majd ötszörös mennyiségű jéghideg PB-ben (0,1% nátrium-azid hozzáadásával), centrifugáltuk 15000 g-n (30 percig 4°C-on), ezután a felülúszó folyadékot újra centrifugáltuk 100000 g-n (1 órán át, 4°C-on). Az anti-NSE antitestet ehhez az extraktumhoz adtuk 1:1000 végső higításban, majd a jelölődést két óra elteltével vizsgáltuk a metszetekben, a fent leírt immuncitokémiai reakció elvégzése után.

3. II. d, Kettős jelölés gliális savas protein (GFAP) és NSE elleni antitestekkel

Retina, gerincvelő és tectum opticum fixálása, metszése, szárítása és előinkubálása után a metszeteket anti-NSE antitest (1:800; nyúlban termelt), és monoklonális anti-GFAP (Sigma, 1:200, egérben termelt) keverékében inkubáltuk egy éjszakán át, majd mostuk PB-ben. A másodlagos antitestek (kecske anti-nyúl szérum FITC-hoz kötve, 1:50 higításban alkalmazva és ló anti-egér antitestek TR-hez kötve, 1:50 higításban) két órán át voltak a mintákon, majd

ismét mosás következett. Végül pufferelt glicerinben fedtük le metszeteinket. Keresztreakció a különböző fajok immunglobulinjai ellen termelt másodlagos antitestek és a faj szerint nem megfelelő elsődleges antitestek között nem volt.

3. II. e, Kvantitatív analízis

A retinákat lerajzoltuk és területüket kiszámítottuk a korábban említettek szerint. A sejteket 150 μm x 150 μm területű a mikroszkóp szemlencséjébe helyezett kalibrált hálóval számoltuk, 0,5 mm-es lépésekkel. A mintavétel kiterjedt a teljes retina területére. Denzitás térképeket rajzoltunk, melyek segítségével meghatároztuk a teljes sejtszámot úgy, hogy az azonos denzitású területekre eső sejtszámokat összeadtuk. A 'legközelebbi szomszédok távolságát' úgy állapítottuk meg, hogy 200 sejtet kirajzoltunk camera lucidával, majd a távolságok lemérése után kiszámítottuk a sejtek közti átlagos távolságot. A rendezettségi indexet (átlag/s.d.) Wässle and Rieman (1978) szerint számítottuk ki.

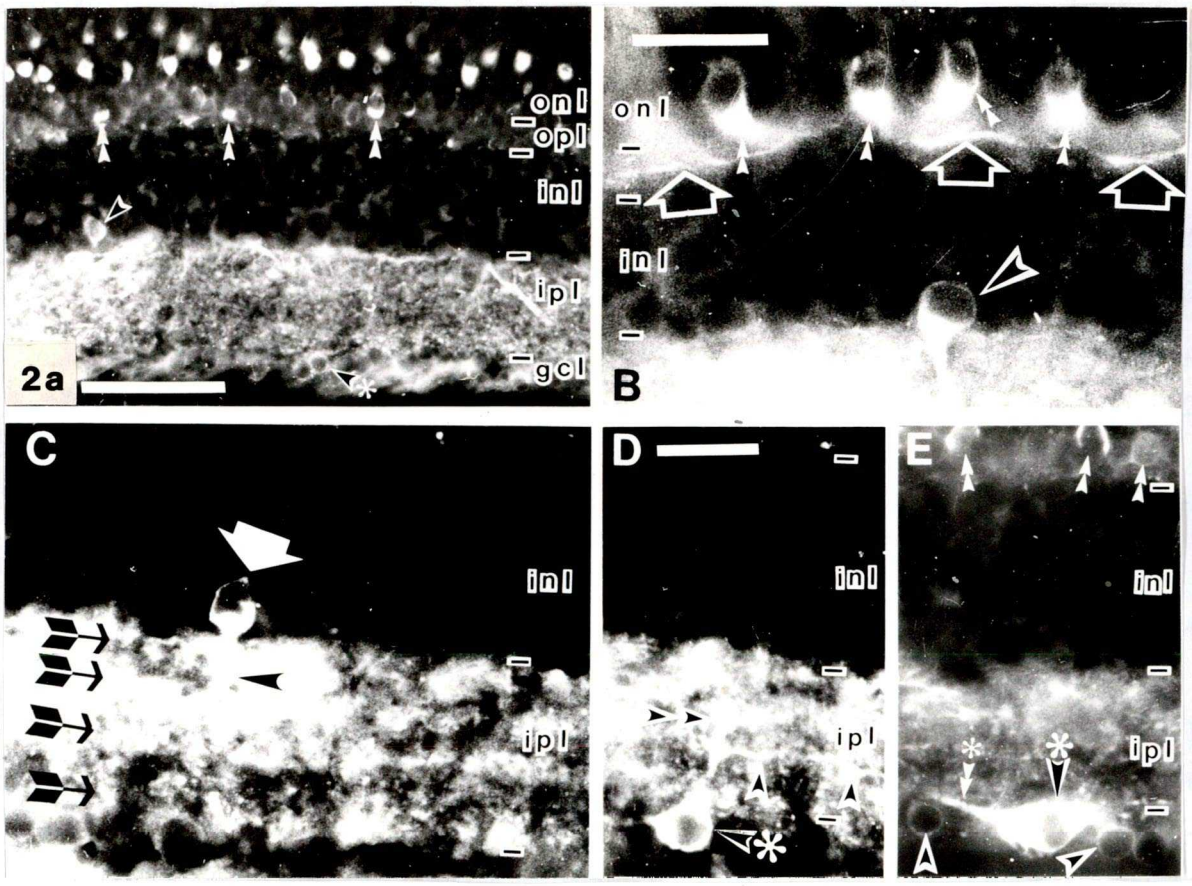
4. Eredmények

4. I. A MAP2 eloszlása a retinában

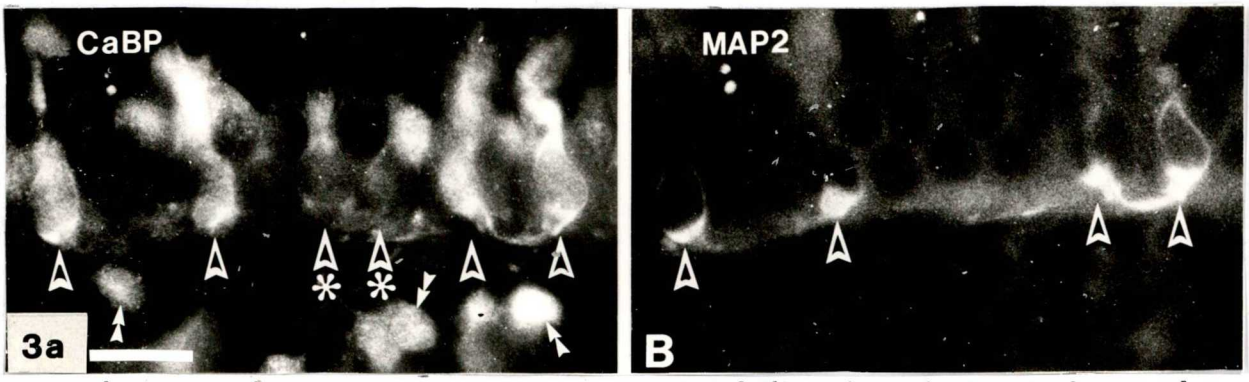
Keresztmetszeteken MAP2-pozitív sejteket a retina minden sejtrétegében találtunk. Fotoreceptorok az ONL-ben, nagyméretű amakrin sejtek (13-18 μm átmérő) pedig az INL-ben jelölődtek. A GCL-ben két sejtpopuláció volt immunpozitív. Egy erősen jelölt, nagy sejttestű (16-22 μm), és egy kisebb (7-8 μm) kevésbé intenzíven jelölt sejttömeg (2. ábra).

A jelölt fotoreceptorokat rövidebb külső szegmentjeik és az ONL-ben mélyen elhelyezkedő szómájuk alapján (2b ábra, 4a ábra betét) csapoknak tekintettük. Ezek 6-8 μm átmérőjűek; végtalpaik és telodendrionjaik szintén láthatóak voltak az OPL-ben. A CaBP elleni antitestet arra használtuk, hogy kettős jelöléssel bizonyíthassuk ezen sejtek csap mivoltát. Ismeretes ugyanis, hogy a CaBP minden csapban jelen van az emlős (Röhrenbeck és mtsai 1989), és a galamb retinában (Pasteels és mtsai 1987), és ugyancsak a csapok többségében szalamandrában (Pasteels és mtsai 1990). Ezért alkalmas markernek tűnt a csapok azonosításának céljára. Hasonlóan a szalamandrához, a *Bufo marinus* retinájában a CaBP jelen volt a csapok többségében. Valamennyi MAP2-pozitív csapsejt immunreaktív volt CaBP-re is, de nem minden CaBP-pozitív csap tartalmazott egyúttal MAP2-t is (3a,b ábra). A MAP2 tartalmú csapok rendezetten helyezkedtek el (4a ábra), amint ez a wholemount preparátumon is látszik.

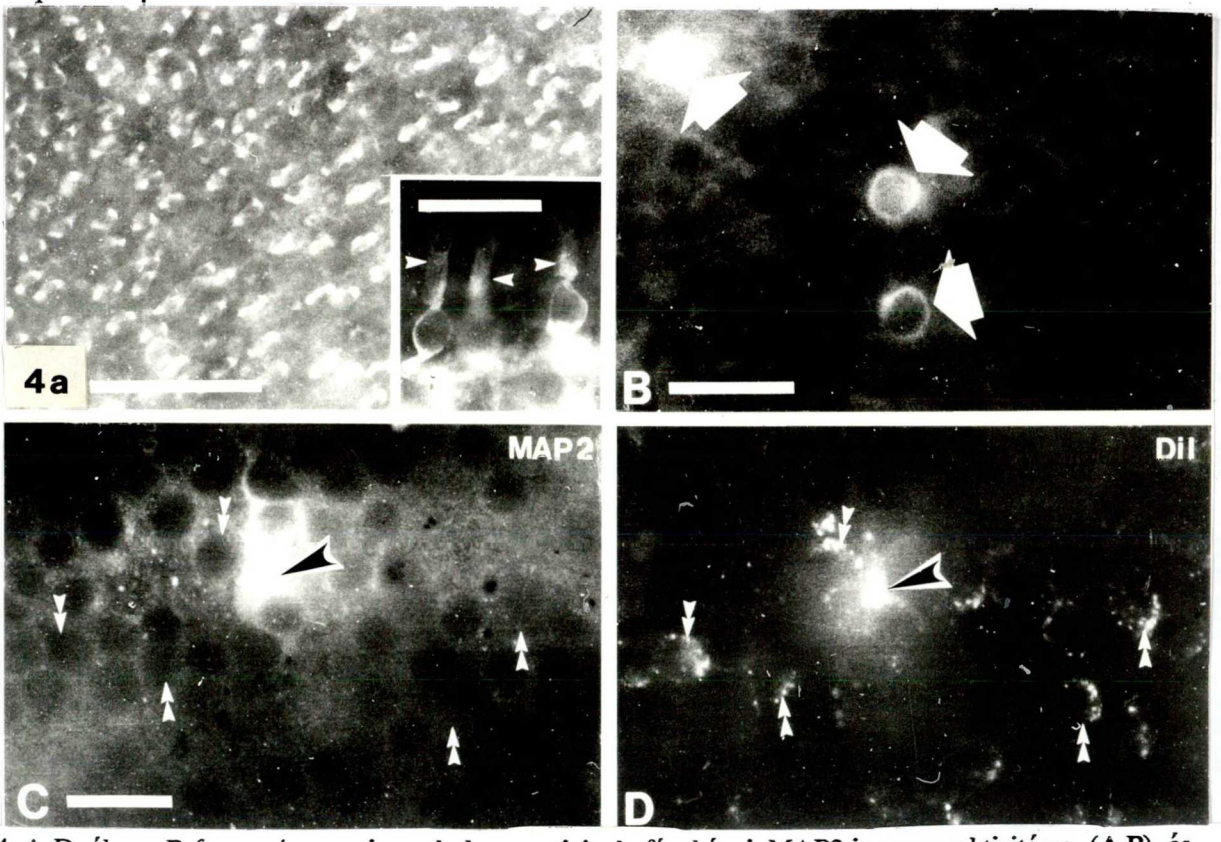
A MAP2-pozitív csapok össz-száma, melyet három retina csapjainak megszámolása alapján állapítottunk meg, 206000±12000 volt. A hozzájuk tartozó retinaterületek pedig



2 A-E ábra. MAP2-immunreaktivitás a *Bufo marinus* retina különböző rétegeiben. *onl* Outer nuclear layer; *opl* Outer plexiform layer; *inl* Inner nuclear layer; *ipl* Inner plexiform layer; *gcl* Ganglion cell layer. Ezek a rövidítések valamennyi ábrára érvényesek. A Immunreaktív fotoreceptorok (*kettős nyílhegy*) az *onl*-ben és azok nyúlványai az *opl*-ben, nagy amakrin sejtek (*nyílhegy*) az *inl*-ben és dendritjeik az *ipl*-ben, valamint nehány jelölt sejt (*nyílhegy csillaggal*) a *gcl*-ben; B Jelölt fotoreceptorok; (*kettős nyílhegy*) az *onl*-ben telodendriájuk (*üres nyílak*) hosszan elnyúlik. Egy erősen jelölt nagy amakrin sejt (*nyílhegy*) az *inl*-ben; C Jelölt nagy amakrinsejt (*nyíl*) az *inl*-ben; fődendritje (*nyílhegy*) elágazik az *ipl* disztális felében. A MAP2-pozitív rostok négy széles sávot képeznek (*nyilak*) az *ipl* megszámozott (*1, 2, 3, 4* és *5*) alrétegeiben; D Egy nagy immunreaktív ganglionsejt (*nyílhegy csillaggal*) mind proximális (*nyílhegyek*), mind disztális (*kettős nyílhegyek*) elágazó dendritfával az *ipl*-ben; E Egy nagyméretű MAP2-pozitív ganglionsejt (*nyílhegy csillaggal*) dendritjei (*kettős nyílhegy csillaggal*) az *ipl* disztális részében ágaznak el. A nyílhegy egy gyengén immunreaktív, közepes méretű sejtet jelöl a *gcl*-ben, a kettős nyílhegyek MAP2-pozitív fotoreceptorokat mutatnak. *Léptékek:* 50 µm A-ra; 40 µm B-re és C-re; 25 µm D-re és E-re.



3 A, B ábra. CaBP- és MAP2-immunreaktív csapok kolokalizációja *Bufo marinusban*. Azok a csapok, amelyek immunreaktívak CaBP (A)-ra és MAP2 (B)-ra is *nyílheggyel* jelöltek. Azok a csapok A-n, melyek *csillagos nyílheggyel* jelöltek csak CaBP-re immunreaktívak. A CaBP többféle sejttípust jelöl az *inl*-ben (*kettős nyílhegy* A-n) melyek nem mutatnak MAP2-immunreaktivitást (hasonlítsd B-hez). *Léptek:* 20 µm A-ra és B-re.



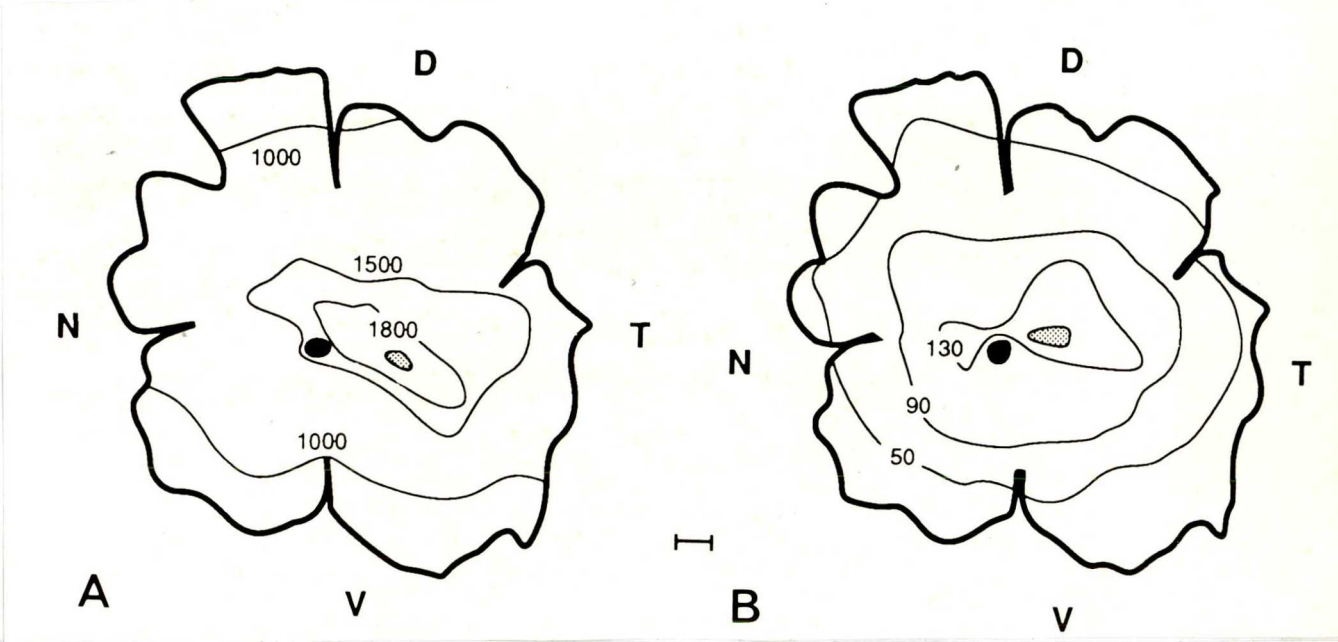
4 A-D ábra. *Bufo marinus* retina wholemountjainak fényképei MAP2-immunreaktivitásra (A-B) és anti-MAP2 antitesttel és DiI-al jelölve (C-D). A Csapok a retina központjában; A fókusz a sejttesteken van az *onl*-ben. *Betét:* Csapok a wholemount széléről. A csapok külső szegmentjei (*nyílhegyek*) csak halványan jelölődtek. B Amakrin sejtek (*nyilak*) a retina perifériájáról; a fókusz a sejttesteken van az *inl*-ben. C, D Egy nagyméretű MAP2-pozitív ganglionsejt (*nyílhegy* C-n) retrográd jelölt DiI-al (*nyílhegy* D-n). Más ganglionsejtek szintén DiI-jelöltek (*kettős nyílhegyek* D-n), de nem immunreaktívak MAP2-ra (az azonos helyeket a *kettős nyílhegyek* mutatják C-n). *Léptékek:* 100 µm A-ra, 40 µm a *betéten*; 25 µm B-re C-re és D-re.

141,7; 129,8 és 152,2 mm^2 voltak. Denzitási térképet rajzoltunk az egyik retináról, amelyben a retina centrális-temporális részén észleltük a legmagasabb csapdenzitást ($2194/mm^2$), s ez az érték lecsökkent (852-re) a retina széle felé (5a ábra). Ebben a retinában a teljes MAP2-immunreaktív csap populációt 209000-re becsültük.

Mind az INL (2b,c ábra), mind a GCL (2d,e ábra) tartalmazott MAP2-pozitív sejttesteket, a jelölt amakrin sejtek sűrűsége azonban minden retinarégióban sokkal kisebb volt, mint a fotoreceptoroké, akár metszeteken (2a,b ábra), akár wholemounton vizsgálva (4a,b; 5a,b ábra). A jelölt amakrin sejtek legsűrűbben a retina közepén helyezkedtek el ($150/mm^2$), s ez fokozatosan csökkent a periféria felé ($41/mm^2$). A MAP2-immunreaktív amakrin sejtek teljes számát 12800-ra becsültük (5b ábra). A három analizált retina átlagosan 13600±1080 jelölt amakrin sejtet tartalmazott.

A GCL-ben egy nagy sejttípus erősen jelölődött (4c ábra). Ezek a sejtek az összes GCL-beli neuronnak kb. 1-2%-át tették ki. Ezen sejtek többsége jelölhető volt DiI-al a nervus opticuson keresztül (4c,d ábra), s így ganglion sejteknek tekinthetők. Néhány MAP2-re kevéssé jelölődött sejtet is megfigyeltünk, amelyek nem töltődtek fel DiI-al, s így azokat a "displaced" amakrin sejtekhez soroltuk. A gyenge jelölődés miatt teljes számukat és retinán belüli eloszlásukat nem tudtuk megbecsülni.

Az immunreaktív rostok nem egyenletesen oszlottak el az IPL-ben. Maga az IPL öt egyforma vastagságú alrétegre osztható; az 1. és 2. a disztális OFF-szublaminához tartozó,



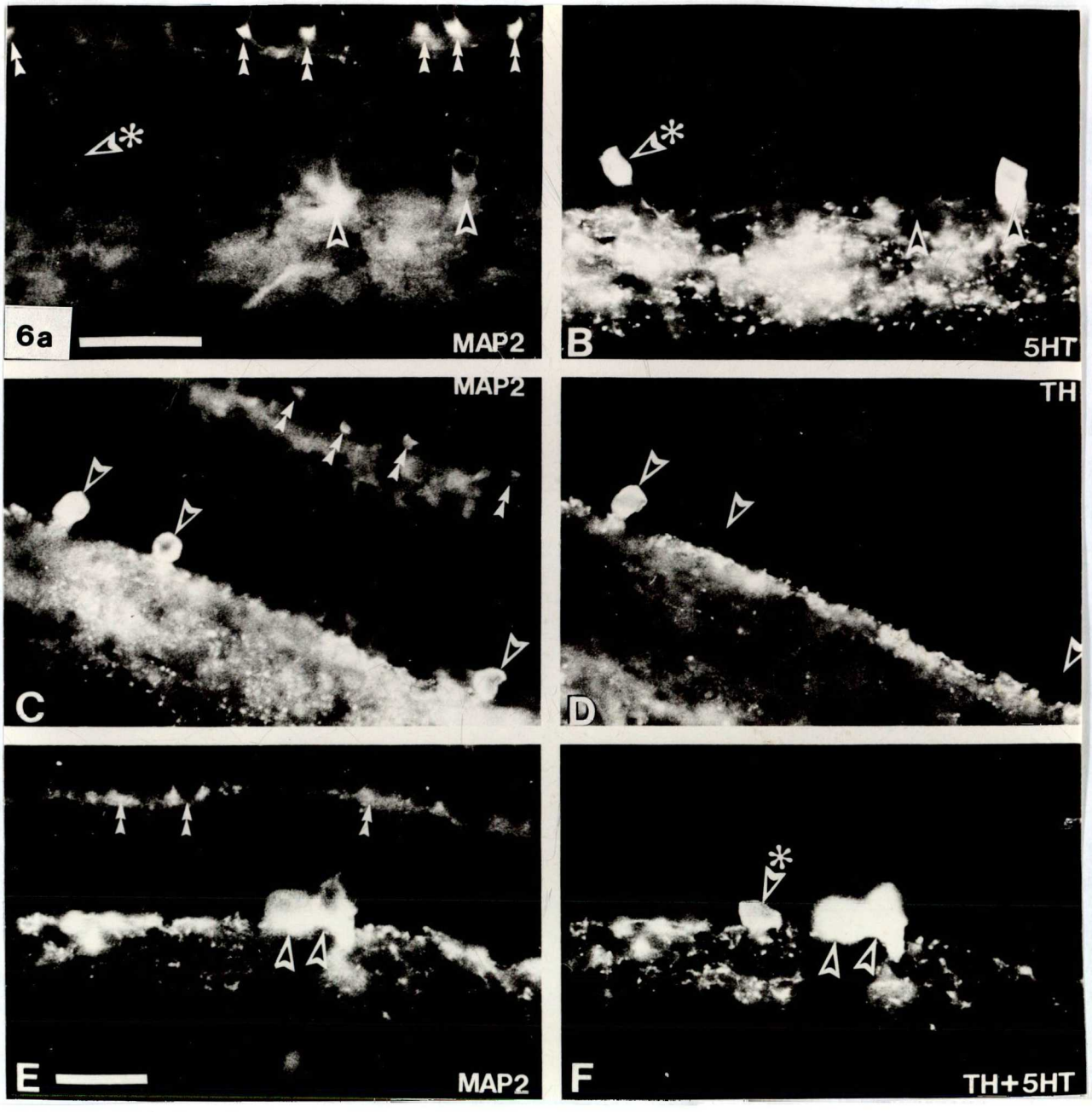
5. ábra. A MAP2-jelölt csapok (A) és amakrinsejtek (B) denzitása a *Bufo* retinában. *D* Dorzális pólus; *T* Temporális pólus; *V* Ventráwis pólus; *N* Nazális pólus; *Fekete pont* Nervus opticus helye; *Satírozott rész* a legnagyobb denzitású területet mutatja. *Lépték:* 1mm.

míg a 3., 4. és 5. a proximális ON-szublaminához tartozó rétegek a gerincesekben (az OFF-sejtek a fény kikapcsolására, az ON-sejtek annak bekapcsolására reagálnak). A MAP2-pozitív rostok négy vastag réteget formáltak; jelen voltak az 1. és a 2. rétegben, a 3-4. réteg határán, valamint az 5. rétegben (2c ábra). Néhány esetben egyes ganglion sejtek kettős (ON-OFF) elágazási rendszere jól látható volt (2d ábra). Más ganglionsejteknek egyszeres dendritelágazási rendszere volt az IPL proximális szublaminájában (2e ábra). Az immunpozitív amakrin sejtek elágazási rendszerét igen nehéz volt követni, de azok dendritjei az 1. és 2. alrétegben gyakran felfedezhetőek voltak.

4. II. A MAP2-potitív amakrin sejtek transzmitter tartalmának meghatározása

A kétéltűekben már azonosított transzmitterek elleni antitesteket próbáltuk ki (SP, NPY, SOM, GABA, CCK, glicin, 5HT és TH) kettős jelöléses kísérletekben a MAP2-vel. Csak a 5HT (6a,b ábra) és a TH (6c,d ábra) esetében kaptunk pozitív eredményt. MAP2 jelölés volt jelen a 5HT-pozitív amakrin sejtek egy részében (25-30%), míg valamennyi TH-pozitív amakrinsejt tartalmazott MAP2-t is, de a MAP2 tartalmú sejtek egy része nem tartalmazott TH-t (6c,d ábra).

Mivel csak 5HT- és TH-immunreaktív amakrin sejteket találtunk, amelyek tartalmaztak MAP2-t is, azt is fel kívántuk deríteni, hogy valamennyi MAP2-pozitív sejt immunreaktív-e vagy 5HT-re vagy TH-re; vagy esetleg bizonyos

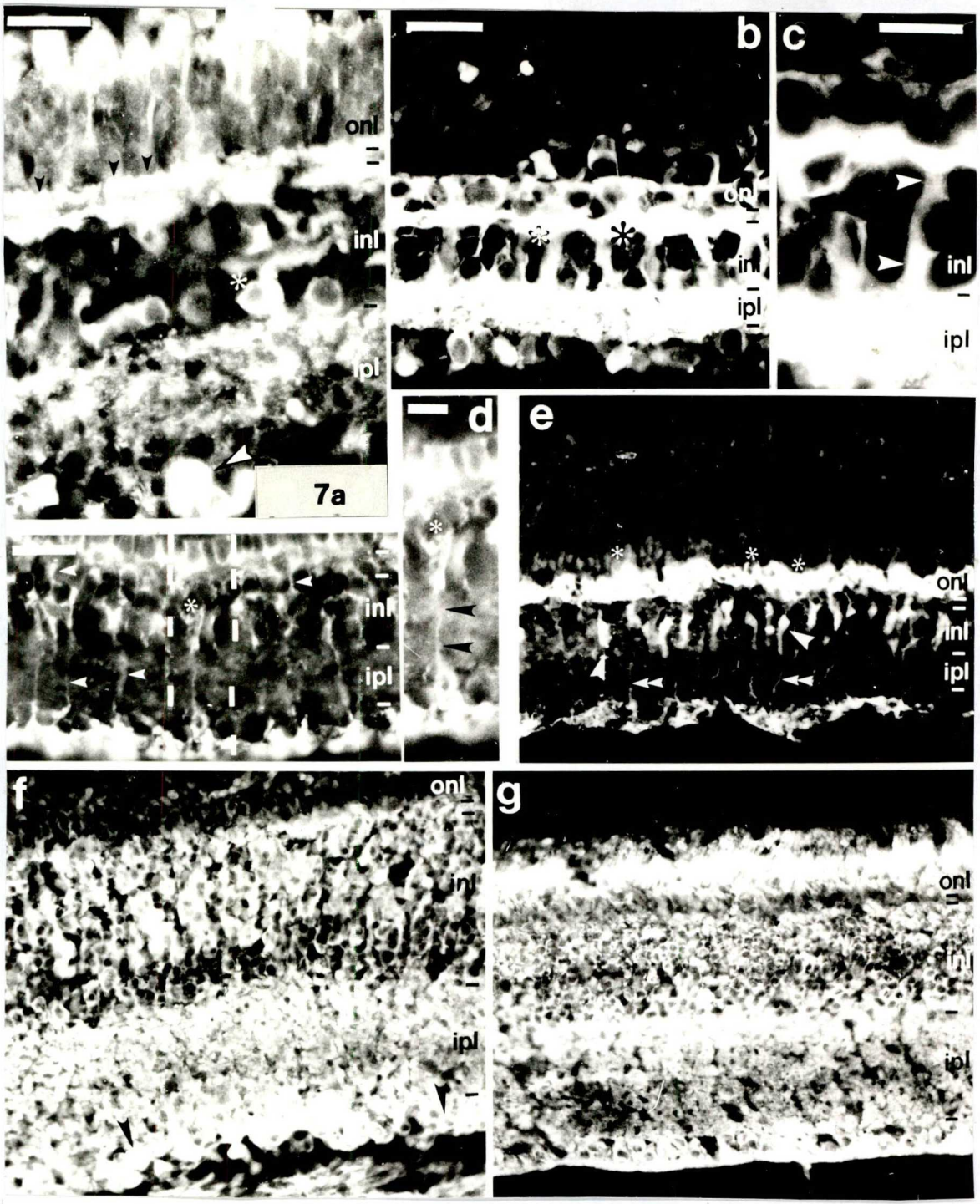


6 A-F ábra. A MAP2-tartalmú amakrin sejtek valószínű transzmittereinek megállapítása *Bufo marinus* retina keresztmetszeken. Kettős nyílhegyek a MAP2-pozitív csapokat jelölik A- C- D-n. A, B Az egyik MAP2-pozitív amakrin sejt (nyílhegyek A-n) tartalmaz 5HT-t is, míg a másikak nem (lásd B). Egy kisebb 5HT-sejt (*nyílhegy csillaggal* B-n) nem tartalmaz MAP2-t (*nyílhegy csillaggal* A-n). A három MAP2-immunreaktív sejtből (*nyílhegyek* C-n) csak egy tartalmaz TH-t (D). E, F Az összes MAP2-pozitív amakrin sejt (*nyílhegyek* E-n), kettősen jelölhető a TH+5HT antitest keverékével (*nyílhegyek* F-en). Egy kisméretű 5HT-tartalmú sejt F-en (*nyílhegy csillaggal*) nem immunreaktív MAP2-ra (E). *Léptékek:* 60 μm A-D-re; 30 μm E, F-re.

amakrin sejtek tartalmaznak eddig még nem azonosított transzmittereket? Ennek kiderítése érdekében a 5HT+TH elleni antitestek keverékét próbáltuk ki, az anti-MAP2 antitestek ellenében. Antitest keverékünk jelölte valamennyi MAP2-pozitív amakrin sejtet, bár a kis 5HT-immunreaktív amakrin sejtek nem voltak kettős jelöltek (6e,f ábra).

4. III. NSE-immunreaktivitás különböző gerinces fajok retinájában

A farkatlan kétéltűek retinájának kivételével valamennyi retinametszetben erős jelölődést tapasztaltunk nagy amakrin sejtekben, ganglionsejtekben, és horizontális sejtekben valamennyi vizsgált fajban. Az **aranyhal** retinájában a fotoreceptorok talpai és ellipszoidjai szintén jelölődtek, míg a kisméretű amakrin és ganglion sejtek csak gyenge immunfluoreszcenciát mutattak (7a ábra). Az **axolotl** retinában a legtöbb neuron NSE-pozitív volt, beleértve a fotoreceptorok sejttestjeit és belső szegmenjeit is. Emellett Müller sejtek is jelölődtek (7b,c ábra); különösen ezen sejtek vastag nyúlványai adtak erős immunreakciót (7c ábra). A **farkatlan kétéltűek** retinájában (*Bufo marinus* és *Xenopus laevis*) ezzel szemben csak az INL-beli sejtek jelölődtek. A sejtek nyúlványai az ONL és GCL felé húzódtak. Ezek a nyúlványok az ONL-ben fotoreceptor szómákat vettek körül, míg a retina belsejében mélyen lenyúltak a GCL-be, egy vastag, jól látható hálózatot alkotva (7d,e ábra). Morfológiai megjelenésük alapján e sejteket Müller-féle sejteknek tekintettük. A **gyík** retinában fotoreceptorok nem

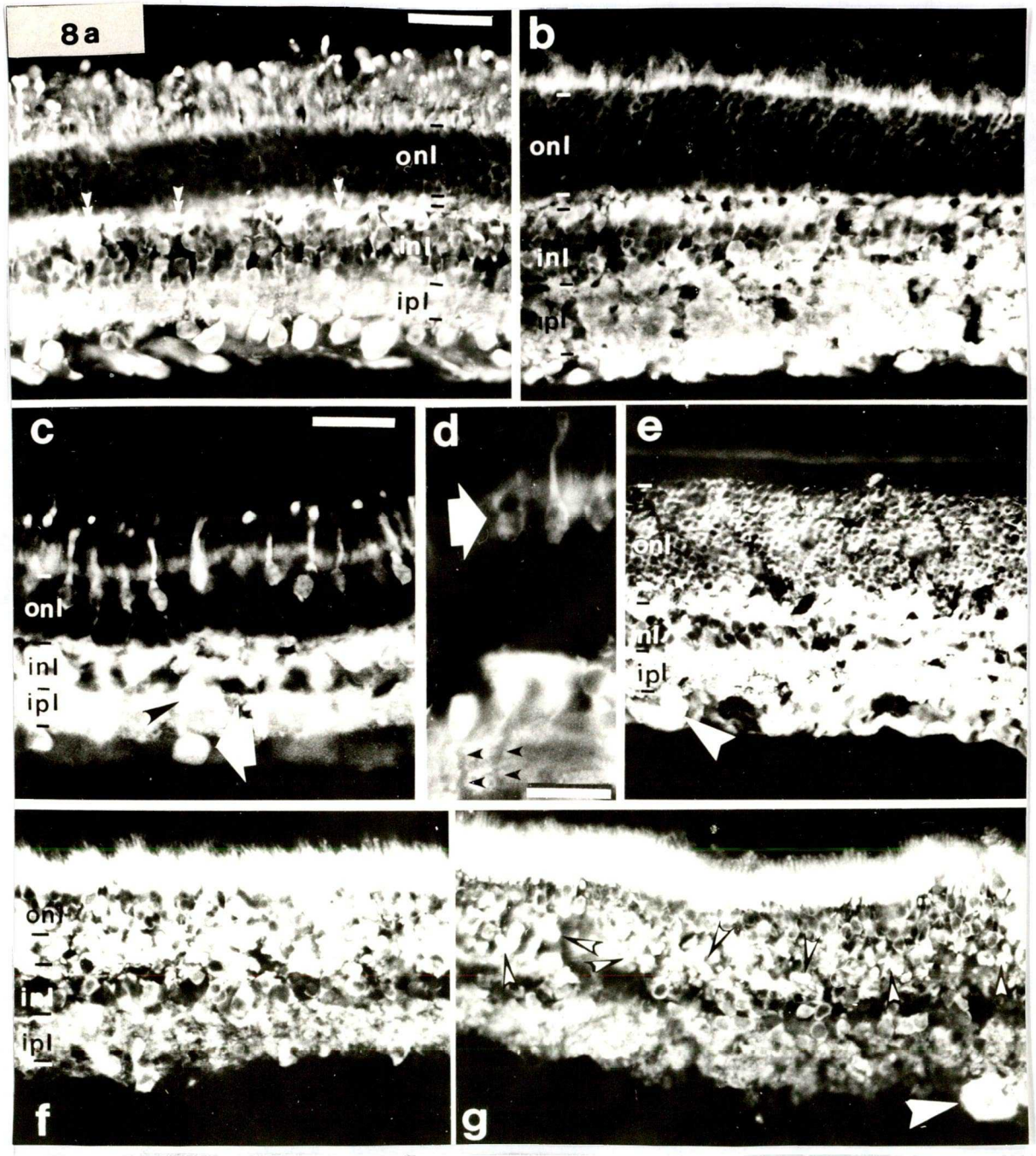


7 A-G ábra. Neuron-specifikus enoláz-szerű immunreaktivitás (NSE-LI) nem emlős fajok retináiban. A Aranyhal: fotoreceptor talpak (*kis nyílhegyek*) az *onl*-ben, nagy amakrinsejtek az *inl*-ben (*csillag*), és nagyméretű ganglionsejtek (*nagy nyílhegy*) a *gcl*-ben erősen jelöltek. B, C Axolotl. B Intenzíven jelölt horizontális sejtek (*csillagok*) az *inl*-ben. C A jelölt Müller sejtek vastag nyúlványai (*nyílhegyek*) az *onl* és *ipl* felé haladnak. D Karmos béka: immunreaktív sejttestek (egyikük *csillaggal* jelölt) az *inl*-ben és nyúlványaik (*nyílhegyek*) a külső és belső retina felé. A *betét* a szaggatott vonalakkal határolt területet mutatja erősebb nagyítással. E Varangy béka: immunreaktív sejttestek (*nyílhegyek*) láthatók az *inl*-ben, míg disztális nyúlványaik (*csillagok*) a fotoreceptorokat veszik körül. F Gyík: immunreaktív sejtek a *gcl*-ben (*nyílhegyek*) és az amakrin- és bipoláris sejtek többsége az *inl*-ben jelölődött. G Csirke: erősen immunreaktív fotoreceptorsejtek, *inl*- és *gcl*-beli sejtek. *Léptékek:* A 40 µm; B, E-G 60 µm; C 60 µm; D 40 µm és 20 µm a *betéten*.

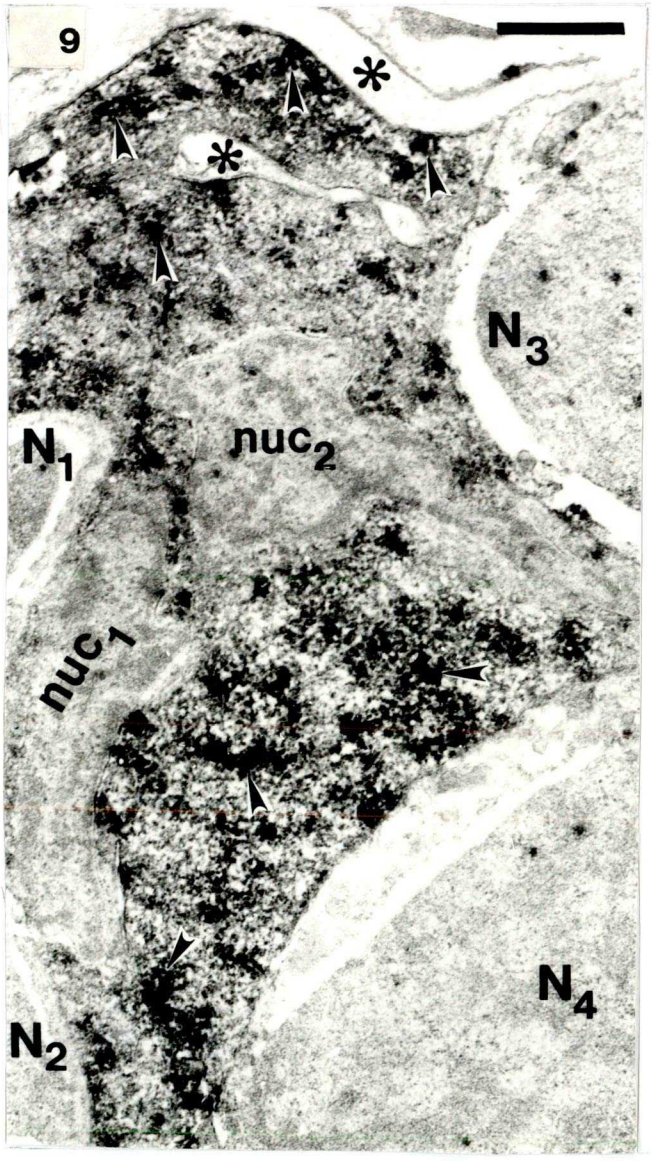
jelölődtek, míg a GCL-ben különböző mértékben immumpozitív sejteket találtunk (7f ábra). A **csirke** retinában valamennyi nagy neuron kategória sejtjei jelölődtek, beleértve a fotoreceptorokat is (7g ábra).

Az emlős fajok között **tengerimalacban** erős immunreaktivitás volt látható a nagyméretű ganglion és horizontális sejtekben, valamint a fotoreceptorok külső szegmentumában (8a ábra). **Patkányban** a legtöbb ganglion és amakrin sejt jelölődött, bár gyenge immunreakció volt a fotoreceptorokban is (8b ábra). Egy csap típus tartalmazott NSE-t a **nyúl** retina ONL-jében, valamint sok neuron jelölődött az INL-ben és a GCL-ben (8c,d ábra). A **macska** fotoreceptoraiban nem találtunk reakciót, míg a horizontális sejtek erős NSE-immunreaktivitást mutattak (8e ábra). Az **emberi** retinában legtöbb neuron, beleértve a fotoreceptorokat, NSE-pozitívnak bizonyult. A legerősebb jelölés a ganglion sejtekben és fotoreceptor végtalpakban volt (8f,g ábra).

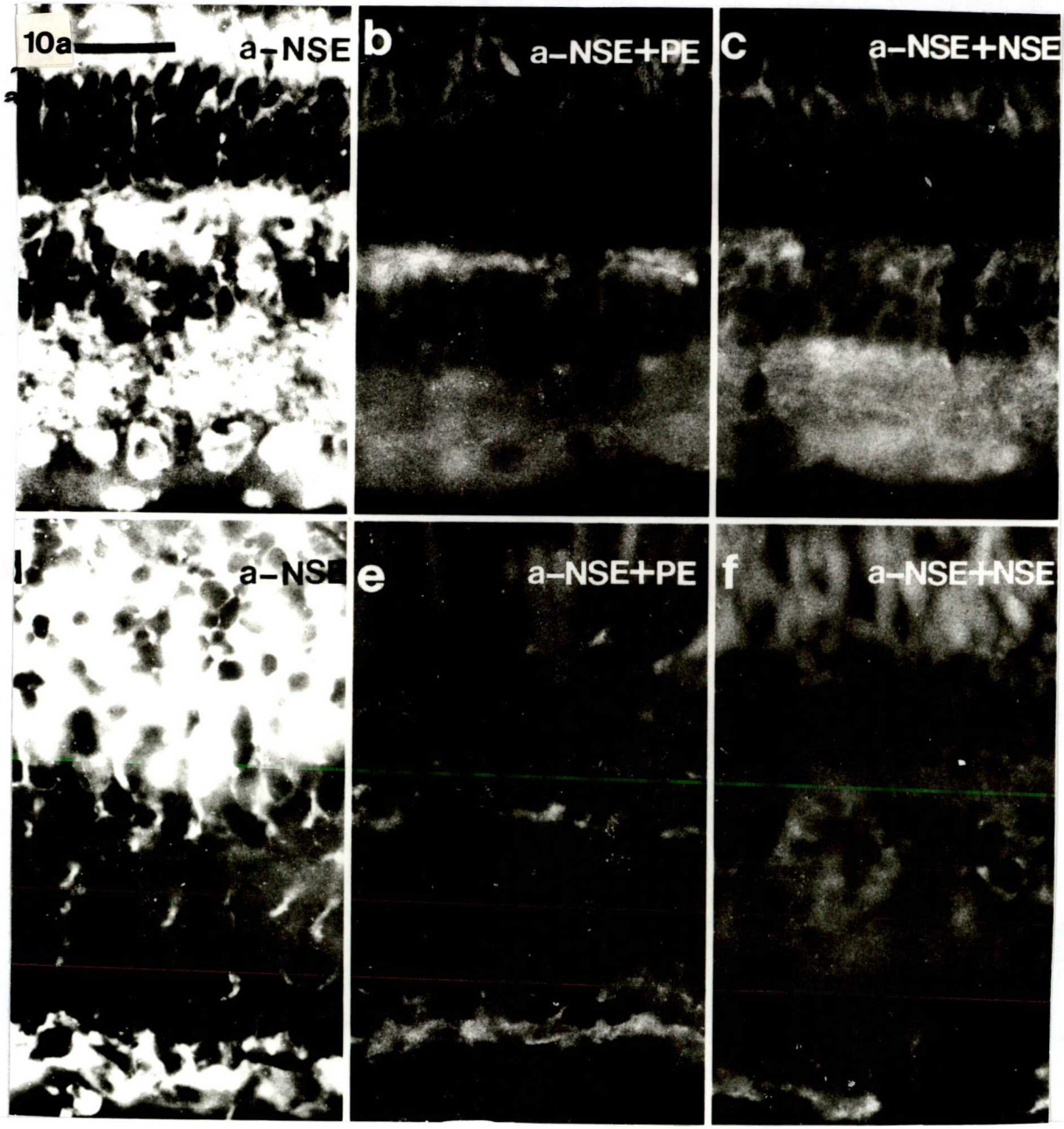
Az elektronmikroszkópos kísérletek igazolták, hogy az NSE-immunreaktív elemek Müller sejtek a *Bufo marinus* retinában. Elektronmikroszkópos szinten e sejtek lebenyes magvai jól felismerhetőek voltak. Az immunreaktivitás a sejtek citoplazmájában volt látható, míg a szomszédos neuronok nem jelölődtek (9. ábra). Az általunk használt antiszérum specificitását preabszorbciós teszttel ellenőriztük. Sem a tengerimalac, sem az emberi agy protein extraktumával preabszorbeált antiszérumok nem jelölték a tengerimalac és a varangy retina metszeteit (10. ábra).



8 A-G ábra. NSE-LI emlős retinákban. A Tengerimalac: erős jelölés látható a horizontális sejtekben (*kettős nyílhegy*) és nagyméretű ganglion sejtekben valamint néhány fotoreceptor külső szegmentjében. B Patkány: A ganglionsejtek és amakrinsejtek többsége jelölt az *inl*-ben; megjegyzendő a fotoreceptorok gyenge jelölődése. C, D Nyúl. C Legtöbb neuron jelölt az *inl*-ben (*nyílhegyek*) és a *gcl*-ben (*nagy nyíl*). D Egyféle csap típus (*nyíl*) jelölt az *onl*-ben; azok a helyek, ahol jelöletlen Müller sejt nyúlványok futnak az *ipl*-ben (*nyílhegyek*), jól láthatók. E Macska: a legtöbb neuron, kivéve a fotoreceptorokat, immunpozitívak. F, G Ember: Erős jelölődés látható a fotoreceptor talpakban, amakrinsejtekben (*nyílhegyek*) és nagy ganglionsejtekben (*nyilak*). *Léptékek:* A, B E-G 60 μm; C 60 μm; D 40 μm.



9. ábra. Elektronmikroszkópos felvétel *Bufo marinus* egy NSE-LI-t mutató sejtjéről. A Müller sejtekre jellemző lebenyezett mag részei (nuc_1 és nuc_2) jól láthatók. Foltokban diamino-benzidin lerakódások láthatók a citoplazmában (*nyilak*) a Müller sejt jelöletlen neuronokkal van körülvéve (N_1, N_2, N_3 és N_4). *Csillag*: idegrostok az *inl*-ben. *Lépték*: 1000nm.

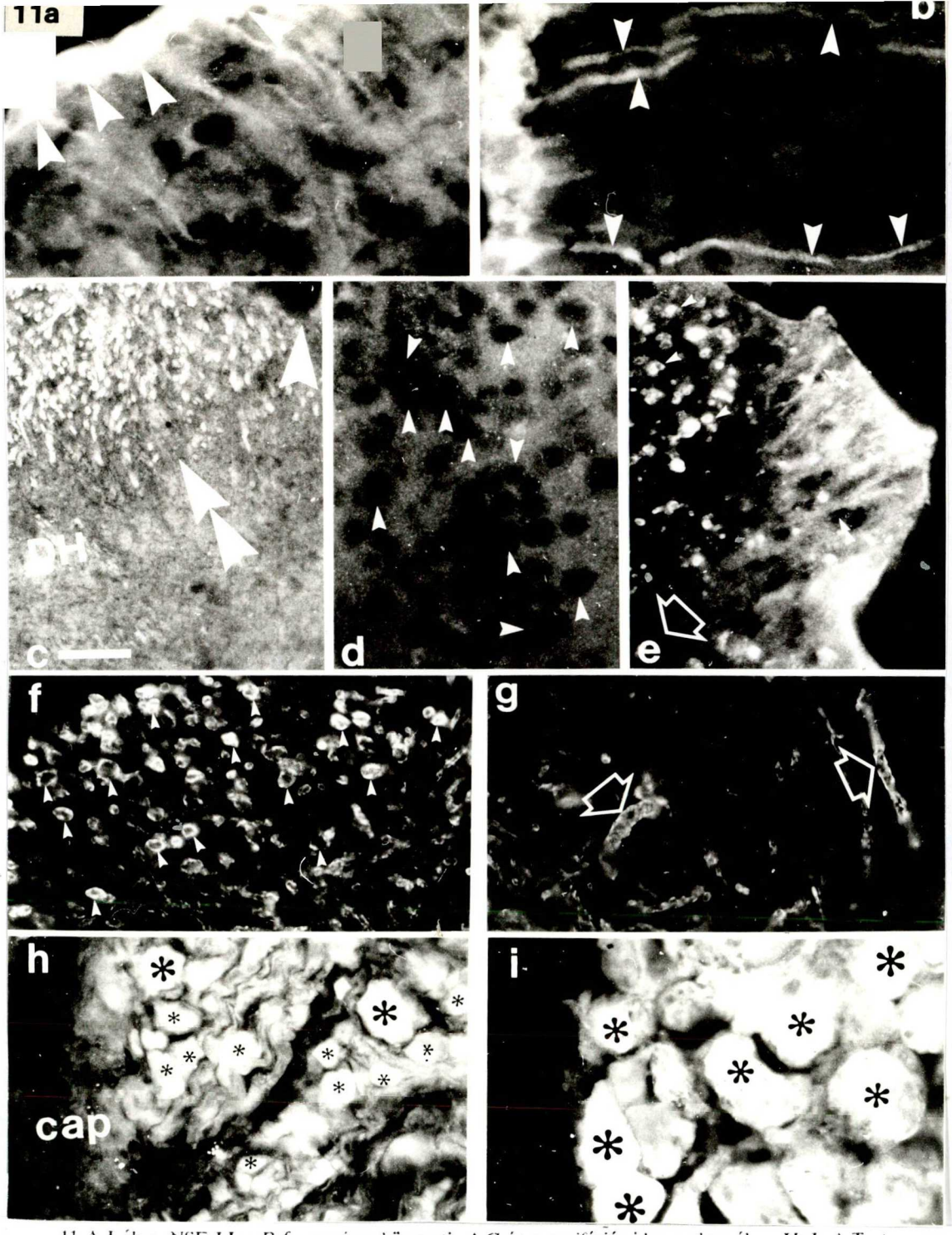


10 A-F ábra. Preabszorpciós kontroll kísérletek az anti-NSE antitest specificitására vonatkozóan. A Tengerimalac retina idegsejtjei jelölődtek az anti-NSE antitesttel (a-NSE). B Tengerimalac retina. Anti-NSE antitest preabszorbeáltatva a tengerimalac agy protein extraktumával (a-NSE+PE); nincs látható jelölés. C Tengerimalac retina. Anti-NSE antitest preabszorbeáltatva emberi agy protein homogenizátumával (a-NSE+NSE); nincs látható reakció. D *Bufo* retina anti-NSE antitesttel jelölve (a-NSE). E *Bufo* retina. Anti-NSE antitest preabszorbeáltatva tengerimalac agy protein extraktumával jelölve (a-NSE+PE); nincs reakció. F *Bufo* retina. Anti-NSE antitest preabszobeáltatva emberi agy

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 13

Miután bizonyítottuk, hogy az általunk használt antiszérum specifikusan Müller sejteket jelöl a *Bufo marinus* retinában, a központi idegrendszer más területeit, úgymint a tectum opticumot és a gerincvelőt is megvizsgáltuk azzal a céllal, hogy kimutassuk a NSE gliaelemekben való lokalizációját. Feltételezésünket a kísérleti eredmények igazolták; mindkét idegrendszeri területen csak gliaelemek (ependimogliális sejtek és oligodendrogliák) jelölődtek, míg neuronális elemek nem mutattak immunreaktivitást (11a ábra). A sejtek radiális nyúlványai követhetőek voltak a tectum opticum teljes vastagságában (11a,b ábra). Bár az elsődleges érző neuronok a gerincvelő hátsó szarvába befutó axonjai jelölődtek (11c ábra), maguk a gerincvelői neuronok nem mutattak immunreaktivitást. A jelöletlen neuronok mint fekete lyukak voltak láthatóak a szürkeállományban (11d ábra), ugyanakkor finom, radiálisan futó rostok jelölődtek a fehérállományban, amik a pia mater felőli felszínen gliarost-hálózatban végződtek (11e ábra). A gerincvelő fehérállományában az axonok mielinhüvelyei (11f ábra), valamint a szürkeállománybeli véredények asztrocitatalpakból álló hüvelyei szintén NSE-pozitívok voltak (11g ábra).

A központi idegrendszerrel ellentétben a vizsgált autonóm idegrendszeri (első szimpatikus) dúcban és érző (második hátsó gyöki) dúcban nem a gliaelemek, hanem a neuronok mutattak NSE-immunreaktivitást, míg a glielemek nem jelölődtek anti-NSE antitesttel (11h,i ábra).



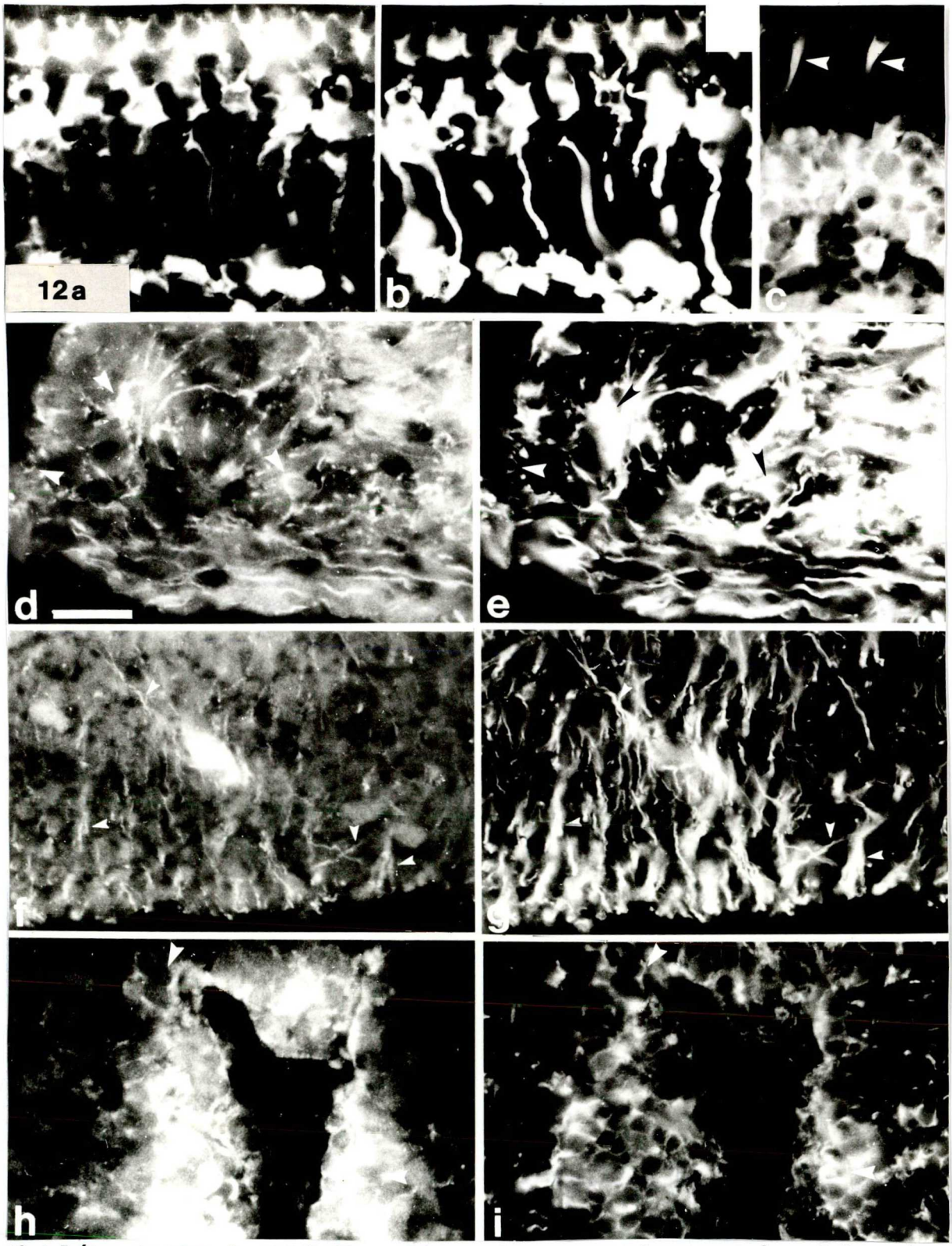
11 A-I ábra. NSE-LI a *Bufo marinus* központi- A-G és a perifériás-idegrendszerében H, I. A Tectum opticum: az ependimogliális sejtek, melyek az optikus agykamra mentén helyezkednek el, jól láthatóan jelöltek (*nyílhegyek*). B Az ependimogliális sejtek hosszú nyúlványai (*nyílhegyek*) a tectumban. C Gerincvelő: a hátsó (dorzális) szarvval (*DH*) szomszédos elsődleges érzékelő neuronok axonkötegei jelöltek (*kettős nyílhegyek*); *nyílhegy*: sulcus medialisposterior. D A gerincvelő szürkeállományában a nem jelölt neuronok, mint fekete lyukak láthatók (*kis nyílhegyek*). E Jelölt glia elemek a fehérállományban; finom rostjaik (*kettős nyílhegyek*) behatolnak a szürkeállományba. Az oligodendrogliák által képzett mielinhüvelyek szintén jelöltek (*nyílhegyek*); az *üres nyíl*, a canalis centralis irányába mutat. F NSE-LI mielinhüvelyek (*nyílhegyek*) a fehér állomány ventromediális részén. G NSE-LI glia végződésekkel körülvett véredények (*üres nyilak*) a szürke állományban, közel a canalis centralishoz. H Első szimpatikus ganglion: a neuronok (*csillagok*) jelölődtek. I Második dorzális gyökér ganglion: csak neuronok jelölődnek (*csillagok*). *Léptékek:* A, B, E, F és G 30 μm;

4. IV. Kettős jelölés anti-NSE és -GFAP antitestek használatával

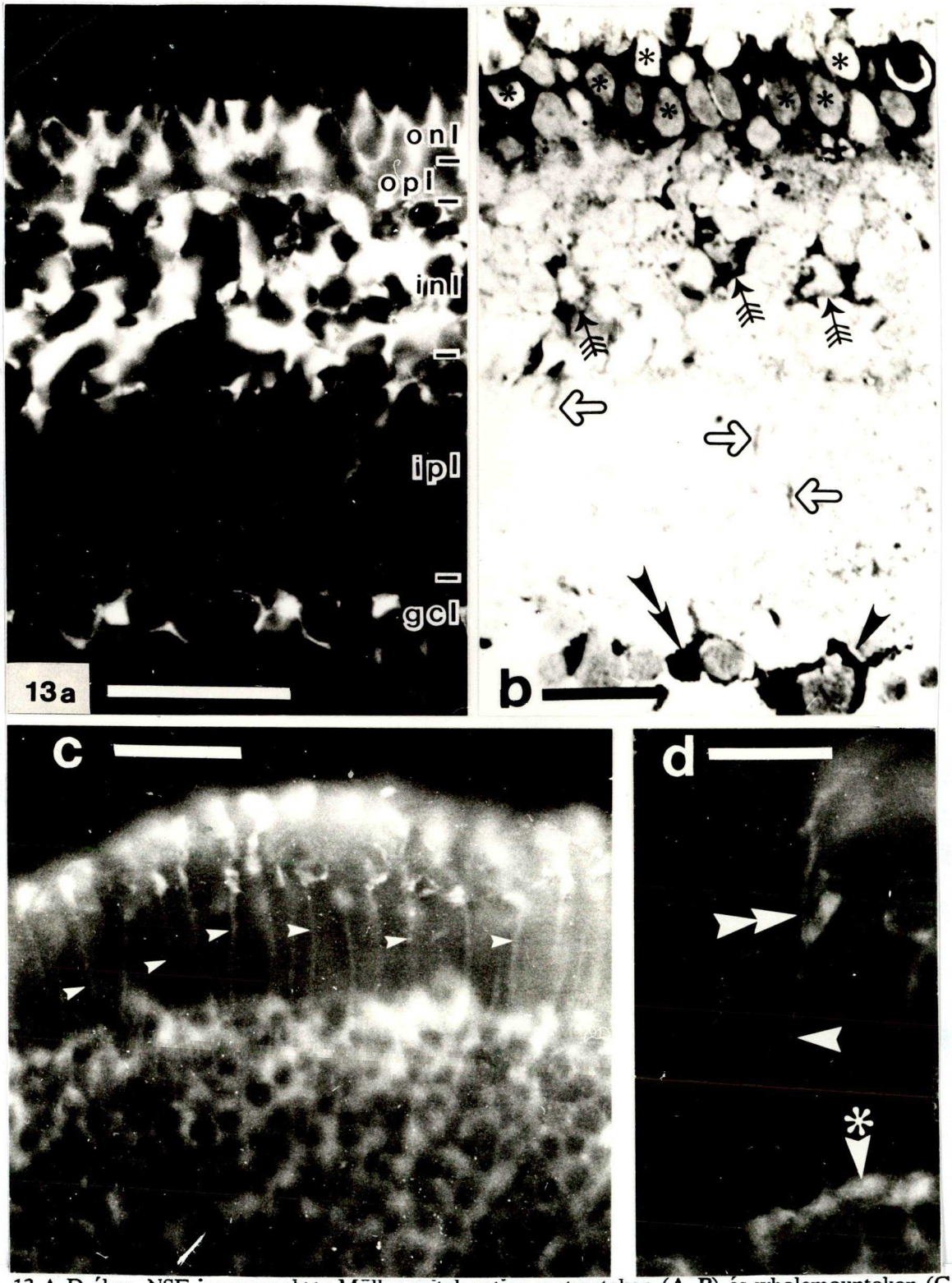
NSE- és GFAP-immunreaktivitás jelen volt a Müller sejtekben a *Bufo marinus* retina minden rétegében (12a,b ábra). Míg a monoklonális anti-GFAP antitest csak Müller sejteket, addig a poliklonális anti-GFAP antitest horizontális és kisméretű pálcika fotoreceptor sejteket is jelölt próbakísérleteinkben (12c ábra). Ez a jelölési mintázatbeli különbség a mono- és poliklonális anti-GFAP antitestek között valószínűleg a poliklonális anti-GFAP antitest vimentinnel való keresztreakciójának köszönhető (a vimentin egy másik típusú átmeneti filamentum anyaga). A vimentint már korábban kimutatták hal (Vaughan és Laseter 1990) és egér (Dräger 1983) horizontális sejtjeiben, de fotoreceptorokban még nem. A tectum opticumban az NSE-immunreaktív gliasejtek többsége GFAP-pozitív volt (12d,e ábra). Bár a GFAP sokkal erősebb jelölést adott, az immunpozitív struktúrák mindkét antitest esetében jól láthatóak voltak. A gerincvelőben is mind a gliális eredetű rostok, mind a központi csatorna falának ependimogliális sejtjei kettősen jelölődtek (12f,g ábra h,i ábra).

*4. V. Fénymikroszkópia: a Müller sejtek morfológiája és eloszlása a **Bufo marinus** retinájában*

Retina keresztmetszeteken a Müller sejtek mind fluoreszcens (13a ábra), mind DAB-bal előhívott immuncitokémiai preparátumokon erősen jelölődtek (13b ábra). A jelölt sejttestek az INL közepén voltak láthatók; a sejtek



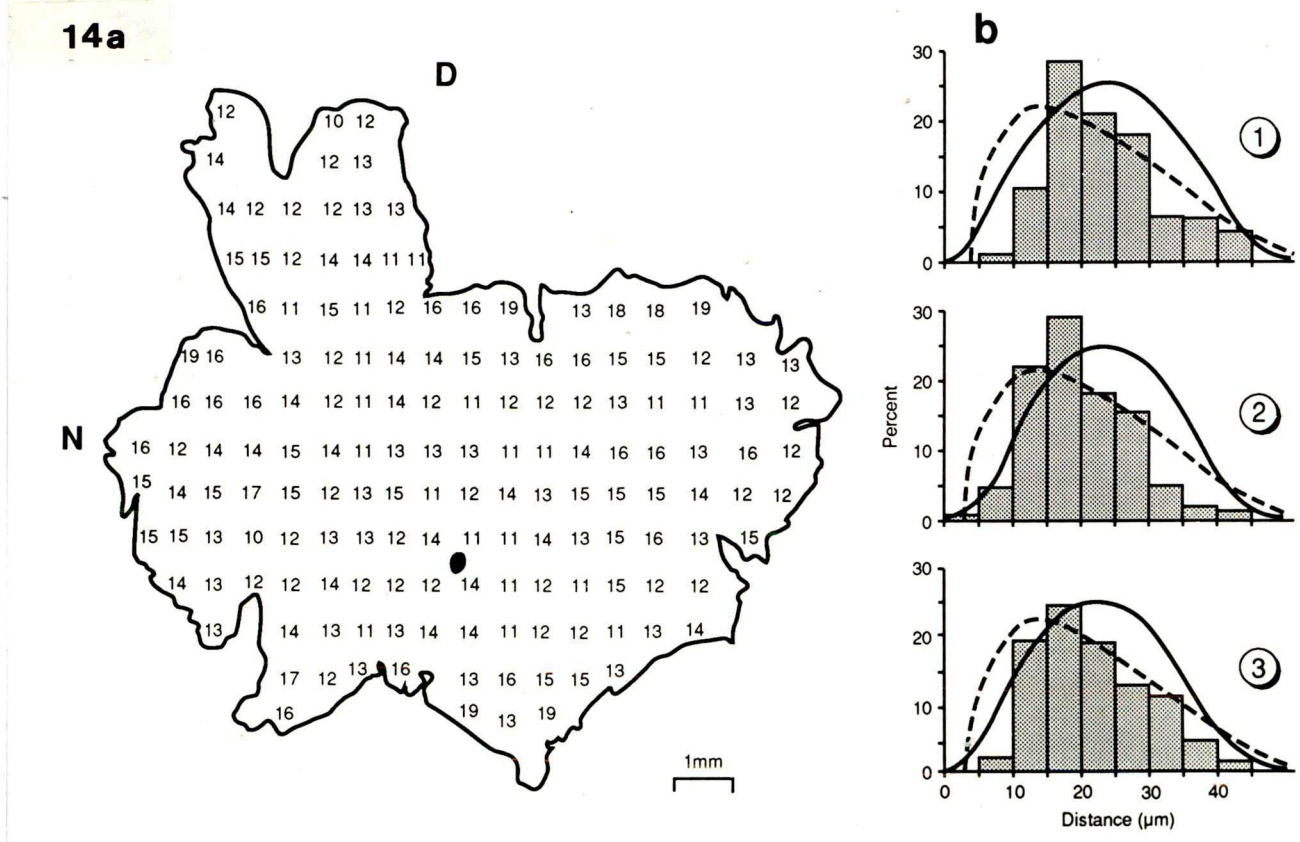
12 A-I ábra. Az NSE- és glial fibrillary acidic protein (GFAP)-LI összehasonlítása a *Bufo marinus* A-C retinában, D-E tectum opticumban és F-I a gerincvelőben. A NSE-LI Müller sejtek kettősen jelöltek B monoklonális anti-GFAP antitesttel és C poliklonális anti-GFAP antitesttel; a vékonynyakú pálcikák külső szegmentjei (*nyílhegyek*) szintén jelölődtek. D-E A tectum opticum jelölése D NSE-re és E GFAP-ra; a megegyező struktúrákat *nyílhegyek*kel jelöltük meg. F-G A gerincvelői struktúrák F NSE- G GFAP-LI; az azonos gliarostok *nyílhegyekkel* vannak jelölve. H NSE-LI és I GFAP-LI azonos gliaelemek a canalis centralis körül (a *nyílhegyek* két sejttestet jelölnek). *Léptékek:* D 30 μm, (mely vonatkozik A-C, E-I-re is).



13 A-D ábra. NSE-immunreaktív Müller sejtek retina metszeteken (A, B) és wholemountokon (C, D). A Fluoreszcens felvétel, melyen a jelölt nyúlványok a retina teljes vastagságában átérik. A sejttestek az *inl*-ben helyezkednek el. B Félvékony metszet egy DAB-reakcióval készített anyagból. Erősen immunreaktív pericelluláris kosarak láthatók a fotoreceptor sejttestek (*csillagok*) körül, míg az immunreaktív sejttestek (*nyilak*) az *inl*-ben vannak jelen. Az *ipl*-ben néhány vertikális nyúlványt is megfigyelhetünk (*üres nyilak*). A *gcl* néhány sejtje immunreaktív nyúlványokkal van körülvéve (*nyílhegyek*). Egy erősen jelölt vastag nyúlvány (*kettős nyílhegy*) szomszédos sejttesteket határol el egymástól. C A wholemount preparátum széle. Csak a Müller sejtek vastag nyúlványai láthatók (*nyílhegyek*), amint at *ipl*-en hatolnak keresztül. D Müller sejtek erős nagyítással. *Kettős nyílhegy:* sejttest; *nyílhegy:* magányos nyúlvány az *ipl*-ben; *nyílhegy csillaggal:* elágazódó nyúlványok a *gcl*-ben. *Léptékek:* 20 µm A, B és D; 40 µm C.

nyúlványai mind ebben a rétegben, mind a külső retinális rétegek felé nyúltak, s ott a fotoreceptorok sejttestjeit fogták körül (13a,b ábra). Az IPL-ben látható immunreaktív nyúlványok viszonylag kis számából (13a,b ábra) arra következtettünk, hogy a Müller sejteknek csak egy főnyúlványuk van az IPL-ben. Ez a megállapítás jó összhangban volt a wholemount preparátumokon tapasztaltakkal, ahol jól láttuk, hogy valóban csak egy főnyúlvány halad keresztül az IPL-en (13c,d ábra). A Müller sejtek nyúlványai körülölelik a neuronokat mind a külső, mind a belső retinális rétegekben, amint ez látható a keresztmetszeteken (13a,b ábra) és a wholemountokon is (13c,d ábra).

A Müller sejtek számának és eloszlásának vizsgálata wholemount preparátumokon történt. A retina teljes területén a Müller sejtek egyenletesen oszlottak el; a tapasztalt enyhe denzitás különbségek nem hozhatók összefüggésbe központ-szél irányú grádiensekkel. Kisebb összefüggő magas gliasűrűségű foltok sem voltak a retina területén (14a ábra). Az átlagos sűrűséget és a Müller sejtek számát három wholemounton számoltuk meg. Az 1. táblázatban jól látható, hogy az átlagos denzitás 1500 sejt/mm ^{2}. A teljes sejtszám 116000 és 148000 között változott, a retina mérettől függően. A khi-négyzet próba megerősítette azt a feltételezést, hogy a Müller sejtek eloszlása sem a normál, sem a random eloszlás görbéjével nem egyezik (14b ábra). A rendezettségi mutató (átlag osztva a szórással) magas volt



14 ábra. Denzitás térkép (A) és a legközelebbi szomszéd analízisének grafikonja (B). A Müller sejtek eloszlása a retinában. A számok 100-zal szorzandók/mm^2. A *fekete pont* a nervus opticus helyét jelöli ki. *D*: dorzális, *N*: nazális pólus. B A legközelebbi szomszéd analízis. Az 1,2 és 3 grafikon azokat az eredményeket mutatják, melyek az 1. táblázat 1,2 és 3. sorában szerepelnek.

1. Táblázat

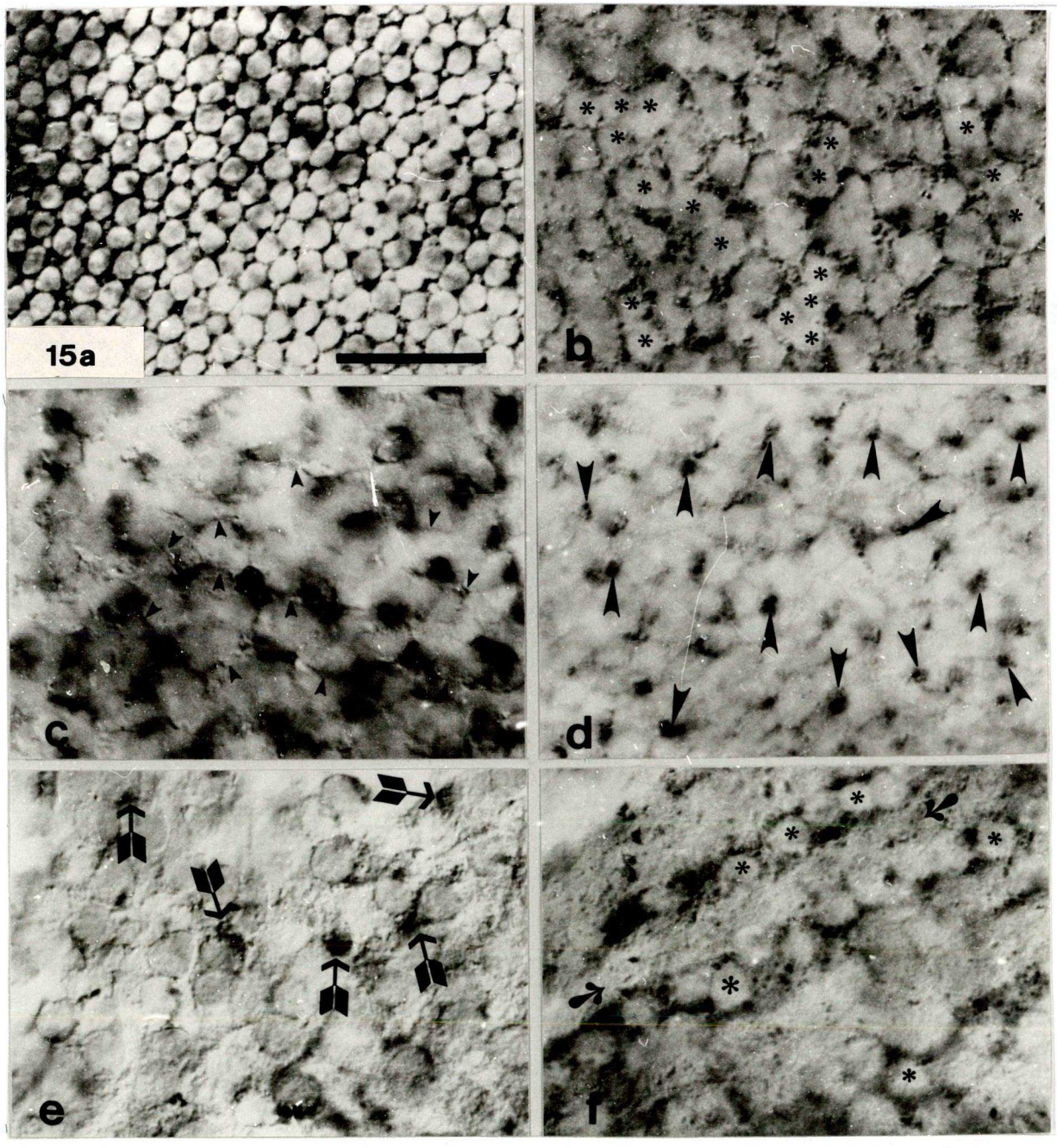
Három retinális wholemount Müller sejtjeinek mennyiségi analízise

A retina mérete (mm^2)	Denzitás (sejt/mm^2) átlaga	Legközelebbi szomszéd ($\mu m \pm S.E.$)	Szabályosági mutató	Becsült teljes sejtszám
83,0	1390	13,1±3,1	4,2	115700
76,0	1668	11,3±4,4	2,6	126800
97,5	1514	12,7±3,1	4,1	147000

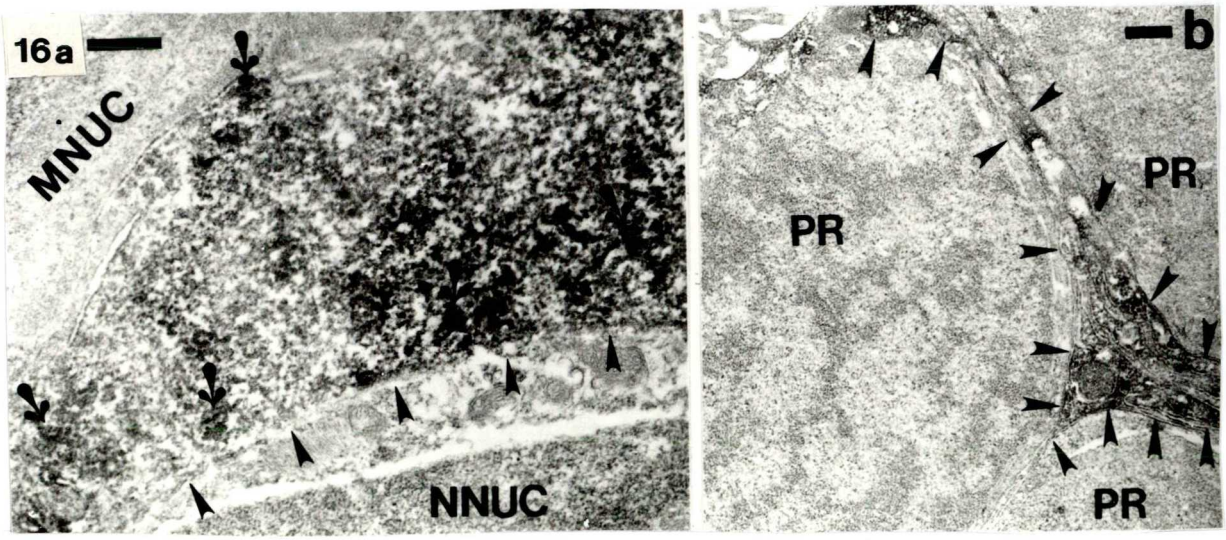
(a három retina átlaga 3,6) mutatva, hogy a Müller sejtek eloszlása a retinában meglehetősen egyenletes.

4. VI. A retina neuronális elemeinek gliális szigetelése

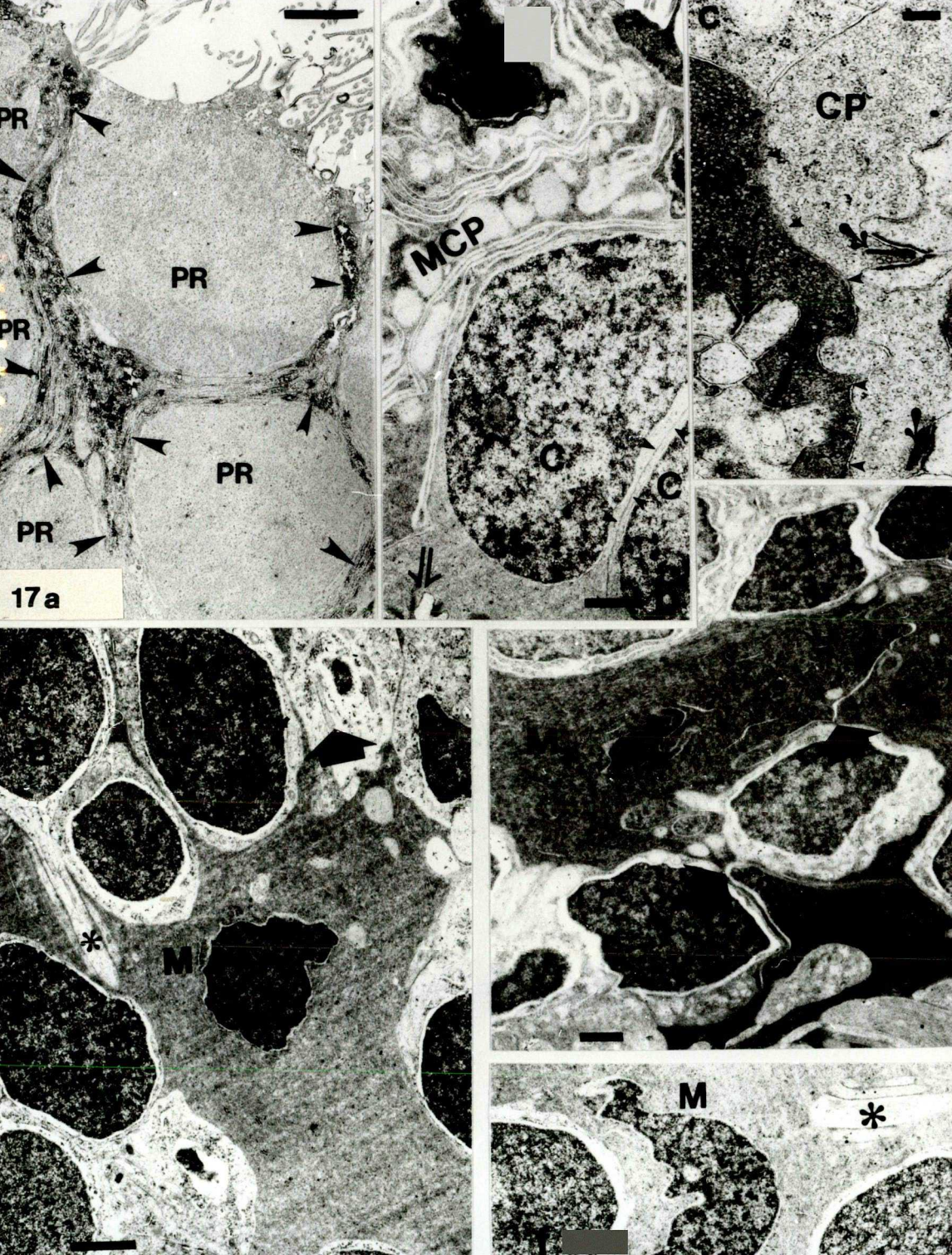
A wholemountok és az elektronmikroszkópos preparátumok párhuzamos vizsgálatával derítetettük fel a glia szigetelés morfológiai jellemzőit. Az ONL külső határánál a Müller sejt nyúlványok egy hálószerű rendszert formáltak a fotoreceptor sejttestek körül az ONL külső határánál (15a ábra). Az egyes fotoreceptorok sejttestjei között gliaborítás látható az elektronmikroszkópban (17a ábra), kivéve, ha az ún. kettős csapokat vizsgáljuk (17b ábra). Immunjelölt preparátumokon az elektrondenz DAB szemcsék jól láthatóak a Müller sejtek citoplazmájában, a fotoreceptor sejttestek közötti nyúlványokban (16b ábra). A fotoreceptor végtalpak membránjai-a fotoreceptor sejttestekkel ellentétben- gyakran láthatók szoros kapcsolatban a szomszédos végtalpakkal, közbeiktatott gliális szigetelés nélkül (17c ábra). Az OPL/INL határán Müller sejtek nyúlványai fészket formáltak az INL külső határán elhelyezkedő neuronoknak (15b ábra). A Müller sejtek sejttestjei könnyen azonosíthatók, mind az immunjelölt (16a ábra), mind a hagyományos elektronmikroszkópos preparátumokon (17d ábra) a rájuk jellemző nyújtott, gyakran szegmentált sejtmagjuk alapján. Az immunjelölt Müller sejtek citoplazmája a DAB reakciótermék elektrondenz szemcséit tartalmazta (16a ábra). Hagyományos elektronmikroszkópos preparátumokon a Müller sejtek citoplazmája sötétebb volt, mint a neuronális elemeké



15 A-F ábra. Jelölt és DAB-reakcióval előhívott Müller sejtek wholemounton különböző fókusz síkokban. A Hálószerű szerkezet a fotoreceptorok nyaka körül. B Egyenetlenül elhelyezkedő nyúlványok fészkeket formálnak az inl külső rétegének neuronjai körül (*csillagok*) az *opl/inl* határán. C Nyúlványok indulnak ki (*nyílhegyek*) a Müller sejttestekből az *inl*-be. D Törzsnyúlványok (*nyílhegyek*) az *ipl*-ben. E Erősen immunreaktív nyúlványok (*nyilak*) a *gcl* szintjén. F A jelölési mintázat a belső határoló membrán (inner limiting membrane) szintjén. *Csillag*: sejt a *gcl*-ben, a *nyilak* egy köteg optikus rost felé mutatnak. Figyelemre méltó, hogy az immunreaktivitás ott a legerősebb, ahol sem ganglion sejttestek, sem optikus rostok nincsenek. *Lépték:* 40 µm A-n. s ez érvényes a többi fényképre is.

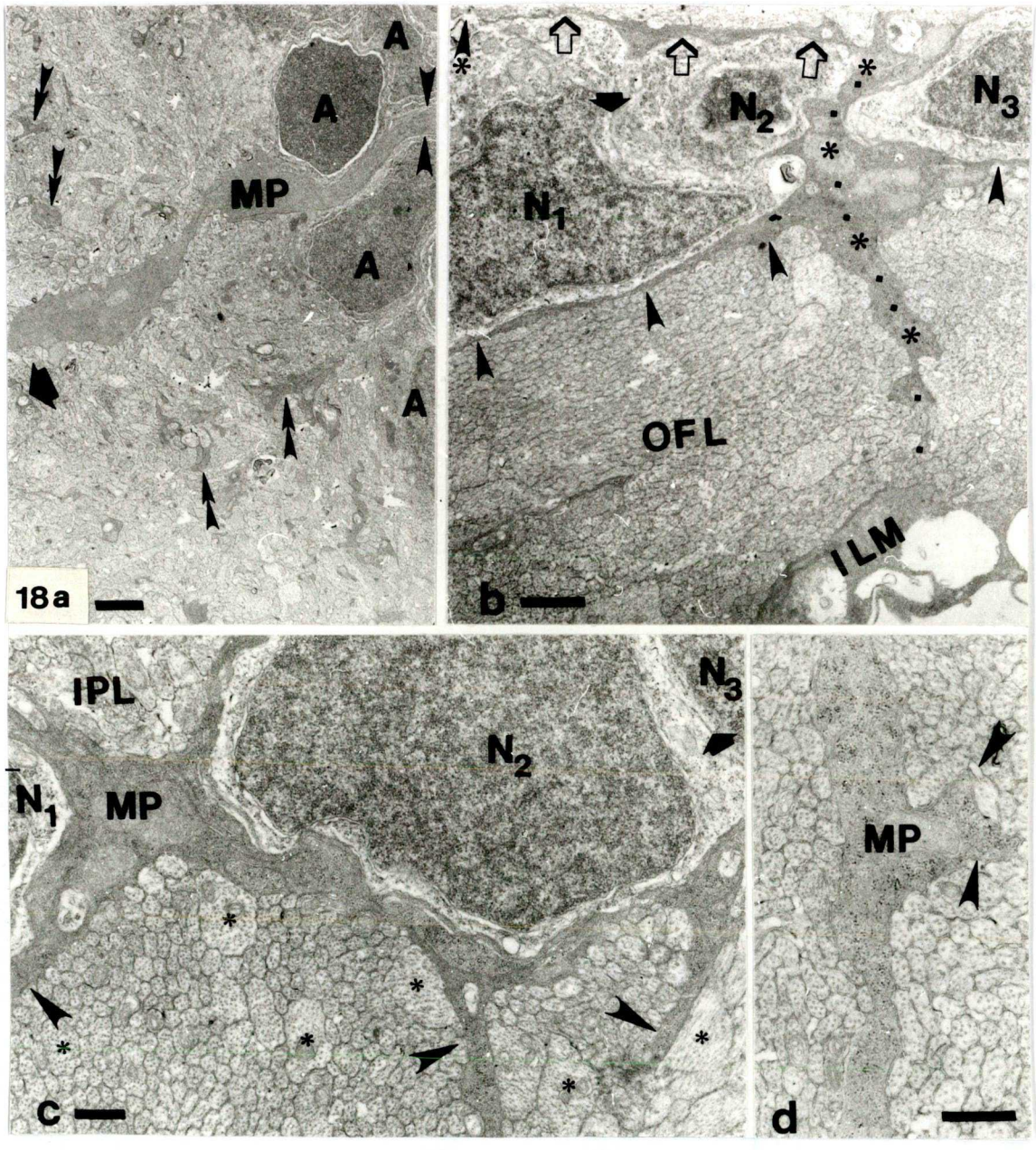


16. ábra. Immunreaktív Müller sejtek elektronmikroszkópos ábrai. A Egy immunjelölt Müller sejttest a sejtmag egy részével. Az erősen immunreaktív citoplazmárészletek *nyilakkal* jelöltek. A határ a immunjelölt Müller sejt és a szomszédos nem jelölt neuronok között *nyílhegyekkel* van kijelölve. *NNUC:* a nem jelölt neuron nucleusa. B Egy immunreaktív Müller sejt nyúlvány (*nyílhegyekkel* körülhatárolva) a nem jelölt fotoreceptor sejttestek között. *Lépték:* 500 nm mindkét fotón.


PR
PR
PR
PR
PR
MCP
C
C
C
CP
17a
M
*
M
M
*

17 A-F ábra. Elektromikroszkópos felvételek, melyek a Müller sejttesteket és azok nyúlványait mutatják az *onl*-ben (A-C) és az *inl*-ben (D-F). A Fotoreceptorok az *onl*-ben NSE-LI Müller sejt nyúlványokkal (*nyílhegyek*) vannak körülvéve. B Müller sejt nyúlványok fotoreceptor szómákat választanak el egymástól. *R*: pálcika (rod); *C*: csap (cone). A kettős csapok elemei nincsenek elválasztva (az egymással párhuzamosan futó membránok *nyílhegyekkel* vannak jelölve) Müller sejt nyúlványokkal. *Üres nyíl:* szinapszis a csap talpakon. C A pálcika és csap talpak (*RP* és *CP*) nincsenek elválasztva a glia burokkal egymástól (a *nyílhegyek* az egymással érintkező membránokat jelölik). *Nyilak:* szalag szinapszisok a fotoreceptor terminálisokban. D Szomszédos Müller sejtek (M_1, M_2, *és* M_3) nyúlványaikkal érintkeznek (*nyilak*) az *inl*-ben. E Egy bipoláris sejt (*B*) axonja (*csillag*) Müller sejt citoplazmájával van körülvéve (*M*). *Nyíl:* a retinális felszín iránya. F Müller sejtekkel (*M*) körülzárt neuron nyúlványok (*csillag*) az *inl* proximális részében. *Léptékek:* 2 μm A, E; 1 μm B, D és F; 200 nm C.

18 A-D ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a proximális retina rétegekben lévő Müller sejt nyúlványokat mutatnak. A Nagyméretű Müller sejt nyúlvány (*MP*) az *ipl*-be fúródik. Néhány oldalág (*kettős nyílhegy*) szintén látható. *A:* amakrin sejt, *nyílhegyek:* a hely, ahol Müller sejt nyúlványok az *inl* szomszédos neuronjainak nyúlványai az *ipl* felé törekszenek. B A *gcl* és az *ofl*. Müller sejt nyúlványok (*csillagok pontokkal összekötve*) haladnak el N_2 és N_3 között, míg az N_1 és N_2 nincs elválasztva egymástól (az egymás felé forduló membránok *nyilakkal* jelöltek). Müller sejt nyúlványok (*nyílhegyek*) teljesen elválasztják a neuronokat az *ofl*-től, míg nyúlványaik hálózata hézagos (egy hézag *nyílhegy + csillaggal* van jelölve) az *ipl* felé (*üres nyíl*) A belső határhártya (inner limiting membrane; *ILM*) a retinát határolja el az üvegtesttől. C Egy Müller sejt nyúlvány (*MP*) neuronok között (N_1 és N_2) halad el az *ipl*-ből az *ofl*-ben (néhány rost *csillaggal* van jelölve). Más neuronok nincsenek elválasztva (*nyíl* az N_2 és az N_3 között). Egy Müller sejt nyúlvány (*nyílhegyek*) elágazik és kötegekre osztja az optikus rostokat. Még a legnagyobb optikus rostok (*csillagok*) is mielinhüvely nélküliek. D Bár a Müller sejt nyúlványok (*MP*) kibocsátanak néhány rövid mellék ágat (*nyílhegyek*), nem borítják be egyenként az optikus rostokat. *Léptékek:* 2 μm A, 1 μm B és 500 nm C, D.


A
A
MP
A
A
18a
N2
N3
N1
OFL
ILM
b
IPL
N3
N2
N1
MP
c
MP
d

(17d,e ábra), valószínűleg annak köszönhetően, hogy egy éjszakán át voltak kezelve uranil-acetáttal. Az elektrondenz citoplazma alapján nemcsak a Müller sejtek sejttestjei, hanem a plexiform rétegekbe kifutó nyúlványaik is azonosíthatóak voltak.

A Müller sejtek sejttestjei többnyire az INL közepén helyezkedtek el, s nyúlványokat küldtek egymás felé (15c, 17d ábra). Így az INL-ben egy nem folytonos gliaréteget képeztek, elválasztva a külső (horizontális és bipoláris) és a belső (amakrin és interplexiform) neuronokat egymástól. A bipoláris sejtek axonjai és más nem azonosított nyúlványok, egy részük valószínűleg az interplexiform sejtekhez tartozik, Müller sejtekbe voltak beágyazva (17e,f ábra). A Müller sejtek csak egy törzsnyúlványt képeztek az IPL-ben (15d ábra), bár néhány kis átmérőjű horizontálisan futó Müller sejt nyúlványt szintén láttunk az elektronmikroszkópban (18a ábra). A törzsnyúlványok egyenesen futottak le a GCL külső határáig, ahol elágaztak és egy nem folytonos gliaborítást képeztek a sejttestek fölött (18b ábra). Ezután a főnyúlványok átnyúltak a GCL-en elválasztva néhány, de nem valamennyi, sejttestet egymástól (18b,c ábra). A Müller sejt nyúlványok újra elágaztak a GCL sejtjei alatt, egy folytonos gliaréteget képezve a sejtek és az optikus rostok között (18c ábra). A retinában futó optikus axonokon nem találtunk mielinhüvelyt vagy bármiféle gliaborítást (18c,d ábra). Ezzel szemben a Müller sejtek citoplazmatikus nyúlványai körülzártak optikus rostkötegeket

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 18.

(18d ábra). Más burokformáló elemek az OFL-ben, úgy mint asztrociták vagy oligodendroglia sejtek, nem voltak jelen.

5. Az eredmények megbeszélése

Anti-MAP2 és anti-NSE antitestekkel a farkatlan kétéltűek (elsősorban a *Bufo marinus*) retinájának metszeteit és wholemountjait, valamint elektronmikroszkóp segítségével a bennük található gliasejtek ultrastruktúráját tanulmányoztuk.

5. I. A MAP2 tartalmú sejtek

A MAP2 ellen készült monoklonális antitest a fotoreceptorok, az amakrin sejtek és a ganglion sejtek egy-egy szubpopulációját jelölte.

5. I. a, Fotoreceptorok

A jelölt fotoreceptorokat csapoknak tekintettük szómájuk alakja és azok ONL-beli elhelyezkedése, valamint rövid külső szegmentjeik alapján. A CaBP jelenléte ezekben a sejtekben megerősítette ezt a feltételezésünket annak ellenére, hogy ez az anyag nincs jelen valamennyi csapban *Bufoban*. E tekintetben a *Bufo* hasonlít a szalamandrához (Pasteels és mtsai 1990), de különbözik az emlősöktől (Röhrenbeck és mtsai 1989) és a galambtól (Pasteels és mtsai 1987). Mindezek következtében ez a módszer nem használható a MAP2-pozitív csapok arányának meghatározására a teljes csappopuláción belül. A fényérzékeny elemek nem tartalmaznak MAP2-t kifejlett patkányban (Okabe és mtsai 1989) és fürjben (Tucker és mtsai 1988) annak ellenére, hogy a MAP2c jelenléte kimutatható az említett állatok fotoreceptor sejtjeiben az egyedfejlődés korai szakaszaiban (Tucker és

Matus 1987; Tucker és mtsai 1988). Eredményeink tehát az első adatok kifejlett gerincesek MAP2-immunreaktív fotoreceptoraira vonatkozóan.

A MAP2-pozitív csapok számát kb. 200000-re becsültük, amely a teljes csap populáció 10-15%-a lehet *Bufoban* (Jagger 1988; Zhang és Straznicky 1991). A MAP2 tartalmú csapok eloszlása a retinában tükrözi a teljes csappopuláció eloszlását (Zhang és Straznicky 1991), bár a denzitásbeli különbségek kisebbek. A csapok altípusait emlősökben azok pigment tartalma (Szél és Röhlich 1988; Szél és mtsai 1988) és a Porcion Yellow nevű festék szelektív felvétele alapján határozták meg. Ez az anyag emberszabásúakban a kék színre érzékeny csapokat jelöli (De Monasterio és mtsai 1981, 1985). A kékérzékeny csapok emberi retinában morfológiájuk alapján felismerhetőek (Ahnelt és mtsai 1987) és alacsony CaBP tartalmuk alapján macskában és majomban is elkülöníthetők (Röhrenbeck és mtsai 1989). A farkatlan kétéltűek legtöbb csapja egy főcsoportba tartozik (Saxén 1954; Kinney és Fisher 1978), mely vörös fényre érzékeny (Witkovsky és mtsai 1981a, b), de igazolt több más csaptípus léte is, nevezetesen a nagy kettős csapoké és a kis egyes csapoké (Saxén 1954; Hailman 1976). A *Xenopus laevis* retinában a kis csapok pigmenttartalmuk alapján nagy valószínűséggel kék fényre érzékenyek (Röhlich és mtsai 1989), de ezek nagyon ritkák ebben a fajban. A kis egyes csapok szintén jelen vannak a *Bufo*ban (saját nem publikált adat). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az általunk kimutatott

MAP2-immunreaktív csapok a farkatlan kétéltűek retinájának kis kékérzékeny csapjai.

5. I. b, Ganglion sejtek

Mind az emlős mind a madár retina tartalmaz MAP2-pozitív ganglionsejteket, de számukat, morfológiájukat még nem határozták meg (De Camilli és mtsai 1984; Matus 1988; Tucker és mtsai 1988). Nemrégiben Wässle és Boycott (1991) ezeket a sejteket az emlős retina alfa-típusú ganglionsejtjeihez sorolta. Retrográd töltéssel igazoltuk, hogy a MAP2-pozitív sejtek a GCL-ben valóban ganglion sejtek a *Bufoban* is. A kettősen jelölt sejtek egy részének az IPL két különböző alrétegében is vannak dendritágai. Ganglion sejteket hasonló morfológiával a nagy 1-es típusú ganglionsejtekhez sorolták *Bufo*ban (Straznicky és mtsai 1990). Azoknak a sejteknek az alcsoportja, melyek az IPL disztális alrétegében ágaznak el, morfológiailag és fiziológiailag az emlősök alfa típusú fénykikapcsolásra érzékeny (OFF) sejtjeihez hasonlíthatóak (Maturana és mtsai 1960; Stirling és Merill 1987). Érdekesség, hogy emlősökben, az alfa ganglion sejtek tartalmaznak neurofilament triplet fehérjét (Dräger és mtsai 1984). Mivel a MAP2 összeköti a neurofilamentumokat a mikrotubulusokkal (Hirokawa és mtsai 1988), egy rendkívül stabil sejtváz rendszer jön létre ezen ganglionsejtek nagy dendritjeiben (Matus 1988). Észleleteink megerősítik ezt a feltételezést, azonban további kísérletes munka szükséges, hogy a MAP2-

immunreaktív ganglionsejtek morfológiai és fiziológiai jellegét sikeresen feltárjuk.

5. I. c, Amakrin sejtek

A MAP2-immunreaktív amakrin sejtek eloszlása nagyon hasonlít a farkatlan kétéltűek INL-beli sejtjeinek általános eloszlásához (Zhu és mtsai 1990). Teljes sejtszámuk és denzitásuk azonban azt mutatja, hogy nem azonosíthatók a korábban már leírt SP- (Hiscock és Straznicky 1989a), NPY- (Hiscock és Straznicky 1989b), SOM- (B.-S. Zhu és J. Hiscock nem publikált adatai), CCK- (Osborne és mtsai 1982), TH- (Zhu és Straznicky 1990a) és 5HT- (Zhu és Straznicky 1990b) tartalmú amakrin sejt populációkkal. Úgy tűnt, hogy vagy ezen populációk keverékéből tevődik össze a MAP2-pozitív amakrin sejtek csoportja, vagy esetlegesen a MAP2 tartalmú amakrin sejtek lehetnének a GABA- (Gábriel és mtsai 1992) illetve glicin-(Kleinschmidt és Yazulla 1984) tartalmú sejtek egy alcsoportja. Kettős jelöléses kísérleteink azonban világosan megmutatták, hogy az általunk MAP2-pozitívnak talált amakrin sejtek vagy TH- vagy 5HT-immunreaktívak; bár nem minden 5HT-sejt MAP2-immunreaktív is egyben. A többi, korábban már említett típus nem mutatott MAP2-immunreaktivitást. Továbbá az anti-TH és -5HT antitestek keveréke valamennyi MAP2-pozitív amakrin sejtet jelöli. A 5HT-pozitív amakrin sejtek között a nagy, szerotonint szintetizáló sejttípus (Zhu és Straznicky 1990b; Zhu és mtsai 1992) jelölődött rendszeresen MAP2-val is. Ezt erősítették meg sejtszámolási adataink is. A TH- (Zhu és

Straznicky 1990a) és a nagy 5HT- (Zhu és Straznicky 1990b) immunreaktív sejtek száma éppen megegyezett a MAP2-pozitív amakrin sejtekével (13600 és 14800 hasonló méretű retinák figyelembe vételével).

A MAP2 valamint a TH ill. 5HT kolokalizációja nagy amakrin sejtekben rendkívül érdekes. Mivel a kis és a közepes nagyságú amakrin sejtek nem tartalmaznak MAP2-t, joggal feltételezhető, hogy e sejtekben -a nagy ganglionsejtekhez hasonlóan- a MAP2 feladata egy stabil citoszkeleton létrehozása. Észleleteink továbbá azért is fontosak, mert megmutatták, hogy bizonyos citoszkeletális és citoplazmatikus fehérjék ellen termelt antitestek eredményesen alkalmazhatók sejtcsoportok szelektív citokémiai jelölésére.

5. II. A NSE tartalmú sejtek

A NSE különböző gerinces fajok retinájában különböző neuronféleségeket jelöl. Érdekesség, hogy az axolotl retinában mind a neuronok, mind a Müller sejtek immunreaktívak voltak, a farkatlan kétéltűekben pedig kizárólag a Müller sejtek voltak NSE-pozitívak.

5. II. a, A NSE-jelölődési mintázat egy lehetséges magyarázata

A NSE gamma/gamma alegységekből álló homodimer szerkezetű fehérje, míg a NNE alfa/alfa alegységeket tartalmaz. Az alfa és a gamma alegységek szerkezete különböző (Pickel és mtsai 1976; Schmechel és mtsai 1978b).

Alfa/gamma heteromer szerkezetű enoláz található neuroendokrin sejtekben (Schmechel és mtsai 1978a). Ez a heterodimer is jelölhető anti-NSE antitestekkel, mivel azok a gamma alegység egy sajátos, az alfa alegységben nem megtalálható polipeptidszekvenciáját ismerik fel. Nem volt még példa azonban arra, hogy gliaelemek NSE-t tartalmaznának. Eredményünk, miszerint a Müller sejtek és a központi idegrendszerben található gliaelemek NSE-immunreaktivitást mutatnak a farkatlan kétéltűekben, két kérdést vet föl: (1) Miért jelenhet meg a kétéltűek gliasejtjeiben a NSE a filogenezis során? (2) Hogyan lehetséges, hogy egy fajon belül a perifériás idegrendszer neuronjai, de ugyanakkor a retina Müller sejtjei és egyéb központi idegrendszeri gliasejtek is NSE-t tartalmaznak?

Mivel sem a NSE/NNE aminosav sorrendjét, sem génjeik szerkezetét/helyét nem ismerjük, a lehetséges magyarázatokra csak következtetni tudunk. Az általunk használt antitest a gamma alegységet ismeri fel specifikusan, így a kimutatott Müller sejteknek, illetve egyéb gliáknak legalább egy gamma alegységet kell tartalmazniuk. Ha a gamma alegység génje nem fejeződik ki a központi idegrendszeri neuronokban, illetve helyette az alfa alegység génjei kapcsolnak be, a gliasejtekben is természetszerűleg meglevő gamma alegység génje aktiválódhat, és így a gliák képesek lehetnek a gamma alegység szintézisére *Bufo marinusban*. Ez elegendő a gliasejtek NSE immunreaktivitásának kifejlődéséhez. Hipotézisünket alátámasztani látszik az a megfigyelés, hogy a NNE már az egyedfejlődés igen korai szakaszában

megjelenik, míg NSE jelenléte csak jóval később mutatható ki (Schmechel és mtsai 1980b). Igazolt tény továbbá, hogy a NSE nagyon kis mennyiségben van jelen az embrionális kor korai szakaszában, és csak akkor emelkedik aktivitása, amikor megjelennek a központi idegrendszer első funkcionáló szinapszisai (Cicero és mtsai 1970b). Ha a farkatlan kétéltűek neuronjai megtartják NNE termelő képességüket és a gliasejtek kezdik el termelni a NSE-t, az eredmény természetesen a gamma alegység megjelenése a gliasejtekben, s hiánya a neuronokban.

A magyarázat arra, hogy a NSE gliális lokalizációjú a központi idegrendszerben ugyanakkor neuronokban található a perifériás idegrendszerben lehet az, hogy farkatlan kétéltűekben az enoláz enzimeket termelő gének csak az idegrendszer e két részének szétválása után aktiválódnak a korai embriogenezis során. Differenciális génexpresszió pedig máris megmagyarázná eredményeinket. Mivel a farkatlan kétéltűek csoportja a filogenezis egyik zsákutcája, érthető, hogy a különleges enoláz génexpressziós mintázat nem figyelhető meg más filogenetikai csoportokban. Ez a megállapítás jól illeszthető eredményeinkhez.

A NSE jelenléte gliasejtekben (illetve méginkább hiánya a neuronokból) nem tűnik fiziológiailag előnyösnek, hiszen a NSE klorid rezisztens, mig a NNE nem (Marangos és mtsai 1978). A NSE-nek ez a tulajdonsága hasznos a neuronokban, ahol igen erős a kloridionok vándorlása.

Megfelelő ismeretek hiányában eredményeink molekuláris háttere nem világos. Ennek ellenére azonban nyilvánvaló,

hogy a NSE, mint markermolekula, alkalmas a farkatlan kétéltűek Müller sejtjeinek szelektív kijelölésére. Így azok morfológiai analízise mind fény- mind elektronmikroszkópos szinten végrehajtható.

5. II. b, A Bufo marinus Müller sejtjeinek az emlősökétől eltérő morfológiai sajátosságai

A *Bufo marinus* retina Müller sejtjeinek fénymikroszkópos megjelenése nagyon hasonlít a más gerinces fajokéihoz (Bignami 1984; Dreher és mtsai 1988; Robinson és Dreher 1988; Gaur és mtsai 1988; Reichenbach és Wohlrab 1983; Reichenbach és mtsai 1991; Schnitzer 1988). A fő morfológiai jellemzők: a hálószerű külső határoló membrán (outer limiting membrane, OLM), a rengeteg nyúlvány a fotoreceptorok és az INL-beli sejtek körül, csak egy fő nyúlvány az IPL-ben és a folytonos belső határoló membrán (inner limiting membrane, ILM). Kvantitatív vizsgálatunk eredménye azért érdekes, mert ellentétben a neuronok nem egyenletes eloszlásával a Müller sejtek egyenletesen oszlottak el a retina teljes felszínén, néhány helyi különbséget leszámítva. Eredményeink jól egyeznek a teknős retinában leírt egyenletes eloszlással (Gaur és mtsai 1988). Mindkét fajnak jól fejlett látócsíkja van a GCL-ben, és ráadásul a *Bufoban* egyenetlen a sejteloszlás a látócsík fölött az INL-ben (Zhu et al 1990) és a fotoreceptorok rétegében is (Zhang és Straznicky 1991). Ezzel ellentétben az emlős retinában a Müller sejtek eloszlása tükrözi a retinális neuronok egyenlőtlen eloszlását (Dreher és mtsai

1988; Reichenbach and Wohlrab 1983). A Müller sejtek felnőttkori egyenlőtlen eloszlása az embrionális és korai posztnatális egyenletes eloszlásból fejlődik ki (Reichenbach és mtsai 1991). A becsült Müller sejt csúcsdenzitás az emlős retinában 12000-17000/mm^2, amely kb. 6-8-szor nagyobb, mint az alacsonyabb rendű gerinces fajokban (1500-2000/mm^2).

Az egyenlőtlen neuroneloszlás a retinában az evolúció során először néhány egymástól taxonómiailag független csontoshal fajban jelent meg (Collin 1987; Schwassmann 1968), majd később valamennyi szárazföldi békában előfordul (Straznicky 1992) a látócsík formájában. Bár adatok nem ismeretesek a csontoshalak retinájának gliasejt eloszlásáról, beleértve az esetlegesen meglévő area centralis vagy fovea területét, az eredmények a teknősben (Gaur és mtsai 1988) és *Bufo marinusban* azt sugallják, hogy az evolúció során kialakuló centrális retinális specializációkat nem rögtön követték a gliaelemek hasonló elrendeződései. Ezt támasztja alá az is, hogy a Müller sejtek kis sűrűségben, egyenletesen eloszolva fordulnak elő az alacsonyabbrendű gerincesek retinájában. Mivel a Müller sejtek és a neuronok eloszlásprofilja nem hasonlít egymásra a *Bufo* retinában, a két érték hányadosa változik a retina perifériája felé haladva. Korábbi adatok (Nguyen és Straznicky 1989; Zhang és Straznicky 1991; Zhu és mtsai 1990), valamint a mi becsléseink alapján egy centrálisan elhelyezkedő Müller sejt kb. 30 fotoreceptor, 40 INL-beli neuron és 12 GCL-beli neuron számára biztosít támasztást és burkot. Ugyanez az érték a retina perifériáján 18, 10 és 2.

Az egyenlőtlen gliaeloszlás funkcionális következményei még nem ismertek. A Müller sejtek felelősek a K^+ ionok felvételéért és visszajuttatásáért a szervezet ionkörforgásába (Newman 1984; Newman és mtsai 1984). Az extrém erős fény hatására létrejövő ingerküszöb-változás, valamint a sötét-adaptált retinában erős fényingerre létrejövő, a normálistól eltérő elektroretinogram-hullámok ezen aránytalan glia/neuron eloszlás következményei a farkatlan kétéltűek retinájában.

Korábbi elektronmikroszkópos vizsgálatok leírták a Müller sejtek laterális membránspecializációit (Lasansky 1965) és a citoplazmájukban található organellumokat (Uga és Smelzer 1973) a farkatlan kétéltűek retinájában. Egy tanulmány sem vizsgálta azonban a Müller sejtek és a neuronok sejttestjei közti kapcsolatrendszert a különböző retinális rétegekben. Eredményeink azt mutatják, hogy a fotoreceptor szómákat gliasejtek vékony nyúlványai választják el, de azok végtalpai az OPL-ben érintkeznek egymással. Bár a vörös fényre érzékeny pálcikák *Bufo marinusban* réskapcsolatokkal kapcsolódnak egymáshoz a belső szegmentek magasságában (Gold és Dowling 1979), a gliaburok megakadályozza a depolarizáció ill. a hiperpolarizáció tovaterjedését egyik csap típusról a másikra. Mivel a tovaterjedés egy nemkívánatos szinkron aktivációhoz vezethetne valamennyi színkódolt fotoreceptoron, a gliaburkok jelenléte elsődleges fontosságú a szignálok spektrális tisztaságának megőrzése szempontjából. Ezzel szemben némely pálcikák és csapok végtalpainak membránjai

hosszú szakaszon párhuzamosan futnak egymással, amelynek következtében a pálcika talpak aktiválhatnak néhány csapot szkotopikus körülmények között.

A Müller sejtek az INL-t két szektorra választják szét. A külső és a belső szektor topográfiai elkülönülése összefüggésbe hozható az INL funkcionális felosztásával; a külső a bipoláris és horizontális sejteké, a belső pedig az amakrin és interplexiform sejteké. A Müller sejtek csatornákat alkotnak az interplexiform sejtek nyúlványainak az INL-ből az OPL-ig, biztosítva a glia szigetelést (Gábriel és mtsai 1991).

A GCL neuronjai egy folyamatos és egy nem folyamatos Müller sejtnyúlvány réteg között helyezkednek el. Egyes sejttestek ráadásul el vannak választva egymástól vertikális Müller sejt nyúlványokkal. Hasonló elrendeződésű nyúlványrendszer volt megfigyelhető a macska GCL-ben (Büssow 1980; Holländer és mtsai 1991), de ott a gliaszigetelés kialakításában asztrociták is részt vesznek (Holländer és mtsai 1991; Schnitzer 1988). A külső gliaburkolat elszigeteli a GCL neuronjait az ionáramok által aktivált, IPL-ben elhelyezkedő dendritektől. Az ok, amiért néhány sejttestet a GCL-ben a Müller sejt nyúlványok elválasztanak egymástól, míg másokat nem, még nem ismeretes.

A Müller sejtek nyúlványai optikus rostcsoportokat határolnak körül az OFL-ben, de az egyes axonokat azonban nem burkolják be. A macska retinában ugyanakkor az egyes axonokat is vagy asztrociták, vagy Müller sejt nyúlványok borítják (Holländer és mtsai 1991; Stone és Dreher 1987). A

Bufo marinus látóidegében a rostok 3%-a mielinhüvelyes (Nguyen és Straznicky 1989), de egyetlen retinán belüli optikus axont sem láttunk vizsgálataink során, mely mielinhüvellyel bírt volna. Valószínű, hogy az egyes axonok gliaborításának hiánya fokozza a retina átlátszóságát, ez pedig kedvezően befolyásolja a béka szem látásélességét.

6. Következtetések

A MAP2 szerepe a retinális neuronokban még mindig nem tisztázott, hiszen három nagy neuroncsoportot is ki tudtunk mutatni MAP2 elleni antitesttel. Az azonban bizonyos, hogy ez a citoszkeletális fehérje a korábban neurokémiailag illetve morfológiailag karakterizált neuroncsoportokban található meg. Nemrégiben már azonosították egyes sejttípusok jellegzetes neurokémiai markereit. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a neurotranszmitterek és modulátorok mellett fontos lenne a sejten belüli hírvivő rendszer és a sejtvázrendszer fehérjéit is figyelembe venni a retinális neuronok besorolásakor. Így Lam és mtsainak (1985) szignál hipotézise, amely kimondja hogy az amakrin sejtek típusai azonosíthatók a bennük található neuroaktív anyagok kombinációja alapján, kiterjeszthető lenne valamennyi gerinces retinájának valamennyi sejttípusára.

Ugyanakkor a NSE a farkatlan kétéltűek retinájában minden más vizsgált gerinces fajtól eltérően a Müller sejtekben található meg. Ezen lokalizációnak valószínüleg genetikai oka van. A NSE-t mint markert használva a farkatlan kétéltűek Müller sejtjei szelektíven jelölhetők és vizsgálhatók. Megállapítottuk, hogy a Müller sejtek az egyedüli velőcső eredetű gliaelemei a *Bufo marinus* retinának. E sejtek körülveszik a neuronok sejttestjeit és támasztják azok nyúlványait a retina valamennyi rétegében, valamint szigetelik a retina neuronális elemeit egy olyan környezetben, melynek mielinmentesnek kell lennie. A Müller sejtek látnak el minden olyan funkciót a farkatlan kétéltűek

véredények nélküli retinájában, melyet az asztrociták és a Müller sejtek együtt látnak el az emlős retinában.

7. Az eredmények összefoglalása

Kísérleteink során igazoltuk, hogy

(1) a MAP2 előfordul a csapok egy populációjában valamint amakrin és ganglion sejtekben a *Bufo marinus* retinájában. Az INL-ben jelölődött MAP2-pozitív amakrin sejt populáció kettős jelöléses kísérletekben azonosítható volt a nagyméretű 5HT-szintetizáló és a TH-immunreaktív dopaminerg sejtekkel. A GCL-ben intenzíven jelölt sejteket retrográd töltéssel és az azt követő MAP2-immuncitokémiával nagyméretű ganglionsejtekként azonosítottuk.

(2) Anti-NSE antitestek alkalmazásával megállapítottuk, hogy a különböző gerinces fajok retinájában különböző neuronféleségek jelölődtek, de általános volt a horizontális sejtek, valamint a nagyméretű amakrin és ganglion sejtek jelölődése. A fotoreceptorok heterogén módon jelölődtek a különböző gerinces fajokban. Az axolotl retinában mind neuronokhoz mind Müller sejtekhez, míg a farkatlan kétéltűek retinájában kizárólag Müller sejtekhez kapcsolódott az anti-NSE antitest. A *Bufo marinus* idegrendszerének más területeit vizsgálva megállapítottuk, hogy a központi idegrendszerben csak gliális elemek, a periférián pedig csak neuronok jelölődnek ezzel az antitesttel.

(3) A *Bufo* retinában elhelyezkedő Müller sejtekről megállapítottuk, hogy egyenletesen oszlanak el; a retinán belül nem jelölhetők ki magas vagy alacsony denzitású területek. Így a gliaelemek eloszlása nem követi a többi sejtes elemre jellemző látócsík-periféria gradienst. A *Bufo marinus* Müller sejtjeinek fénymikroszkópos morfológiája nem

tér el más fajokéitól. Elektronmikroszkópos szinten vizsgálva, az ONL-ben a Müller sejtek nyúlványai elválasztják a fotoreceptor sejttesteket egymástól, de a talpakat nem. A Müller sejtek sejttestei az INL-t két funkciójában és kapcsolatrendszerében is különböző rétegre osztják. A GCL-beli sejtek egy folytonos és egy nem folytonos gliális szigetelő réteg között helyezkednek el; továbbá az egyes sejtek vertikális nyúlványokkal is el vannak választva. A retinán belül az optikus axonokat nem borítják mielinhüvelyek.

Köszönetnyílvánítás

E munka nem jöhetett volna létre ***Dr. Straznicky Károly*** *(Charles) hathatós támogatása nélkül. Köszönetet mondok a* ***Flinders University****-n (School of Medicine, Department of Anatomy and Histology,* ***Adelaide,*** *Australia) dolgozó kollégáimnak, elsősorban* ***Dr. Baosong Zhu****-nak a sikeres együttműködésért.* ***Dr. Erdélyi Lajost*** *mint belső konzulenst szintén köszönet illeti. Végül de nem utolsósorban külön köszönet családom valamennyi tagjának a lelki támogatásért.*

8. Irodalomjegyzék

Ahnelt PK, Kolb H, Pflug R (1987) Identification of a subtype of cone photoreceptor, likely to be blue sensitive, in the human retina. J Comp Neurol 255:18-34

Beach DH, Jacobson M (1979) Patterns of cell proliferation in the developing retina of the clawed frog in relation to blood supply and position of the choroidal fissure. J Comp Neurol 183:625-632

Bignami A (1984) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. Brain Res 300:175-178

Binder LI, Frankfurter A, Kim H, Caceres A, Payne MR, Rebhun LI (1984) Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. Proc Natl Acad Sci USA 81:5613-5617

Bishop AE, Carley F, Lee V, Trojanowsky J, Marangos PJ, Dahl D, Polak JM (1985) Combined immunostaining of neurofilaments, neuron-specific enolase, GFAP and S-100. A possible means for assessing the morphological and functional status of the enteric nervous system. Histochemistry 82:93-97

Büssow H (1980) The astrocytes in the retina and the optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. Cell Tissue Res 206:367-378

Cicero TJ, Cowan WM, Moore BW, Suntzeff V (1970a) The cellular localization of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2. Brain Res 18:25-34

Cicero TJ, Cowan WM, Moore BW (1970b) Changes in the concentration of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2, during the development of the avian optic tectum. Brain Res 24:1-10

Collin SP (1987) Retinal topography in reef teleosts. PhD Thesis, University Qeensland, Brisbane, Australia

De Camilli P, Miller PE, Navone F, Therkauf WE, Wallee RB (1984) Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of rat studied by immunofluorescence. Neuroscience 11:817-846

De Monasterio FM, McCrane EP, Schein SJ (1981) Staining of blue-sensitive cones of the macaque retina by fluorescent dye. Science 213:1278-1281

De Monasterio FM, McCrane EP, Newlander JK, Schein SJ (1985) Density profile of blue-sensitive cones along the horizontal median of macaque retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 26:289-302

Dräger U (1983) Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. Nature (Lond) 303:169-171

Dräger UC, Edwards DL, Barnstable CJ (1984) Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. J Neurosci 4:2025-2042

Dreher Z, Wegner M, Stone J (1988) Müller cell endfeet in the inner surface of the retina: light microscopy. Visual Neurosci 1:169-180

Fite, KV, Lister, BC (1981) Bifoveal vision in *Anolis* lizards. Brain, Behav Evol 19: 144-54.

Frederick JM, Rayborn ME, Hollyfield LG (1989) Serotoninergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: selective staining, identification, development and content. J Comp Neurol 281:516-531

Gábriel R, Zhu B, Straznicky C (1991) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive elements in the distal retina of *Bufo marinus*: a light and electron microscopic study. Brain Res 559:225-232

Gábriel R, Straznicky C, Wye-Dvorak J (1992) GABA-like immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: evidence for the presence of GABA-containing ganglion cells. Brain Res 271:175-179

Garner CC, Brugg B, Matus A (1988) A 70 kD microtubule associated protein (MAP2c) related to MAP2. J Neurochem 50:609-615

Gaur CP, Eldred W, Sarthy PV (1988) Distribution of Müller cells in the turtle retina: an immunocytochemical study. J Neurocytol 17:683-692

Gold GH, Dowling JE (1979) Photoreceptor coupling in the retina of the toad, *Bufo marinus*. I. Anatomy. J Neurophysiol 42:292-309

Hailman JP (1976) Oil droplets in the eyes of adult amphibians: a comparative survey. J Morphol 148:453-468

Herzog W, Weber K (1978) Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Eur J Biochem 92:1-8

Hirokawa N, Nisanaga S, Shiomura Y (1988) MAP 2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neural cytoskeleton. J Neurosci 8:2769-2779

Hiscock J, Straznicky C (1989a) Morphological

SZTE Szegedi Tudományegyetem Könyvtár 13

characterization of substance P-like immunoreactive amacrine cells in the anuran retina. Vision Res 29:293-301

Hiscock J, Straznicky C (1989b) Neuropeptide Y-like immunoreactive amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. Brain Res 494:55-64

Holländer H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling T, Stone J (1991) Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. J Comp Neurol 313:587-603

Huber G, Matus A (1984) Difference in the cellular distribution of two microtubule-associated proteins MAP1 and MAP2 in rat brain. J Neurosci 4:151-160

Jagger WS (1988) Visibility of photoreceptors in the intact living cane toad's eye. Vision Res 25:729-731

Kim H, Binder LI, Rosenbaum JL (1979) The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. J Cell Biol 80:266-276

Kinney MS, Fisher SK (1978) The photoreceptors and pigment epithelium of the adult *Xenopus* retina: morphology and outer segment renewal. Proc R Soc Lond [Biol] 201:131-147

Kivela T (1986) Neuron-specific enolase in retinoblastoma. An immunohistochemical study. Acta Ophthalmol (Copenh) 64:19-25

Kleinschmidt J, Yazulla S (1984) Uptake of ^{3}H-glycine in the outer plexiform layer of the retina of the toad, *Bufo marinus*. J Comp Neurol 230:352-360

Krebs W, Krebs I (1987) Qualitative morphology of the primate peripheral retina (*Macaca irus*). Am J Anat 179:198-208

Lam DM-K, Li H-B, Su TY-Y, Watt CB (1985) The signature hypothesis: co-localization of neuroactive substances as anatomical probes for circuitry analysis. Vision Res 25:1353-1364

Lasansky A (1965) Functional implications of structural findings in retinal glial cells. Prog Brain Res 15:48-72

Linser PJ, Moscona AA (1979) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retinal localization in Müller fibers and dependence on cell interaction. Proc Natnl Acad Sci USA 76:6476-6480

Linser PJ, Moscona AA (1981) Carbonic anhydrase C in the neural retina: transition from generalised to

glial-specific cell localization during embryonic development. Proc Natnl Acad Sci USA 78:7190-7194

Maccarone C, Jarrott B (1985) Differences in regional brain concentrations of neuropeptide Y in spontaneously hypertensive (SH) and Wistar-Kyoto (WKY) rats. Brain Res 345:165-169

Marangos PJ, Parma AM, Goodwin FK (1978) Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase. J Neurochem 31:727-732

Marangos PJ, Schmechel D, Zis AP, Goodwin FK (1979) The existence and neurobiological significance of neuronal and glial forms of the glycolitic enzyme enolase. Biol Psychiat 14:563-579

Maturana HR, Lettvin JY, McCullock WS, Pitts WH (1960) Anatomy and physiology of vision in the frog (*Rana pipiens*). J Gen Physiol 43:129-175

Matus A (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. Annu Rev Neurosci 11:29-44

Miodonsky AJ, Bär T (1987a) Arterial supply of the choriocapillaris of anuran amphibians (*Rana temporaria, Rana esculenta*): scaning electron microscope (SEM) study of microcorrosion casts. Cell Tissue Res 249: 101-109

Miodonsky AJ, Bär T (1987b) The superficial vascular hyaloid system in the eye of frogs, *Rana temporaria, Rana esculenta*: scanning electron microscopic study of vascular casts. Cell Tissue Res 250:465-473

Molnar ML, Stefansson K, Marton LS, Tripathi RS, Molnar GK (1984) Immunohistochemistry in retinoblastomas in humans. Am J Ophthalmol 97:301-307

Moore BW (1972) Chemistry and biology of two proteins, S-100 and 14-3-2, specific to the nervous system. Int Rev Neurobiol 15:215-225

Moore BW (1973) Brain specific proteins. In: Proteins of the Nervous System (ed. Schneider DJ) Raven Press New York pp. 1-12

Morris JL, Gibbins IL, Campbell G, Murphy R, Furness JB, Costa M (1986) Innervation of the large arteries and heart of the toad (Bufo marinus) by adrenergic and peptide-containing neurons. Cell Tissue Res 243:171-184

Newman EA (1984) Regional specialization of retinal glial cell membrane. Nature (Lond) 309:155-157

Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K+ siphoning. Science (Wash) 225:1174-1175

Nguyen VS, Straznicky C (1989) The development and the topographic organization of the retinal ganglion cell layer in *Bufo marinus*. Exp Brain Res 75:345-353

Okabe S, Shiomura Y, Hirokawa N (1989) Immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins 1A and 2 in the rat retina. Brain Res 483:335-346

Osborne NN, Nicholas DA, Dockray GJ, Cuello AC (1982) Cholecystokinin and substance P immunoreactivity in retinas of rats, frogs, lizards and chicks. Exp Eye Res 34:639-649

Pasteels B, Parmentier M, Lawson EM, Vestappen A, Pochet R (1987) Calcium-binding protein immunoreactivity in pigeon retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:658-664

Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R (1990) Calbindin and calretinin localization in retina from different species. Vis Neurosci 5:1-16

Peterson EH, Ulinski PS (1979) Quantitative studies of retinal ganglion cells in a turtle, *Pseudemys scripta elegans*. I. Number and distribution of ganglion cells. J Comp Neurol 186:17-42

Pickel VM, Reis PJ, Marangos PJ, Zomzely-Neurath C (1976) Immunocytochemical localization of nervous system specific protein (NSP-R) in rat brain. Brain Res 105:184-187

Reichenbach A, Wohlrab F (1983) Quantitative properties of Müller cells in rabbit retina as revealed by histochemical demonstration of NADH-diaphorase activity. Grafe's Arch Clin Exp Ophtalmol 220:81-83

Reichenbach A, Schnitzer J, Friedrich A, Knothe A-K, Henke A (1991) Development of the rabbit retina: II. Müller cells. J Comp Neurol 311:33-44

Ripps H, Witkovsky P (1985) Neuron-glia interaction in the brain and retina. Prog Retinal Res 4:181-219

Robinson SR, Dreher Z (1990) Müller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implication for function and development. J Comp Neurol 292:178-192

Röhlich P, Szél A, Papermaster DS (1989) Immunocytochemical reactivity of *Xenopus laevis* retinal rods and cones with several monoclonal antibodies to visual pigments. J Comp Neurol 290:105-117

Röhrenbeck J, Wässle H, Boycott BB (1989) Horizontal cells in the monkey retina: immunocytochemical staining with antibodies against calcium binding proteins. Eur J Neurosci 1:407-420

Saxén L (1954) The development of the visual cells. Embryological and physiological investigations on amphibia. Ann Acad Sci Fenn [A] 23:1-107

Sarthy PV, Rayborn ME, Hollyfield JG, Lam DMK (1981) The emergence, localization and maturation of neurotransmitter systems during develoment of the retina in *Xenopus laevis*. II. Dopamine. J Comp Neurol 195:595-602

Scheuermann DW, Stach W, Timmermans JP, Adriensen D, De Groodt-Lasseel MHA (1989) Neuron-specific enolase and S-100 protein immunohistochemistry for defining the structure and topographical relationship of the different enteric nerve plexuses in the small intestine of the pig. Cell Tissue Res 256:65-75

Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978a) Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. Nature (Lond) 276:834-836

Schmechel D, Marangos PJ, Zis A, Brightman M, Goodwin FK (1978b) The brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. Science (Wash) 100:313-315

Schmechel DE, Brightman MW, Barker JL (1980a) Localization of neuron-specific enolase in mouse spinal neurons grown in tissue culture. Brain Res 181:391-400

Schmechel DE, Brightman MW, Marangos PJ (1980b) Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. Brain Res 190:195-214

Schnitzer J (1988) Astrocytes in the guinea-pig, horse and monkey retina: their occurence coincides with the presence of blood vessels. Glia 1:74-89

Schwassmann O (1968) Visual projection upon the optic tectum in foveate marine teleosts. Vision Res 8:1337-1348

Spencer R, Charman M, Amtage JS, Lawson DEM (1976) Production and properties of vitamin D-induced mRNA for chick calcium binding protein. Eur J Biochem 71:399-409

Stirling VR, Merill EG (1987) Functional morphology of frog retinal ganglion cells and their central projections: the dimming detectors. J Comp Neurol 258:477-495

Stone J, Dreher Z (1987) Relationship between astrocytes,

ganglion cells and vasculature of the retina. J Comp Neurol 255:35-49

Straznicky C (1992) Develoment of the anuran retina: past and present. In: Formation and regeneration of nerve connections (eds JW Fawcett and SC Sharma). Birkhäuser, Boston, pp 162-184

Straznicky C, Tóth P, Nguyen V-S (1990) Morphological classification and retinal distribution of large ganglion cells in the retina of *Bufo marinus*. Exp Brain Res 79:3435-3456

Szél A, Röhlich P (1988) Four photoreceptor types in the ground squirrel retina as evidenced by immunocytochemistry. Vision Res 28:1297-1302

Szél A, Diamanstein T, Röhlich P (1988) Identification of the blue sensitive cones in the mammalian retina by anti visual pigment antibody. J Comp Neurol 273:593-602

Timmermans JP, Scheuermann DW, Gábriel R, Adriaensen D, Fekete E, De Groodt-Lasseel MHA (1991) The innervation of the gastrointestinal tract of a chelonian reptile, *Pseudemys scripta elegans*. Histochemistry 95:397-402

Tóth P, Straznicky C (1989) Dendritic morphology of identified retinal ganglion cells in Xenopus laevis: a comparison between the results of horseradish peroxidase and cobaltic-lysine retrograde labelling. Arch Histol Cytol 52:87-93

Tucker RP, Matus AI (1987) Developmental regulation of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in the embryonic avian retina. Development 101:535-546

Tucker RP, Binder LI, Matus AI (1988) Differential localization of the high and low-molecular weight variants of MAP2 in the developing retina. Brain Res 466:313-318

Uga S, Smelser GK (1973) Comparative study of fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. Invest Ophtalmol Vis Sci 12:434-448

Underwood, G. (1951). Reptilian retinas. Nature 67: 183-85.

Vaughan DK, Laseter EM (1990) Glial and neuronal markers in bass retinal horizontal and Müller cells. Brain Res 537:131-140

Viereck C, Tucker RP, Binder LI, Matus A (1988) Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. Neuroscience 26:893-904

Vinores SA, Herman MM, Rubinstein LJ, Marangos PJ (1984) Electron microscopic localization of neuron-specific enolase in rat and mouse brain. J Histochem Cytochem 32:1295-1302

Wässle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. Physiol Rev 71:447-480

Wässle H, Rieman HJ (1978) The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. Proc Roy Soc (Lond) Biol 200:441-461

Wilhelm M, Straznicky C (1991) The numbers and the distribution of the neurons of the ganglion cell layer of the retina of six Australian lizards. Proc Austral Physiol Pharmacol Soc 22, 187

Wilhelm M, Straznicky C (1992) The topographic organization of the retinal ganglion cell layer of the lizard *Ctenophorus nuchalis*. Arch Histol Cytol 55:251-259

Witkovsky P, Levine JS, Engbertson GA, Hassin G, MacNichol EF (1981a) A microspectrophotometric study of normal and artificial visual pigments in the photoreceptors of *Xenopus laevis*. Vision Res 21:867-873

Witkovsky P, Yang CY, Ripps H (1981b) Properties of a blue-sensitive rod in the *Xenopus* retina. Vision Res 21:875-883

Zhang Y, Straznicky C (1991) The morphology and distribution of photoreceptors in the retina of *Bufo marinus*. Anat Embryol 183:537-544.

Zhu B-S, Straznicky C (1990a) Dendritic morphology and retinal distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive amacrine cells in *Bufo marinus*. Anat Embryol 181:365-371

Zhu B-S, Straznicky C (1990b) Morphology and distribution of serotonin-like immunoreactive amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. Vis Neurosci 5:371-378

Zhu B-S, Gábriel R, Straznicky C (1992) Serotonin synthesis and accumulation by neurons of the anuran retina. Visual Neurosci 9:377-388

Zhu B-S, Hiscock J, Straznicky C (1990) The changing distribution of neurons in the inner nuclear layer from metamorphosis to adult: morphometric analysis of the anuran retina. Anat Embryol 181:583-594

9. A disszertáció témakörével kapcsolatos saját közlemények jegyzéke

Gábriel R, **Wilhelm M**, Straznicky C (1992) Microtubule associated protein 2 (MAP2)-immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*; colocalisation with tyrosine hydroxilase and serotonin in amacrine cells. ***Cell and Tissue Research*** 269:175-182

Wilhelm M, Straznicky C, Gábriel R (1992) Neuron-specific enolase-like immunoreactivity in the vertebrate retina: selective labelling of Müller cells in Anura. ***Histochemistry*** 98:243-252

Gábriel R, **Wilhelm M**, Straznicky C (1993) Morphology and distribution of Müller cells in the retina of the toad Bufo marinus. ***Cell and Tissue Research*** 272:000-000