

# Fotoreceptorok eloszlása a barna ásóbéka, *Pelobates fuscus* retinájában

MITT 2005  
A.5.



Babai Norbert, Schäffer Dávid és Gábel Róbert

PTE TTK Biológiai Intézet, Általános Állattani és Neurobiológiai Tanszék  
7624 Pécs, Ifjúság útja 6.  
tankcsap@gamma.ttk.pte.hu



## BEVEZETÉS

A barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) éjszaka aktív állat, amely a nappali órákat föld alatti üregében tölti. Az eddig vizsgált békafajokhoz képest eltérő életmód és aktivitási mintázat miatt retinájának szerkezete lényeges eltérést mutathat. Fenti béka látási mechanizmusát eddig még nem tanulmányozták. Jelen munkánkban a fotoreceptorok típusainak és azok eloszlásának vizsgálatát tűztük ki célul.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatainkhoz 4 kifejlett barna ásóbéka (*Pelobates fuscus*) retináját használtuk fel. Az állatokat a természetből gyűjtöttük be a Duna-Dráva Nemzeti Park engedélyével. A *fénymikroszkópos vizsgálatokhoz* a békát dekaptálás után enukleáltuk, majd a szemekből, 0,1 M-os nátrium-citrát tartalmú foszfát puffer alkalmazása mellett (PBS), eltávolítottuk a szemlencsét és eye-cup preparátumokat készítettünk a retinából. Ezután 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk 4 órán keresztül 4°C-on, majd PBS-ben mostuk. A preparátumot Durcupan gyantába ágyztuk és 1µm-es metszeteket készítettünk, amiket toluidin kézzel festettünk meg. A retina dorzális, nazális, ventrális, temporális és centrális részéből készült metszeteken számoltuk a fotoreceptorokat.

Az *immuncitokémiai vizsgálatokhoz* fixálás után a retinát 30 %-os szacharóz oldatban tartottuk minimum 4 óráig, majd cryostattal 15 µm-es keresztmetszeteket készítettünk -20°C-on. A metszeteket zselatinos tárgylemezre vittük fel, és 0,3 %-os tritonos PBS-el kezeltük, majd 30 percig antitest hígítóval (ABS) előinkubáltuk. Az 1:1000-s hígítású primer antitestet (COS-1) 15-18 óráig hagytuk a metszeteken (az antitest Prof. Szél Ágoston ajándéka), majd a primer antitestnek megfelelő szekunder antitestet, fluorescein conjugátot (FITC) globulint kapcsoltunk hozzá, melyet 1:200 arányban hígítottunk ABS-ben. PBS-el történő mosás után a preparátumok fedéséhez VectaShield-et használtunk, a kész metszeteket *fluoreszcens mikroszkóp* alatt vizsgáltuk.

A wholemount retina preparátumokat 2x2 órás fixálás után 6x30 percet mostuk 1%-os tritonos PBS-ben. 1 órás előinkubálás után tettük fel a primer COS-1 antitestet overnight a fenti arányban, majd a szekunder (FITC) és a terciert (extravidin-peroxidáz) szintén overnight 1:100 arányban. Fenti lépések között a preparátumokat 6x5 percig 1 %-os tritonos PBS-sel mostuk. Az immunpozitív jelöléseket DAB-al kontrasztosítottuk, a kész preparátumokat glicerinrel fedtük és *fénymikroszkóp* alatt vizsgáltuk.

Az *elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz* a standard technikákat alkalmaztuk. A vizsgálandó anyagot ozmifikálás után Durcupan gyantába ágyztuk és ultramikrotómmal metsztettük, majd ólom-citráttal tovább kontrasztosítottuk.

## EREDMÉNYEK

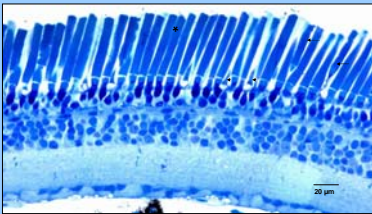
A toluidin-kézzel festett félvékony metszetek alapján kétféle pálcika (minor és major rod) és egyféle csap különíthető el (**1. ábra**). A csapok struktúrája azonban eltér az eddig kétféltűkből ismert csapoktól, mert nem találtunk bennük olajcseppet. A csapok egyértelmű jelenlétét immuncitokémiai vizsgálatokkal, csap opszin ellen termelt antitest alkalmazásával (COS-1) bizonyítottuk (**2. ábra**). Összesen 1975 fotoreceptorot számoltunk meg a retina 5 különböző területéről (dorzális, nazális, ventrális, temporális, centrális) készült félvékony metszeteken. Meghatároztuk a csapok és pálcikák arányát. A csapok az összes fotoreceptorok csak körülbelül 10 %-át teszik ki, ami az eddig vizsgált béka fajokhoz képest nagyon alacsony érték. Eredményeink azt mutatják, hogy a centrális és a nazális oldalon nagyobb, míg a ventrális oldalon kisebb a csapok aránya a pálcikákéhoz képest (**3. ábra**).

Azért, hogy pontos képet kapjunk a csapok retinális eloszlásáról COS-1 antitesttel kezelt egész retina preparátumokat is készítettünk (**4. ábra**). Mind az öt kiütemített retina felszínen elvégeztük a csapok számolását manuálisan és az ImageJ 1.32 program segítségével is. Összesen 11355 csapot számoltunk meg és a területi eloszlásukat vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a csapok denzitása a retina centrális részén a legnagyobb, míg a ventrális részen a legkisebb (**1. táblázat**). Ez alátámasztja a toluidin-kézzel festett metszetek vizsgálatából származó eredményeket.

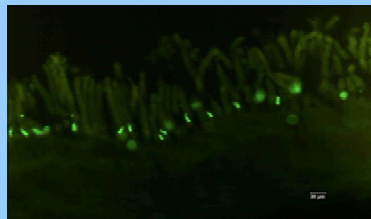
A félvékony metszetek alapján egyféle csapot tudtunk elkülöníteni. Ennek megerősítése érdekében, és a szokatlan csap szerkezet miatt elektronmikroszkópos vizsgálatokat készítettünk. A csapokban nem találtunk olajcseppet, annak féltételezett helyét egy denz struktúra tölti ki a belső szegmensben (**5. ábra**). Megelepetéssel tapasztaltuk, hogy a várt kétféle pálcika helyett három, morfológiailag különböző pálcikát találtunk. Az eddig vizsgált kétféltű fajokban megfigyelt minor és major pálcika mellett egy újabb major pálcikát is találtunk, melynek sejtmag struktúrája jelentősen eltér (**6. ábra**).

## ÖSSZEGEZÉS

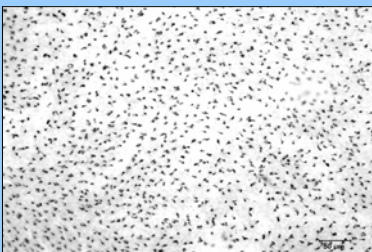
1. A barna ásóbéka retinájában morfológiailag három pálcikát és egy csapot mutattunk ki.
2. Az eddig vizsgált béka fajoktól eltérően a csapok aránya az összes fotoreceptorhoz képest alacsony (10 %).
3. A csapok denzitása a retina egyes területein jóval kisebb a már vizsgált *Bufo marinus*-nál lért értékeknél.
4. A csapokban nem mutattunk ki olajcseppet, azok helyét egy denz struktúra tölti ki.



1. ábra: Toluidin kézzel festett félvékony metszet a barna ásóbéka retinájából. ( Nyíl: minor pálcika, csillag: pálcika)



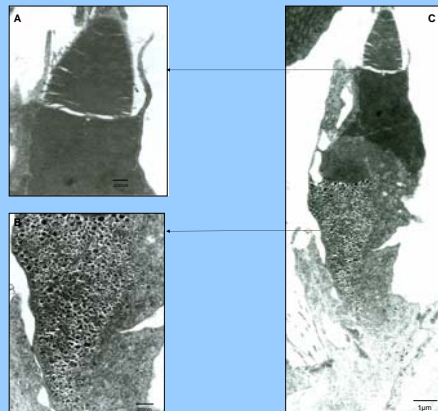
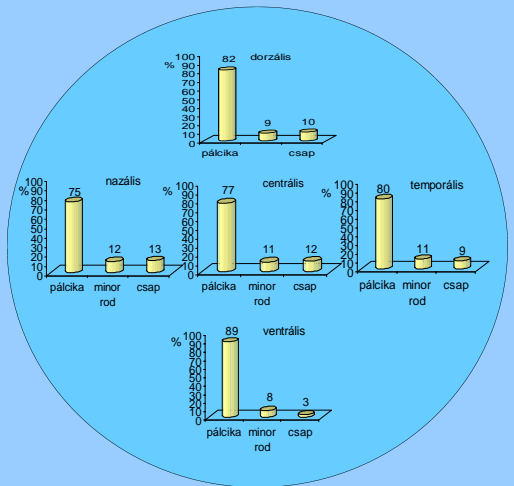
2. ábra: A fluoreszcens mikroszkópos felvételen egyértelműen azonosíthatók a csap opszinhez kötődött antitestek.



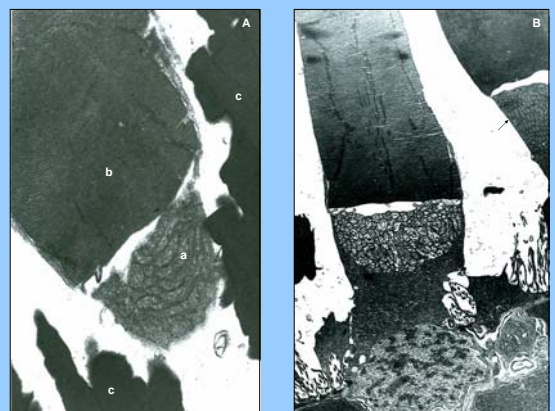
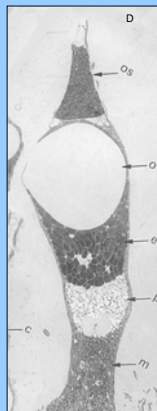
4. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a COS-1 antitesttel jelölt wholemount preparátumból, amelyen a sötét foltok jelölik a csapokat.

	denzitás (db/mm <sup>2</sup> )
dorzális	4860
temporális	4180
nazális	5566
centrális	7612
ventrális	3908

1. táblázat: A csapok denzitása a retina különböző területein.



5. ábra: A *Pelobates fuscus* és *Xenopus laevis* csap szerkezetének összehasonlítása. A: kinaagyított rész a csap külső szegmenséből, B: denz struktúra a belső szegmensben, C: csap a *P. fuscus* retinájából, D: csap a *X.laevis* retinájából (forrás: Röhlisch & Szél (2000): Photoreceptor cells in the Xenopus retina. Microscopy research and technique 50: 327-337)



6. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek a barna ásóbéka retinájában található pálcika típusokról. A: minor pálcika; a: belső szegmens; b: külső szegmens; c: major pálcika külső szegmens B: az általánostól eltérő magszerkezetű major pálcika; nyíl: normál pálcika belső szegmens,