



B 3423

**KVANTITATÍV MORFOLÓGIAI ÉS NEUROHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK  
KÉTÉLTŰEK ÉS HÜLLŐK RETINÁJÁN**

**Tézisek a Philosophiae Doctor (PhD) fokozat elnyeréséhez**

Készítette: **WILHELM MÁRTA**  
intézeti biológus, POTE Farmakológiai és Farmakotherápiás Intézete, Pécs

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

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

Szeged, 1997.

## 1. Bevezetés

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

A gerinces állatok szeme a fénytől elfordult ún. inverz szem. A szem belsejében a fényinformációt idegi ingerre alakító szerkezet az ideghártya (retina). A retina legkülső, érhártya felé eső rétege a pigmentháms sejtek rétege. A retina azon sejtjei, amelyek a fényinformációt elektromos szignállá alakítják, a fotoreceptorok. Ezután következik az első szinaptikus zóna (külső rostos réteg). Ezt a réteget a fotoreceptor sejtek szinaptikus végződése és a középső sejt réteg külső sejt sorában elhelyezkedő horizontális és bipolaris sejtek kifelé irányuló nyúlványai hozzák létre. A bipolaris sejtek axonjai valamint a belső szemcsesejtes réteg belső sejt sorában elhelyezkedő amakrin sejtek nyúlványai a retina belseje felé irányulnak. Az amakrin sejtek a belső retina axon nélküli interneuronjai. E sejtek szinaptikus bementei és kimenetei ugyanazon a nyúlványrendszeren (dendriteken) keresztül valósulnak meg. Ezek a nyúlványok, a bipolaris sejtek axonjai és a retina dúcsejtjeinek dendritjei hozzák létre a belső rostos réteget. A kimenő információt a dúcsejtek rétegében helyet foglaló ganglionsejtek továbbítják a magasabb idegi központokba. A ganglionsejtek között fajoként változó arányban ún. "displaced" (D-) amakrin sejtek találhatók. E sejtek sejttestjei rendellenesen nem a belső szemcsesejtes rétegben, hanem a ganglionsejtrétegben találhatók meg. Ugyanakkor nyúlványaik az ortotóp amakrin sejtekhez hasonlóan a belső rostos rétegben ágaznak el. A dúcsejtek axonjai az optikus rostok rétegében szedődnek össze kötegekké, majd a vakfolton keresztül elhagyják a szemet. A retinát az üvegtest felé egy gliatálpakból álló réteg határolja el az üvegtesttől. A gliatálpak a retina fő gliaelemeinek, a Müller-sejteknél a nyúlványai (Dowling 1987).

A retinában mind vertikális, mind horizontális irányban jöhetnek létre kapcsolatok az idegsejtek között. A vertikális kapcsolatrendszerben a fotoreceptor sejtekről az információ a bipolaris sejtekre tevődik át. A retinában fényhatásra hiperpolarizáló illetve depolarizáló bipolaris sejtek működnek. A bipolarisok ezután a dúcsejtek felé továbbítják az ingerületet. A dúcsejteken a bipolaris sejtek e kettős tulajdonsága úgy jelentkezik, hogy azok fényválaszukat tekintve szintén kétfélek lehetnek: akciós potenciálokat generálhatnak a fény bekapcsolására (ON-sejtek) illetve annak kikapcsolására (OFF-sejtek). A jelenlegi álláspont szerint a vertikális információfeldolgozó rendszer elemei glutamátot használnak transzmitterként. A horizontális kapcsolatrendszer két támadásponton avatkozhat be az információ feldolgozásába: a horizontális sejtek révén a külső rostos réteg szintjén és az amakrin sejtek révén a belső rostos réteg szintjén. Ez a szerveződés teszi lehetővé, hogy mind a bipolaris, mind a ganglionsejtek szintjén létrejöjjön a receptív mezők antagonisztikus központ-környék organizációja. A horizontális sejtek a fotoreceptoroktól kapott jeleket polaritásukat tekintve megfordítják és laterálisan szállítják tovább, létrehozva ezzel egy, a fényinger hatására létrejövő központi serkentett és környéki gátolt mezőt. Ezzel a retinában már a bipolaris sejtek szintjén szegregálódnak egymástól a fényjel bekapcsolására illetve annak kikapcsolására reagáló neuronok. Az amakrin sejtek hasonló feladatokat látnak el a dúcsejtek esetében, mint

a horizontális sejtek a bipolárisoknál. Az amakrin sejtek azonban komplex retinális események alakításában is részt vállalnak. Az e csoportba tartozó neuronok mutatják a legnagyobb morfológiai és transzmitter diverzitást. A ma elfogadott nézet szerint a horizontális információfeldolgozás legfontosabb mediátoranyagai a gamma-aminovajsav (GABA) és a glicin (Wassle és Boycott 1991).

Külön figyelem illeti meg azonban az említett transzmitterek mellett a monoaminokat, nevezetesen a dopamint és a szerotonint. Ezen anyagok ugyanis elsődleges szerepet játszanak a fényadaptációs folyamatokban. Fény hatására a retina dopaminerg sejtjei kibocsátják transzmitter tartalmukat elindítva egy olyan eseménysort, amely a fényérzékenység csökkenését de a látásélesség javulását hozza magával (Deary és Witkovsky 1992). A dopaminerg sejteket a szakirodalom alacsonyabbrendű gerincesek retinájában homogén populációként tartja számon (Zhu és Straznicky 1990a). A szerotonin szerepére vonatkozóan az adatok kevésbé egyértelműek. Az azonban bizonyos, hogy a nem emlős állatok retinájában magas endogén szerotonin koncentrációk mérhetők ki biokémiai módszerekkel (Osborne és mtsai 1982) és békákban több, egymástól morfológiailag (Zhu és Straznicky 1990b) és neurohisztokémiailag (Zhu és mtsai 1992) elkülöníthető sejtpopulációt alkotnak. Hosszú és munkánk megkezdéséig sem egyértelműen lezárt vita folyt arról az irodalomban, hogy vajon az emlős retinának vannak-e szerotonin szintézisére képes neuronjai. Megfelelő módszerek hiányában azonban egyértelmű bizonyítékokat sem pro sem kontra nem szolgáltatott az irodalom.

A retinában a sejteloszlás vizsgálatok a különböző retinaterületek között anatómiai eltéréseket találtak. Ezek leírásakor elsősorban a ganglionsejtrétegben lévő sejtek eloszlását vették figyelembe. Itt ugyanis a sejtek nazotemporális irányban nagyobb sejtűrűségű csíkot hozhatnak létre, amely a teljes retinapreparátumokon (wholamountokon) 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 centralis-szá. Ezek a retinális sejtűrűség-változások valószínűleg 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 alacsonyabbrendű gerincesek, ezen belül is a kétéltűek és hüllők retinája nem tartalmaz véredényeket; a tápláló erek vagy az üvegtestben vagy az érhártyában, esetleg mindkét helyen futnak (Miodonsky és Bar 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 a szénsavanhidráz enzim (Linser és Moscona 1981; Reichenbach és mtsai 1991). A Müller sejtek eloszlását fénymikroszkópos szinten számos gerincesben tanulmányozták már az előbb említett markerek kimutatásával (Bignami 1984; Dräger és mtsai 1984; Gaur és mtsai 1988; Vaughan és Laseter 1990). Az emlősökben a Müller sejtek nem egyenletesen oszlanak el a retinában. A legmagasabb sejtűrűségű értékeket a látócsík/area centralis területén találták, mely a nyúlban 15000 (Robinson és Dreher 1990), egérben pedig 12000 (Dräger és mtsai 1984). Ezek az értékek a retina periferiáján kb. harmadrészükre lecsökkennek. Ezzel szemben a teknős retina Müller sejtjei egyenletesen oszlanak el, és az átlagos denzitást  $1600/\text{mm}^2$ -re becsülték (Gaur

és mtsai 1988). Figyelemre méltó, hogy ugyanakkor a teknős jól fejlett látócsikkal bír (Peterson és Ulinski 1979).

## 2. Célkitűzések

Amint az a fent leírtakból is kitűnik, az alacsonyabbrendű gerincesek (ezen belül is különösen a kétlétűek és hüllők) retinájának még számos feltáratlan kvantitatív morfológiai és neurokémiai tulajdonsága van. Ráadásul e fajok látórendszerét egyéb szempontokból is kevésbé ismerjük. A látórendszer vizsgálatában az első lépést a retina tulajdonságainak megismerése jelentheti. Vizsgálatainkat tehát a retina neuroanatómiájának feltárása céljából végeztük. E témakörön belül kísérleteinket két fő célkitűzés köré csoportosítottuk:

### a. Kvantitatív morfológiai vizsgálatokat végeztünk

1. Ausztráliai gyíkfajok retinái ganglionsejtrétegének feltérképezésére és a ganglionsejtek valamint a D- amakrin sejtek számának megállapítására.
2. A *Bufo marinus* retina gliasejtjei neurokémiai azonosítására és eloszlásának vizsgálatára.
3. A *Bufo marinus* retina belső rostos rétege szinapszisai eloszlási mintázatának megállapítására.

### b. Immuncitokémiai kísérleteket végeztünk

1. A monoaminerg amakrin sejtek neurokémiai kódrendszerének megfigyelésére *Bufo marinus*-ban.
2. A szerotonin tartalmú sejtek szerotonin szintetizáló képességének összehasonlítására különböző gerinces fajokban.

## 3. Anyagok és módszerek

Kísérleteink zömét ivarérett, mindkét nembeli óriás varangyokon (*Bufo marinus*) végeztük. A gyíkok dúcsejteloszlásának analízisét elsősorban *Ctenophorus nuchalis* (galléros sárkánygyík) egyedeken hajtottuk végre. Összehasonlító vizsgálatok céljaira a következő fajok egyedeinek néhány példányát használtuk fel: *Carassius auratus* (aranyhal), *Ambystoma mexicanum* (axolotl), *Xenopus laevis* (karmosbéka), *Ctenophorus fionnii* (sivatagi sárkánygyík), *Pogona vitticeps* (kéknyelvű gyík), *Tiliqua rugosa* és *scincoides* (szkink fajok), *Underwoodisaurus millii* (gekkó), *Varanus gouldii* (varánusz), *Chelonia longicollis* (hosszúnyakú teknős), *Gallus domesticus* (házi tyúk), *Rattus norvegicus* (vándorpatkány), *Felis catus* (házi macska), *Cavia cutleri* (tengerimalac), *Lepus europeus* (házi nyúl). Humán retinákat posztmortem a Lion's Eye Bank bocsátott rendelkezésünkre 4-8 órával a halál beállta

után. A szabadon élő és licensz alapján befogott fajok egyedeiből csak a szükséges minimális mennyiségű anyagot gyűjtöttük be. Az állatok leölését más laboratóriumok igényeivel egyeztetjük.

### ***Szövetelőkészítés***

Az állatokat trikain-metánszulfonát vagy uretán 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. A GABA immuncitokémiai kimutatására szánt anyagok esetében 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 felolvastottuk vagy dimetil-szulfoxidban 3x20 percig kezeltük. Ezután újra mosássorozatot 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 vágunk.

### ***Immunocitokémia-egyes jelölés***

Mind a metszeteket, mind a nagyobb retina darabokat előinkubáltuk az antitesthígító 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 primer antitesteket (egérben termeltetett anti-MAP2 és anti-triptofán hidroxiláz valamint nyúlban termeltetett anti-neuron specifikus enoláz, anti-GFAP elleni antitesteket) a megfelelő hígításban egy éjszakán át alkalmaztuk. A reakciót vagy az ABC eljárás alkalmazásával diaminobenzidin csapadék formájában vagy kecske anti-egér antitestekhez kötött fluorescein-izotiocianáttal tettük láthatóvá. Preparátumainkat Olympus BH2 normál és Leitz Orthoplan fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk és fényképeztük, valamint camera lucida segítségével azokról alkalmasint rajzokat készítettünk.

### ***Immunocitokémia-kettős jelölés***

A fent leírt mintaelőkészítés után a következő párosításban végeztünk el kettős immunfluoreszcens jelöléseket (az elől álló antitestet egérben, a hátul állót nyúlban termeltették): MAP2-szerotonin, MAP2-tirozin hidroxiláz, MAP2-GABA, MAP2-neuropeptid Y, MAP2-P-anyag, MAP2-kolecisztokinin; triptofán hidroxiláz-szerotonin, triptofán hidroxiláz-tirozin hidroxiláz; triptofán hidroxiláz-GABA, GABA-szerotonin, GABA-tirozin hidroxiláz, GABA-P-anyag és GABA-neuropeptid Y. Valamennyi kísérletben Texas Redhez kötött lo anti-egér antitesttel illetve fluoreszcein-izotiocianáthoz kötött kecske anti-nyúl antitesttel tettük az epitópokat láthatóvá. Kontroll kísérleteinkben igazoltuk, hogy az elsődleges és a nekik fajspecifitás szerint nem megfelelő másodlagos antitestek között nem volt immunreakció. Minden, a kísérleti protokollokban használt antitest kereskedelmi forgalomban beszerezhető anyag volt.

### ***Kvantitatív analízis-sejtek és egyes sejttípusok retinális eloszlásának meghatározása***

Camera lucida segítségével lerajzoltuk a retinákat, területüket egy HIPAD elektromos rajzasztalon mértük, mely egy Northstar számítógéppel volt összeköttetésben. Szabályos térközlőként a meghatározott retinaterületre eső sejteket megszámoltuk. A teljes sejtszámot az átlagos sejtszámok segítségével számítottuk ki úgy, hogy a szomszédos denzitásvonalak közti területekre vonatkozó sejtszámokat összeadtuk. Ahol a több egymás alatt elhelyezkedő

sejtréteg miatt wholomounth preparátumokon megbízható sejtszámbecsléseket nem tudunk végezni, ott sorozatmetszet-rekonstrukció segítségével korrigáltuk a sejtszámokat. Hasonló elv alapján határoztuk meg a nervus opticusban található idegrostok teljes számát is.

#### ***Kvantitatív analízis-a belső rostos réteg szinaptológiai vizsgálata***

Rutin elektronmikroszkópos beágyazást követően kis nagyítású elektronmikroszkópos felvételekből montázsokat készítettünk. Ezután a megfelelő területeket nagy nagyítással feltérképeztük oly módon, hogy a belső rostos réteget öt szublaminára osztva, minden szublaminában megszámloltuk az egyes sejttípusok közti szinapszisokat. Az így kapott értékeket egy digitalizáló tábla valamint egy számítógépprogram segítségével terület- valamint térfogategységekre is kiszámítottuk.

#### **4. Eredmények és megbeszélésük**

##### ***Retinális specializációk ausztráliai gyíkfajok ganglionsejtrétegében***

Az ausztráliai gyíkok különböző fajaiban különböző fokú retinális specializációk találhatók. A dúcsejtek száma néhány százezettől kétmillióig változhat. A dúcsejtrétegben D-amakrinsejtek is megtalálhatók, ezek aránya mintegy 15-20%. Ez az arány megfelel a békáknál becsült adatoknak (Nguyen és Straznicky 1989). A dúcsejtréteg sejtjei egyes fajok retinájában csak gyenge látócsíkot alkotnak a ganglionsejtrétegben, míg más fajokban (*Varanus* és *Ctenophorus*) area centralis is kifejlődött. Végteljes specializációként megemlíthetők az amerikai *Anolis* gyíkok, melyeknek két foveájuk is van (Underwood 1951; Fite és Lister 1981).

Mindezek a megfigyelések megdöntötték azt a korábbi elképzelést, hogy a retinális specializációk megjelenése és fejlődése a törzsfjlődés vonalát követi, és hogy csak a madaraknál és az emberszabású főemlősöknél jelenik meg a fovea centralis. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált ausztráliai gyíkfajok közül számos faj esetében a rutin eljárásnak számító wholomount preparátumokon végzett ganglionsejtszámlálások nem adnak kielégítő eredményt, mivel a sejtek több sejtsorban is elhelyezkednek, s így nem lehet megfelelően fókuszálni a különböző sejtrétegekre. Különösen jellemző volt ez a *Ctenophorus* gyík esetében, így ilyenkor mindig ajánlatos a sejtszámok sorozatmetszeteken történő meghatározása. Ilyen fokú gondosságra a neuronszámok becslésekor eddig csupán a főemlősök fovea centrális esetében volt szükség.

##### ***Adatok a Bufo marinus retina monoaminerg sejtjeinek neurokémiai kódrendszeréhez***

A nagyméretű monoamin tartalmú sejtek további neurohisztokémiai karakterizálását sok antitesttel megkíséreltük. Ezek közül csak a MAP2 elleni antitestek által jelölt sejtek voltak hasonlatosak morfológiai szempontból a monoaminerg amakrin sejtekhez. A nagyméretű amakrin sejteken kívül a MAP2 elleni antitestekkel a keresztmetszeteken a retina minden sejtrétegében találtunk jelölt elemeket. A jelölt fotoreceptorokat rövidebb külső szegmentjeik és a külső rostos rétegben mélyen elhelyezkedő szómájuk alapján csapoknak tekintettük. Ezek 6-8  $\mu\text{m}$  átmérőjűek; végtalpaik és telodendrionjaik szintén láthatóak voltak az OPL-ben. A GCL-ben két sejtpopuláció volt immunpozitív: egy erősen jelölt, nagy sejtestű (16-22  $\mu\text{m}$ ), és egy kisebb (7-8  $\mu\text{m}$ ) kevésbé intenzíven jelölt sejt. Ez első kategóriához tartozó sejteket kettős jelöléses kísérletekben egyértelműen ganglionsejtekként azonosítottuk, a második sejtpopuláció azonosításához további vizsgálatok szükségesek.

A MAP2 tartalmú amakrin sejtek további azonosítására kettős jelöléses kísérleteket végeztünk. Csak a 5HT és a TH-pozitív sejtek tartalmazták ezt a citoszeletális fehérjét. MAP2 jelölés volt jelen a 5HT-pozitív amakrin sejtek egy részében (25-30%), míg valamennyi TH-pozitív amakrin sejt tartalmazott MAP2-t is, de a MAP2 tartalmú sejtek egy része nem tartalmazott TH-t. 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 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.

A MAP2 szerepe a retinában tisztázatlan. A patkány központi idegrendszerének legtöbb neuronja tartalmazza ezt a fehérjét amelyről kimutatták, hogy szerkezete filogenetikusan konzervatív (Viereck és mtsai 1988). Hogy a retinában elterjedése miért korlátozódik bizonyos sejt típusokra, azt vizsgálataink alapján nem lehet megállapítani. E fehérje funkciója a neurotubulusok és a neurofilamentek közti kötések kialakítása és ezáltal a citoskeleton stabilizációja (Hirokawa és mtsai 1989; Matus 1988). Hiányában feltehetően a sejt váz vagy gyenge, vagy más komponensekből épül fel. E kérdés tisztázására további kísérletekre lesz szükség. Mindenesetre feltűnő, hogy a MAP2 elsősorban nagyméretű dendritfával rendelkező sejtekben van jelen.

Megvizsgáltuk a retina egyik legfontosabb gátló transzmitterének, a GABA-nak az előfordulását a monoaminerg sejtekben. A tirozin hidroxiláz tartalmú és a GABA pozitív sejtek teljesen eltérő sejt populációt alkotnak. Mintegy 30%-os átfedést tapasztaltunk a szerotonint és a GABA-t tartalmazó sejt populációk között. Mivel a GABA tartalmú sejtek soha nem MAP2 pozitívak, ugyanakkor a nagyméretű szerotonin-pozitív amakrin sejtek mindig tartalmazzák ezt a proteint, indirekt módon megállapíthatjuk, hogy a GABA a kisméretű szerotonint tartalmazó amakrin sejtek neurokémiai markere. Adataink összhangban vannak más szerzők megfigyeléseivel mind a dopaminerg sejtek (Wulle és Wagner 1990) mind a szerotonin tartalmú neuronok (Zhu és Straznický 1993) vonatkozásában. Megállapítható tehát, hogy a Lam és mtsai (1985) által bevezetett ún. "signature" hipotézis a kétélű retina monoaminerg sejtjeire nézve igaznak bizonyult. Miután egyéb itt nem részletezendő vizsgálataink hasonló eredményeket hoztak, feltételezzük, hogy a fent említett hipotézis általános érvényűnek tekinthető a retinában.

#### *A szerotonin tartalmú és szerotonint szintetizáló amakrin sejtek összehasonlítása különböző gerinces fajokban*

Biokémiai mérések magas endogén szerotonin tartalmat mutattak ki nem emlős fajok retinájában, míg emlős fajok retinájában csak szerotonin előkezelés után sikerült szerotonin tartalmú sejteket jelölni (Osborne és mtsai 1982). Az irodalomban hosszú ideig tisztázatlan maradt az a kérdés, hogy az emlős retinában vannak-e szerotonin szintetizálására képes neuronok. Zhu és mtsai (1992) megfelelő módszert találtak a szerotonin szintetizáló és akkumuláló sejtek elkülönítésére kétélű retinában. A máj fenilalanin-hidroxiláz (PH) enzimje ellen termelt antitest felismeri az idegrendszerben a triptofán-hidroxiláz és a tirozin hidroxiláz enzimeket is, amelyek közül az előbbi a szerotonin egyik szintetizáló enzimje. Így módon anti-szerotonin és anti-PH antitestekkel megállapítható a szerotonin szintetizáló és akkumuláló sejtek közti különbség mind az emlős, mind pedig a nem-emlős fajokban. A kettős jelölések

során azokat a sejteket, melyek csak az anti-PH antitesttel jelölődtek dopaminerg sejteknek tekintettük annak alapján, hogy tirozin-hidroxiláz (TH) elleni antitestekkel valamennyi általunk vizsgált fajban teljes volt az átfedés. Azok a sejtek, melyek mind szerotonin-, mind PH-immunreaktivitást mutattak szerotonin szintetizáló sejteknek tekinthetők triptofán hidroxiláz tartalmuk alapján. A csak szerotonin-immunreaktivitást de PH-immunreaktivitást nem mutató retinális sejteket szerotonint akkumuláló neuronoknak tekintettük.

Összehasonlító vizsgálataink során két emlős fajt vizsgáltunk, és sem a macska, sem a nyúl retinájából készült preparátumokon nem sikerült szerotonin elleni antitesttel jelölt sejteket találnunk, míg az összes PH tartalmú sejt egyúttal TH-pozitív is bizonyult. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy az emlős retinában nincsenek triptofán-hidroxiláz tartalmú, szerotonint szintetizálni képes sejtek. A nem emlős gerincesek közül az aranyhal retinájának vizsgálata során az S1 típusú amakrin sejtek jelölődtek anti-szerotonin antitesttel, s a teljes sejtpopuláció kettős jelölt volt az anti-PH és anti-szerotonin antitestekkel. Az axolotl retinában nagyméretű S1 és kisméretű S2 sejtek mutattak szerotonin-immunreaktivitást, de csak az S1 típusú amakrin sejtek teljes populációja tekinthető szerotonin-szintetizálónak PH immunreaktivitásuk alapján. Az S2 típusú amakrin sejtek mintegy fele csak akkumulálja a szerotonint, mert PH-immunreaktivitás ezekben a sejtekben nem volt megfigyelhető. A teknős retinában gyenge szerotonin immunreaktivitás volt tapasztalható a bipoláris sejtekben, míg erős immunreaktivitás látható mind az S1, mind az S2 típusú amakrin sejtekben. A kettős jelöléses kísérletekben megállapítottuk, hogy valamennyi S1 típusú nagyméretű szerotonin tartalmú amakrin sejt, valamint a kisméretű S2 sejtek 40%-a tekinthető szerotonin szintetizálónak, PH immunreaktivitásuk alapján. A csirke retinában nagyszámú bipoláris sejt és egy amakrin sejt típus jelölődött anti-szerotonin antitesttel. Az amakrin sejtek valamennyien kettős-jelöltek voltak az anti-PH és az anti-szerotonin antitestekkel, míg a bipoláris sejtek a PH-immunreaktivitás hiánya miatt csak szerotonint akkumulálóknak tekinthetők.

Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy számos gerinces faj retinájában vannak olyan amakrin sejtek, melyek bár nem képesek szerotonin szintézisére, mégis képesek azt viszonylag nagy (immuncitokémiailag kimutatható) mennyiségben felhalmozni. Annak megállapítására, hogy ez a felhalmozott szerotonin transzmitterként kibocsátódik-e a szerotonin-akkumuláló neuronokból, további vizsgálatok szükségesek.

#### ***A Bufo marinus retina gliasejtjeinek neurokémiai markerei és retinális eloszlása***

Miután a GFAP az alacsonyabbrendű gerincesek Müller sejtjeinek megbízható markere, kettős jelöléses kísérleteket hajtottunk végre e sejtek egyéb neurokémiai jellemzőinek feltárására. Meglepetésünkre, 100%-os kolokalizációt sikerült kimutatnunk, amikor anti-neuron specifikus enoláz (NSE) és -GFAP antitesteket használtunk. A NSE általában a neuronok valamint a centrális és perifériás neuroendokrin sejtek markere (Schmechel és mtsai 1978). A humán retinális neuronok még daganatos transzformáció után is megtartják ezen markerüket (Kivela 1986). Ennek ellenére mind a NSE- és a GFAP-immunreaktivitás jelen volt a Müller sejtekben a *Bufo marinus* retina minden rétegében. Ez az eredmény annál inkább is váratlan, minthogy e marker egyéb gerinces fajok (aranyhal, axolotl, gyík, csirke, tengerimalac, patkány, nyúl, macska, ember) retinájában neuronokat jelölt. Kísérleteinkben azt is igazoltuk, hogy a farkatlan kétélűű központi idegrendszerének egyéb gliaelemei is NSE pozitívak. Újabban azon felfedezésünk, hogy a *Bufo* retina gliasejtjei neuronális markereket is tartalmazhatnak, további megerősítést nyert azáltal, hogy az egyik

neuropeptid, a neuropeptid Y jelenlétét is kimutatták e sejtekben más szerzők (Zhu és Gibbins 1996).

A Müller gliák eloszlása nem követi a retinális neuronok eloszlását. A neuronok ugyanis a retina nasotemporális átlója mentén egy látócsíkba szerveződnek (Zhu és mtsai 1990). Ezzel szemben a Müller-sejtek a retina egész felületén gyakorlatilag egyenletes eloszlásúak. Miután más velőcső eredetű gliasejt nincs a *Bufo* retinában, a Müller sejtek a szokásos támasztó (Hollander és mtsai 1991) és K<sup>+</sup> forgató funkciójuk (Newman 1984, Newman és mtsai 1984) mellett az egyes optikus rostkötegek kezdeti burkolását is elvégzik.

#### *A Bufo marinus retina belső rostos rétegének kvantitatív szinaptológiája*

A *Bufo marinus* retinában a szinapszissűrűség magasnak mondható. A legmagasabb a szinapszissűrűség az 1-es, a legalacsonyabb a 3-as alrétégben. A legtöbb szinapszis interamakrin, de jelentős számban találni amakrin sejt - ganglionsejt kapcsolatokat is. A bipoláris sejtek kimenetei is zömében amakrin sejtekre irányulnak, és gyakran reciprok szinapszisok formájában a bipoláris sejtek axonjai bemeneteket kapnak az amakrin sejtektől.

Miután rutin elektronmikroszkópos metszeteken nehéz a ganglionsejtdendritek felismerése, a direkt bipoláris - ganglionsejt szinapszisokat nem tudtuk megbízhatóan azonosítani. E szinapszistípus jelenlétét és alrétégspecifikus eloszlását a legutóbbi időkben ganglionsejtek tömeges feltöltése utáni módszeres kvantitatív analízis segítségével sikerült igazolni (Buzás és mtsai 1996). Mindezen vizsgálatok azt a korábban már más szempontból felvetett tényt támasztják alá, hogy az alacsonyabbrendű gerincesek retinája bonyolultabb fényfeldolgozási folyamatok végrehajtására képes, mint az emlősöké. A retinák közti ilyen különbség a látási információt feldolgozó háttérapparátus, jelen esetben az agyvelő látási információ feldolgozásáért felelős részeinek összessége, különböző fejlettségével magyarázható. Fejlettebb agy esetében az információfeldolgozás nagyobb hányada történik a magasabb központokban, így a retinának, mint elsődleges analízátornak a szerepe csökken.

### **5. Az új tudományos eredmények összefoglalása**

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy:

1. Az ausztráliai gyík fajok retinájában az életmód függvényében a retinális specializációk eltérő fejlettségűek lehetnek. A legstruktúráltabb dúcsejtréteggel a vizsgált fajok közül a *Ctenophorus nuchalis* rendelkezik, amelynek mintegy 2 millió ganglionsejtje látócsíkot és area centralist alkot.
2. A *Bufo marinus* retina gliasejtjei, szemben neuronjaival, egyenletes eloszlást mutatnak a retina egészében. A mm<sup>2</sup>-enkénti mintegy 1600 gliasejt mindegyike néhány tíz neuron támasztását és részleges elektromos izolálását biztosítja. E sejtek a szokványos gliális neurokémiai markereken kívül neuron-specifikus enoláz is tartalmaznak.
3. A *Bufo marinus* retina belső rostos rétege szinapszistípusainak szublamínáris eloszlása eltérő. A bipoláris sejtek szinapszisa leggyakrabban a 2. és 4. rétegben, az amakrin-ganglionsejt szinapszisok az 1-es és 5-ös alrétégben a leggyakoribbak.

4. A monoaminerg amakrin sejtek közül a dopaminerg sejtek és a nagyméretű szerotonin tartalmú sejtek mindegyikében a MAP2 is megtalálható. E sejtek egyike sem tartalmaz GABA-t. A kisméretű szerotonin tartalmú sejtek ugyanakkor nagyrészt GABA tartalmúak.

5. Bebizonyítottuk, hogy minden általunk vizsgált alacsonyabbrendű gerinces faj retinájában vannak szerotonin szintetizáló sejtek. Az emlős retina ugyanakkor nem tartalmaz szerotonin szintézisére képes neuronokat.

Eredményeinkkel számos új információhoz jutottunk az alacsonyabbrendű gerincesek retinájának neuroanatómiájára és neurokémijára vonatkozóan. Ezek a vizsgálatok jó alapot szolgáltatnak további fiziológiai és farmakológiai kísérletek elvégzésére. Így jobban megismerhetjük az alacsonyabbrendű retinák emlősökétől eltérő tulajdonságait és megtalálhatjuk azokat a retinális köröket, amelyek lehetővé teszik az emlősökénél hatékonyabb retinális információfeldolgozást.

## 6. Irodalomjegyzék

- Bignami A (1984) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res* 300:175-178
- Buzás P, Jeges S, Gábel R (1996) The number and distribution of bipolar to ganglion cell synapses in the inner plexiform layer of the anuran retina. *Visual Neurosci* 13: 1099-1107
- Collin SP (1987) Retinal topography in reef teleosts. PhD Thesis, University Queensland, Brisbane, Australia
- Dowling JE (1987) The retina. An approachable part of the brain. Belknap Press, Chicago.
- Drager UC, Edwards DL, Barnstable CJ (1984) Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J Neurosci* 4:2025-2042
- Fite, KV, Lister, BC (1981) Bifoveal vision in *Anolis* lizards. *Brain, Behav Evol* 19:144-154
- Gaur CP, Eldred W, Sarthy PV (1988) Distribution of Müller cells in the turtle retina: an immunocytochemical study. *J Neurocytol* 17:683-692
- Hirokawa N, Nisanaga S, Shiomura Y (1988) MAP2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neural cytoskeleton. *J Neurosci* 8:2769-2779
- Hollander 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
- Kivela T (1986) Neuron-specific enolase in retinoblastoma. An immunohistochemical study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 64:19-25
- 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
- Linser PJ, Moscona AA (1981) Carbonic anhydrase C in the neural retina: transition from generalised to glial-specific cell localization during embryonic development. *PNAS USA* 78:7190-7194
- Matus A (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 11:29-44
- Miodonsky AJ, Bar T (1987a) Arterial supply of the choriocapillaris of anuran amphibians (*Rana temporaria*, *Rana esculenta*): scanning electron microscope (SEM) study of microcorrosion casts. *Cell Tissue Res* 249:101-109
- Miodonsky AJ, Bar 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
- 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<sup>+</sup> 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
- Osborne NN, Nesselhut T, Nicholas DA, Patel S, Cuellar AC (1982) Serotonin-containing neurons in the vertebrate retinas. *J Neurochem* 39:1519-1528

- 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
- 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
- Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978) Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature (Lond)* 276:834-836
- 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
- Wassle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71:447-480
- Witkovsky P, Deary A (1992) Functional roles of dopamine in the vertebrate retina. *Prog Retinal Res* 11:247-292
- Wulle I, Wagner H-J (1990) GABA and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry reveals different patterns of colocalization in retinal neurons of various vertebrates. *J Comp Neurol* 296:173-178
- Zhu B-S, Gibbins IL (1996) Müller cells in the retina of cane toad, *Bufo marinus*, express neuropeptide Y-like immunoreactivity. *Visual Neurosci* 13:501-508
- Zhu B-S, Straznický 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, Straznický 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, Gábel R, Straznický C (1992) Serotonin synthesis and accumulation by neurons of the anuran retina. *Visual Neurosci* 9:377-388
- Zhu B-S, Straznický C (1993) Co-localization of serotonin and GABA in neurons of *Xenopus laevis* retina. *Anat Embryol* 187:549-555
- Zhu B-S, Hiscock J, Straznický 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

## 7. Saját tudományos közlemények jegyzéke

### Közlemények referált tudományos folyóiratokban

1. Wilhelm M, Straznický C (1992) The topographic organization of the retinal ganglion cell layer of the lizard *Ctenophorus nuchalis*. *Arch Histol Cytol* 55:251-259
2. Gábel R, Wilhelm M, Straznický C (1992) MAP2-immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: colocalisation with tyrosine hydroxylase and serotonin in amacrine cells. *Cell Tissue Res* 269:175-182
3. Wilhelm M, Straznický C, Gábel R (1992) Neuron-specific enolase-like immunoreactivity in the vertebrate retina: selective labelling of Müller cells in Anura. *Histochemistry* 98:243-252

4. Wilhelm M, Schulz H, Gábel R (1992) Behaviour of an alcohol-preferring strain of Wistar rats. *Acta biol Szeged* 38:57-66
5. Wilhelm M, Zhu B, Gábel R, Straznicky C (1993) Serotonin-synthesizing neurons in the vertebrate retina: a comparative study. *Exp Eye Res* 56:341-350
6. Gábel R, Wilhelm M, Straznicky C (1993) Morphology and distribution of Müller cells in the retina of the toad *Bufo marinus*. *Cell Tissue Res* 272:183-192
7. Main C, Wilhelm M, Gábel R (1993) Colocalization of GABA-immunoreactivity in neuropeptide- and monoamine-containing amacrine cells in retina of *Bufo marinus*. *Arch Histol Cytol* 56:161-166
8. Gábel R, Wilhelm M (1994) Quantitative synaptology of the inner plexiform layer of the retina of *Bufo marinus*. *Eur J Morphol* 32:19-33
9. Barthó L, Maggi CA, Wilhelm M, Patacchini R (1994) Tachykinin NK1 and NK2 receptors mediate atropine-resistant ileal circular muscle contractions evoked by capsaicin. *Eur J Pharmacol* 259:187-193
10. Wilhelm M, Báthori Z, Gábel R (1997) NADPH-diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. *Közlésre benyújtva*.

#### *Közlemények nemzetközi kongresszusokon*

1. Wilhelm M, Straznicky C (1991) The numbers and the distribution of neurons of the ganglion cell layer of the retina of six Australian lizards. 26th Meeting APPS, Melbourne. *Proc Austral Physiol Pharmacol Soc* 22:187
2. Straznicky C, Wilhelm M, Gábel R (1992) MAP2-immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: colocalization with tyrosine hydroxylase and serotonin in amacrine cells. 12th Meeting ANS, Adelaide. *Proc Austral Neurosci Soc* 3:64
3. Wilhelm M, Gábel R, Straznicky C (1992) Neuron-specific enolase immunoreactivity in the vertebrate retina: selective staining of Müller cells in anurans. 12th Meeting ANS, Adelaide. *Proc Austral Neurosci Soc* 3:174
4. Main C, Wilhelm M (1992) Colocalization of GABA-immunoreactivity in neuropeptide- and monoamine-containing amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. 27th Meeting APPS, Sydney. *Proc Austral Physiol Pharmacol Soc* 23:142
5. Wilhelm M, Straznicky C (1993) Distribution of somatostatin and the 28 kDa calcium-binding protein in the retina of *Bufo marinus*. 16th Meeting ENA, Madrid. *Eur J Neurosci* S6:494
6. Pórszász R, Százados M, Wilhelm M, Szolcsányi J (1995) The role of capsaicin/RTX sensitive neurones in the regulation of microcirculation of skin and striated muscle. Annu. Meeting Austrian Neurosci. Ass., Graz. *Abstracts* P 10.
7. Pórszász R, Százados M, Wilhelm M, Szolcsányi J (1996) The role of capsaicin/RTX sensitive neurones in the regulation of microcirculation of skin and striated muscle. 6th Meeting Eur Neuropeptide Club, Pécs. *Neurobiology* 4:167
8. Gábel R, Pásztor I, Dénes V, Wilhelm M (1997) Neurohistochemistry of rabbit ileal myenteric plexus: unusual neurochemical coding of intrinsic neurons. Göttinger Neurobiologie-tagung, Göttingen. Nyomdában.