



# Neuropeptid-Y immunreaktivitást mutató elemek a barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) retinájában

A Magyar Idegtudományi Társaság  
XI. Kongresszusa  
Pécs, 2005. január 26-29.

Schäffer Dávid<sup>1,3</sup>, Wilhelm Márta<sup>2</sup> és Gábrriel Róbert<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Zootaxonomiai és Szünzoológiai Tanszék

<sup>2</sup>Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Testnevelés- és Sporttudományi Intézet

<sup>3</sup>Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Általános Állattani és Neurobiológiai Tanszék

7624 Pécs, Ifjúság u. 6. e-mail: sefi2@ttk.pte.hu

## Bevezetés

A kétlétű retina kutatások kísérleti állatai elsősorban a *Xenopus*, *Rana* és *Bufo* génuszekből kerülnek ki. Ritkán végeznek ilyen jellegű vizsgálatokat más génuszba tartozó fajokon. A barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) talajlakó életmódot folytató állat, mely elsősorban éjszaka aktív. Feltételezhető, hogy a viselkedésszerű, életmódbeli különbségek a retina eltérő felépítésével párosulnak. Így célunk a retina szerkezetének általános feltérképezése és ezen túl neurokémiai jellemzőinek széleskörű vizsgálata a fenti fajnál. Jelen dolgozatunkban a neuropeptid-Y immunreaktív elemek feltérítését, térbeli eloszlását vizsgáltuk ki célul.

## Anyag és módszer

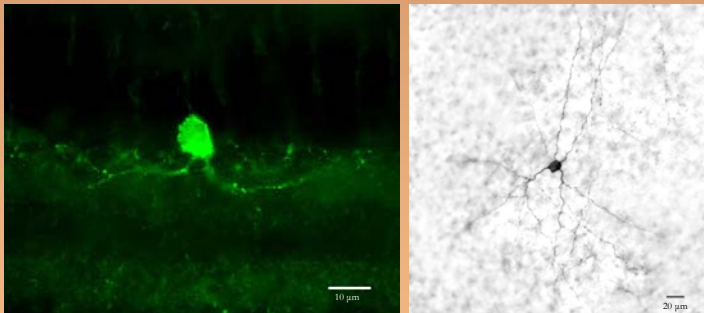
A vizsgálatokhoz 4, kifejlett barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) retináját használtuk fel. A békákat a Duna-Dráva Nemzeti Park engedélyével fogtuk be, és a kísérletekig standard körülmények között tartottuk. A fluoreszcens vizsgálatokhoz az állatokat dekapatáltuk, majd mindkét szemet kioperáltuk. A szemekből, 0,1 M-os nátrium-klorid tartalmú foszfát pufferben (PBS) eltávolítottuk a szemlencsét és eye-cup preparátumokat készítettünk. Ezeket 4 %-os paraformaldehidben 4 órán keresztül fixáltuk 4 °C-on, majd PBS-ben mostuk. A fixált preparátumokat 30 %-os szacharóz oldatban tartottuk, míg le nem sülyedtek (minimum 4 órára), majd cryostatallal 15 µm-es keresztmetszeteket készítettünk -20 °C-on. A metszeteket szelatinos tárgylemezre vittük fel. Ezeket 0,3 %-os tritonos PBS-el kezeltük, majd 30 percig antitesthígítóval (ABS) előinkubáltuk. A primer antitesteket (neuropeptid-Y /nyúl/, tirozin hidroxiláz /egér/) 1:1000 arányban 15-18 óráig hagytuk a metszeteken, majd a fluoreszcens jelöléshez a primer antitestnek megfelelő fluorescein conjugated (FITC vagy TRITC)- globulín-t alkalmaztuk kb. 8 óráig keresztül, melyet 1:200 arányban hígítottunk ABS-ben. Ezután a metszeteket PBS-el mostuk. A preparátumok fedéséhez VectaShield-et használtunk, majd a kész metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A wholemount retina preparátumokat 2 óra fixálás után megfestettük az üvegest maradványaitól, majd újabb 2 órát fixáltuk. Ezután 6x30 percet mostuk 1%-os tritonos PBS-ben. Egy óra előinkubálás után tettük fel a primer NPY antitestet overnight 1:1000 arányban, majd a szekundert és a terciert 1:100 arányban szintén overnight. Fenti lépések között a preparátumokat 6x5 percig 1 %-os tritonos PBS-sel mostuk. Az immunpozitív jelöléseket DAB-al kontrasztosítottuk, a kész preparátumokat glicerinnel fedtük és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. Egy retina preparátumon NeuroLucida 3.23 (MicroBrightField, Inc.) program segítségével rekonstruáltuk az összes NPY pozitív sejt térbeli elhelyezkedését. A sejtek eloszlási mintázatának meghatározásához a Neuroexplorer 3.03a programmal számoltuk ki a sejtek közötti átlagos legközelebbi szomszéd távolságot, míg az analízist az alábbi formula alapján végeztük:

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

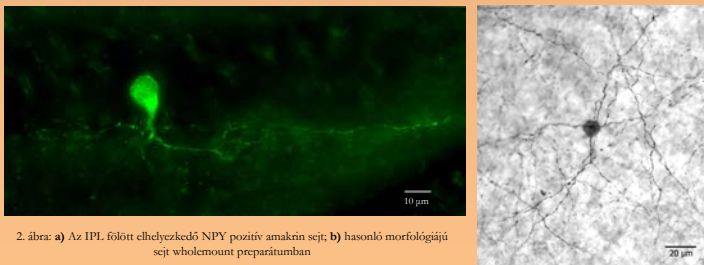
ahol Rn: a nearest neighbour érték, D(Obs): a megfigyelt legközelebbi szomszéd távolságok átlaga, a: a vizsgált terület nagysága, n: az összes mért pont száma.

## Eredmények

Az immunfluoreszcens vizsgálatok alapján a barna ásóbéka retinájában 2 féle amakrin sejt mutatott neuropeptid-Y immunreaktivitást. Az egyik közvetlenül a belső plexiform rétegen (IPL) ül, és annak 1. alrétegébe juttat rostokat (1. ábra), míg a másik kicsivel az IPL fölött található, és a második illetve harmadik szublamina-ba ad rostokat (2. ábra). Mindkét sejt típus kerék sejttesttel és széles dendritmezővel rendelkezik.

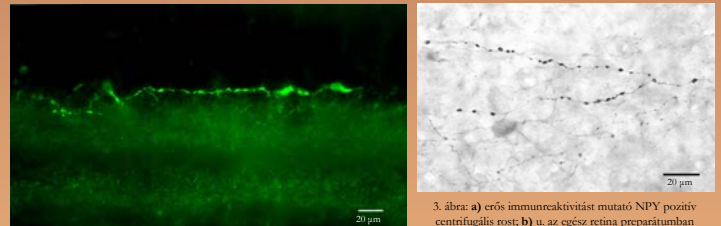


1. ábra: a) Az IPL-en ülő NPY pozitív amakrin sejt (FITC) a barna ásóbéka retinájában; b) a sejt elágazó dendritfája wholemount preparátumban



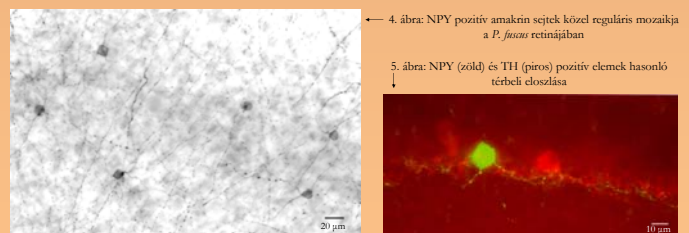
2. ábra: a) Az IPL fölött elhelyezkedő NPY pozitív amakrin sejt; b) hasonló morfológiájú sejt wholemount preparátumban

Fenti sejtfeleségeken túl számos centrifugális rost rajzolódott ki, mutatván a központi területekről a retina felé érkező kémiai marker előfordulási helyét. Ezek az axonok főleg az 1. lamina területén futnak, de rövidebb szakaszaik a 2. és az 5. rétegben is megfigyelhetők. A metszeteken megfigyelhető még a Müller sejtek látszólagos neuropeptid-Y aktivitása is, ez azonban nem tekinthető specifikus jelölésnek. Ezt a feltevésünket preabszorpciós kísérlettel igazoltuk. A wholemount retina preparátumon is megfigyelhetők a varikózus centrifugális rostok, amint igen hosszan húzódnak behálózva a retina egész területét (3. ábra).



3. ábra: a) erős immunreaktivitást mutató NPY pozitív centrifugális rost; b) u. az egész retina preparátumban

A 43,9 mm<sup>2</sup> területű preparátumon 964 db NPY pozitív amakrin sejtet találtunk, így ezen sejtek denzitása a retinán 22/mm<sup>2</sup>. A nearest neighbour analízis azt mutatta, hogy a sejtmozaik reguláris (Rn=1.59), a sejtek egymástól közel azonos távolságra, egyenletesen helyezkednek el az egész retinán (4. ábra). Az összes eddig vizsgált béka fajhoz hasonlóan a barna ásóbékában is megfigyelhető a tirozin hidroxiláz és a neuropeptid-Y immunreaktív elemek hasonló eloszlási mintázata (5. ábra). Kettősen jelölt struktúrát - más laboratóriumok eredményeire hasonlóan - mi sem mutattunk ki vizsgálataink során. A TH és NPY rendszer közötti kapcsolatok feltérítésére jelenleg végzünk elektronmikroszkópos vizsgálatokat.



4. ábra: NPY pozitív amakrin sejtek közel reguláris mozaikja a *P. fuscus* retinájában

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

## Eredmények összefoglalása

- A többi béka fajhoz hasonlóan a barna ásóbékánál is széles dendritmezőjű NPY pozitív amakrin sejtet találtunk.
- Ezen sejtek denzitása a retinában igen alacsony (22/mm<sup>2</sup>) értéket mutat.
- A sejtek egyenletes eloszlása miatt feltételezhető, hogy az általunk vizsgált faj látócsikkal (visual streak) nem rendelkezik.
- A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan mi sem találtunk kísérleti objektumunkban NPY-TH kettősen jelölt struktúrát.