

## Zárójelentés a K79156 sz. OTKA pályázat végrehajtásáról

A pályázat témája a színlátás ősi, főemlős alatti emlősökben meglévő mechanizmusának vizsgálata volt. A pályázat fő hipotézise az volt, hogy ezek az állatok rendelkeznek egy a retinális "kék" (S) csapok aktivitásának feldolgozására specializálódott látórendszeri pályával, amelynek funkciója a színlátás. Fő célkitűzésünk e pálya meglétének igazolása és a résztvevő sejtek funkcionális jellemzése volt altatott házimacskák corpus geniculatum laterale (CGL) magjában. Ehhez a főemlősöknél is alkalmazott csap-specifikus ingerek által kiváltott egysejt-válaszokat mértük, így adataink közvetlenül összehasonlíthatók voltak a majmokból általunk és mások által leírt eredményekkel.

Első feladatunk a vizsgálatokhoz szükséges metodikai háttér kialakítása volt. Laboratóriumunkat felszereltük a macskák inhalációs altatásához és mesterséges lélegeztetéséhez, valamint a fiziológiás paraméterek altatás közbeni monitorozásához szükséges készülékekkel. Elkészítettünk egy a látóteret minimálisan korlátozó sztereotaxikus készüléket. A vizuális ingerek előállítására és az agyi elektromos aktivitás maximum 8 csatornás regisztrációjára kiépítettünk egy számítógép-vezérelt rendszert. Kísérletes munkánkat ugyanakkor nagyban hátráltatta, hogy frissen felépített laboratóriumunkat és teljes állatházunkat a karunkon 2010-ben kezdődött átalakítások miatt új helyre kellett költöztetni és az új helyszíneken az építkezések több hónapot vettek igénybe. A projekt futamidejének meghosszabbítását az OTKA 2013. január 31-ig engedélyezte.

Kísérleteinkben először is mértük a CGL sejtjeinek választ ML- ("zöld") és S-csap izoláló ingerekre. Megállapítottuk, hogy a bemenetet alkotó csaptípus szempontjából két, élesen elkülönülő sejtpopuláció létezik: egy akromatikus és egy kék-ON típus. Előbbi bemenetét túlnyomó részt az ML-csapok adják, ugyanis akromatikus ingerekre kontraszt-függő választ adtak, míg az S-csap izoláló ingerre adott válaszuk nem különbözött szignifikánsan a nulla kontrasztú (szürke) háttérre adott választól. Ezzel bizonyítottuk az elméleti számításokon alapuló S-csap izoláló inger helyességét is, hiszen az az ML-csapokban ún. "néma modulációt" (silent substitution) valósított meg, amely a csap-specifititás fő kritériuma.

A kék-ON típus a vizsgált sejtek mintegy 10%-át tette ki. A pontos arány a CGL összes sejtjéhez képest ennek bizonyára töredéke, hiszen az adatgyűjtés során az S-csap bemenettel rendelkező sejteket mindig igyekeztünk jellemezni, míg az akromatikus sejteket elsősorban összehasonlítás céljából gyűjtöttük. A kék-ON sejtek fő ismérve az volt, hogy a két csaptípusra ellentétes, azaz S-ON és ML-OFF választ adtak. A serkentő (ON) és gátló (OFF) bemenet súlya nagyon hasonló volt, így ezen sejtek válasza fekete-fehér ingerekre nem különbözött a szürke háttérre adott választól. Feltételezhető volt tehát, hogy fő feladatuk az inger rövid és hosszú hullámhosszú komponensének összevetése, azaz a színlátás (Buzás et al., 2010). Olyan sejtet, amely tisztán S-csapoktól kapott volna bemenetet, nem találtunk, ami megerősíti, hogy a két, spektrálisan különböző csaptípus léte macskákban elsősorban a színlátást szolgálja. Kék-OFF sejteket szintén nem találtunk.

Fő feladatunk ezután az volt, hogy a kék-ON sejtek receptív mezőit és anatómiai elhelyezkedését részletesebben jellemezzük. A sejtválaszokat kontraszt és téri frekvencia függvényében vizsgáltuk. Egy-egy sejt jellemzéséhez több mint 60 kontraszt, téri frekvencia és szín kombinációra vettük fel a válaszokat. Az akromatikus és S-csap specifikus ingerekkel felvett kontraszt válaszokból számított kontraszt érzékenység alapján kimutattuk, hogy az akromatikus és kék-ON populáció elválik egymástól.

A téri frekvencia válaszok segítségével vizsgáltuk a receptív mezők központ-környéki szerveződését. Az akromatikus sejtek jellemzően erős környéki gátlást mutattak, míg a kék-ON sejteknél ez szignifikánsan kisebb volt. A csap-izoláló ingerek segítségével külön

vizsgáltuk a receptív mezők ML és S spektrális komponenseit és megállapítottuk, hogy mindkét csaptípus hozzájárulhat a környéki gátláshoz.

A téri frekvencia hangolási görbékből a receptív mezők méretét is kiszámoltuk. Kiderült, hogy a kék-ON sejtek receptív mezői excentricitástól függetlenül kb. 3-szor nagyobbak, mint az akromatikus sejtekéi. Továbbá a kék-ON receptív mezők ML és S spektrális komponensei méretben statisztikailag megegyeznek.

A kék-ON sejtek mindezen funkcionális sajátosságai arra utalnak, hogy azok egységes populációt alkotnak és fő feladatuk a színlátáshoz szükséges kromatikus opponens jel generálása, szemben az akromatikus sejtek téri (központ-környéki) opponenciájával. Mivel kromatikus opponens jelet már sejttypusnál nem találtunk, valószínű, hogy ez a sejtpopuláció alkotja házimacsákban a színlátás funkcionális alapját.

A fenti eredményeket összehasonlítva a korábban majmokban általunk is vizsgált (Szmajda et al., 2006; Tailby et al., 2008a; Tailby et al., 2008b) koniocelluláris rendszer kék-ON sejtjeivel egy sor hasonlóságot találunk, úgy mint (1) a túlnyomóan ON típusú S-csap válasz, (2) hasonló kiterjedésű és súlyú S és ML receptív mező komponens, (3) az akromatikus sejtekénél nagyobb receptív mezők és (4) gyenge környéki gátlás. Ez evolúciós homológiára utal, ami alapján feltehető, hogy főemlősöknél is megtalálható kék-sárga opponens csatorna az általunk jellemzett rendszerhez hasonló, ősi színlátó rendszerből fejlődött ki (Kóbor et al., 2011; Buzás et al., 2013).

A macska kék-ON sejtpopuláció valószínűleg anatómiailag is elkülönült pályát alkot (Buzás et al., 2013). Ezt bizonyítja az az eredményünk, hogy a kék-ON sejtek a CGL-en belül csak az alsó (C, C1, C2) rétegekben fordultak elő. Ez az eloszlás egybeesik az ún. W-sejtekével, amelyeket a főemlős koniocelluláris rendszerével homológiának tartanak. A W-sejtek, csakúgy, mint a főemlős koniocelluláris sejtek, funkcionálisan heterogének, melyek közt a kék-ON sejtek egy homogén populációt alkotnak.

A kromatikus opponens jel nyilvánvalóan a retinában ered, de az S-csapok retinális kapcsolatai macskáknak nem ismertek. Főemlősök színérzékeny sejtjeinél egyaránt ismerünk példákat csap-specifikus összeköttetésekre és a csapok kimenteinak véletlen huzalozáson alapuló keveredésére is. Ha a bipoláris sejtek kellően kicsik, mint pl. a foveában, a véletlen huzalozás vezethet csap-specifikus összeköttetésekhöz is. Eredeti munkatervünk szerint Monte Carlo szimulációs számításokat végeztünk annak becslésére, hogy létrejöhetnek-e macska retinában az S-ON sejtekben fiziológiailag mért S/ML csap arányok a bipoláris vagy horizontális sejtekkel alkotott véletlenszerű összeköttetésekből. Ehhez macska retina darabokon csap-pigment specifikus antitestekkel feltérképeztük az ML- és S-csapok pontos eloszlását, majd az irodalomban ismert bipoláris és horizontális sejtek dendritfáinak megfelelő méretű régiókban meghatároztuk az S-csap arányt  $[S/(S+ML)]$  és ennek a lokális eltérésekből adódó variabilitását. A kromatikus opponencia szempontjából két fontos megállapításra jutottunk. (1) Az S-csapok denzitása az ML-csapokénak mintegy 1/20-a. Annak a valószínűsége, hogy akár a legkisebb dendritfával rendelkező ismert bipoláris sejttypus véletlen huzalozással tisztán S-csapokból kapjon bemenetet gyakorlatilag nulla. A kék-ON receptív mezők létrejöttéhez tehát fel kell tételeznünk egy specifikus kék-ON csap bipoláris sejttypust. (2) Ahogy fent említettük, a CGL-ben mért receptív mezők környéki gátlása spektrálisan kevert eredetű volt (S-csap arány kb. 1/3). Számításaink azt mutatták, hogy a retinában ilyen S-csap arány realiztikus dendritfa méreteknél csak úgy fordulhat elő, ha a bemenetek az S-csapok javára kb. 10-szeres faktorial vannak súlyozva (Kóbor et al., 2012). Ez a retinális hálózatban több helyen is megvalósulhat (csap-bipoláris sejt, csap-horizontális sejt vagy bipoláris-ganglionsejt kapcsolatok). A retinális hálózat felderítéséhez a feltételezhetően érintett sejtpopulációk specifikus, pl. a CGL alsó rétegeibe adott retrográd tracer segítségével történő jelölésével kerülhetnénk közelebb.

Munkatervünkben szerepelt a multi-elektrod technika bevezetése, amelytől az egy elvezetési helyről azonosítható neuronok számának és az azonosítás biztonságának növekedését vártuk. Projektünkben célul tűztük ki egy olyan többcsatornás elektrod kifejlesztését, amely mechanikailag kellően stabil, hogy az agyfelszíntől >12 mm mélységben levő CGL-t megbízhatóan elérje és párhuzamos egysejt-elvezetéseket biztosít. A budapesti Neuronelektrod Kft. kérésünkre egy 7-csatornás tüeelektrodát készített, amelynek prototípusait teszteltük és a gyártóval közösen optimalizáltuk. A jelenlegi változat 185  $\mu\text{m}$  vastag, kihegyezett csúcsán és körülötte szabályos hatszögben, kb. 20  $\mu\text{m}$ -es távolságban helyezkednek el a kontaktusok. Az elektrodához 8-csatornás előerősítőt és analóg szűrőket készítettünk. Az így kialakított rendszert a macska CGL-ben vizuális ingerekre adott válaszokon teszteltük. Szövetani vizsgálataink szerint az elektrodával legalább 20 mm-es mélységig megbízható vertikális penetrációk végezhetők. A párhuzamos csatornákon regisztrált jelekből az akciós potenciál mintázatokat főkomponens analízis és félautomatikus klaszterezés segítségével szeparáltuk. A korábbi, egycsatornás elvezetésekhez képest lényeges javulást értünk el, hiszen nőtt a jel-zaj arány és az egy elvezetési helyről izolált sejtek (single unitok) száma a korábban átlagos 1.3-ról 6.6-ra nőtt (Kóbor et al., 2013).

A heptód elektrodával végzett méréseink célja most a kék-ON sejtek frekvencia hangolásának vizsgálata. Megállapítottuk, hogy az optimális inger frekvencia ezeknél a sejteknél jóval alacsonyabb ( $2.9 \pm 2.2$  Hz, mértani közép $\pm$ SD), mint az akromatikus sejteknél ( $15.2 \pm 2.9$  Hz). Ez további hasonlóságra utal a főemlősökkel, hiszen a luminancia kontraszt érzékeny magnocelluláris rendszerhez képest a kék-csap opponens csatorna közismerten lassú (Irvin et al., 1986; Smithson and Mollon, 2004). Ezekről az eredményekről szóló közleményünk előkészületben van.

## **Idézett irodalom**

- Buzás P, Petykó Z, Kóbor P, Telkes I, Lénárd L (2010) "Blue-yellow" chromatic opponent responses in the lateral geniculate nucleus of the cat. In: 74th Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, pp 430-431. Szeged.
- Buzás P, Kóbor P, Petykó Z, Telkes I, Martin PR, Lénárd L (2013) Receptive field properties of color opponent neurons in the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 33:1451-1461.
- Irvin GE, Norton TT, Sesma MA, Casagrande VA (1986) W-like response properties of interlaminar zone cells in the lateral geniculate nucleus of a primate (*Galago crassicaudatus*). *Brain Res* 362:254-270.
- Kóbor P, Petykó Z, Telkes I, Lénárd L, Buzás P (2011) Receptive field properties of colour cells in the cat lateral geniculate nucleus. In: 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society. Budapest.
- Kóbor P, Petykó Z, Papp L, Allston MA, Buzás P (2013) Testing a novel 7-channel deep brain microelectrode for parallel single unit recording in the cat thalamus. In: 14th Conference of the Hungarian Neuroscience Society, p P3.8. Budapest.
- Kóbor P, Petykó Z, Telkes I, Lénárd LL, Á., Szél Á, Buzás P (2012) Mixed cone inhibition in colour cells of the cat retina. In: IBRO International Workshop 2012, pp 35-36. Szeged.
- Smithson HE, Mollon JD (2004) Is the S-opponent chromatic sub-system sluggish? *Vision Res* 44:2919-2929.
- Szmajda BA, Buzás P, Fitzgibbon T, Martin PR (2006) Geniculocortical relay of blue-off signals in the primate visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19512-19517.
- Tailby C, Solomon SG, Lennie P (2008a) Functional asymmetries in visual pathways carrying S-cone signals in macaque. *J Neurosci* 28:4078-4087.
- Tailby C, Szmajda BA, Buzás P, Lee BB, Martin PR (2008b) Transmission of blue (S) cone signals through the primate lateral geniculate nucleus. *J Physiol* 586:5947-5967.