

A tapintás korai feldolgozásában szerepet játszó
neuronális hálózatok és gátló sejtek a főemlősök
szomatoszenzoros kérgében

Doktori tézisek

Pálfi Emese

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Négyessy László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Kisvárday Zoltán, Ph.D., D.Sc., egyetemi docens

Dr. Kovács Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Vígh Béla, Ph.D., D.Sc., egyetemi professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Herberth-Minkó Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Vidnyánszky Zoltán, Ph.D., D.Sc., egyetemi tanár

Budapest

2018

1. Bevezetés

Emberben illetve főemlősökben leginkább a kezet, azon belül is az ujjbegyeket tekintjük a tapintás szerveinek. A taktilis percepcióval kapcsolatos információ feldolgozás korai lépéseivel foglalkozó agyterület a primer szomatoszenzoros kéreg (SI) a posztcentrális gyruson helyezkedik el és négy citoarchitektúrájában különböző területből áll, melyek a Brodmann área 3a, 3b, 1 és 2 (BA3a, BA3b, BA1, BA2).

Ezek közül a BA3b és BA1 a taktilis percepció feldolgozásában kiemelt fontosságú hierarchikus kapcsolatban álló területek. A területek közötti hierarchikus kapcsolatot bizonyítja az eltérő méretű és BA1-ben komplexebb receptív mezők (RF) megléte. A hierarchikus felépítés fontos szerepet játszik még a receptív mezők térbeli struktúrájának kialakításában a felszálló (feedforward - FF), leszálló (feedback - FB) és áréán belüli horizontális kapcsolatok térbeli szerveződésével. Az agykérgi nagyítási faktorról (CMF) kimutatható, hogy BA1-ben nagyobb területen képeződik le ugyanakkora méretű bőrfelület, mint BA3b-ben.

Korábbi kvalitatív vizsgálataink kimutatták, hogy az SI kolumna méretű területére történő pályajelölő beadása BA3b és BA1 területén erős reciprok kapcsolatot mutat ki nem csak az injektált ujjbegy reprezentációs területén belül, hanem a szomszédos ujjbegy reprezentációs területeivel is. A BA3b és BA1 között erőteljes reciprok kapcsolatot azonosítottunk a homotóp régiók között. Ez két fő információs útvonalat jelent: egy asszociációs (áréák közötti/interaréális), azonos ujjbegyből származó információk

integrálásáért felelős, és egy lokális (áreán belüli/interáreális), szomszédos ujjbegyekből származó információ továbbításáért felelős, pályát. Ez az egyszerű hálózati séma azonban nem ad magyarázatot olyan kérdésekre, mint az extra klasszikus RF tulajdonságok megjelenése, a klasszikus RF-k komplexitása és méretének kialakulása. A kolumna méretű beadásokkal a populációs szintű kapcsolatok vizsgálata vált lehetővé, amelyek az idegsejtek RF tulajdonságait kialakító idegi hálózat alapjait adják.

Az asszociációs és a lokális kapcsolatok információjának neuronális szintű integrálása, ami az agykérgi hálózat működésének alapja, kevésbé ismert. Jelen dolgozatban a tapintásban kiemelt fontosságú BA3b és BA1 populációs összeköttetési mintázatának és ezen területek működésének szabályzásában részt vevő gátló kapcsolatok vizsgálatát tűztük ki célul.

2. Célkitűzés

Mókusmajom (*Saimiri sciureus*) BA3b és BA1 neuronális összeköttetéseinek szerveződését és a taktilis információ integrációjában játszott szerepét vizsgáltuk. A tapintás szempontjából legfontosabb területekre, az ujjbegyek disztális reprezentációira fókuszáltunk. A következő hipotéziseket teszteltük:

- A magasabb rendű BA1-ben található áreán belüli kapcsolatok nagyobb laterális kiterjedéssel rendelkeznek-e és alacsonyabb szomatotopikus specificitást mutatnak-e mint az alacsonyabb hierarchia szintű BA3b azonos típusú kapcsolatai, ezzel járulva hozzá a nagyobb és komplexebb RF tulajdonságok kialakulásához?
- Az agykérgi nagyítási faktor figyelembe vétele változtat-e az előző pontban említett mintázaton?
- Az összeköttetések erőteljesebb klaszterezettséget mutatnak-e BA3b-ben, mint BA1-ben?
- Hogy viszonyul az interáreális FF és FB kapcsolatok horizontális eloszlása a) az áreán belüli kapcsolatokhoz, b) egymáshoz, c) a populációs aktivitáshoz, d) a lokális kapcsolatokhoz hasonlóan anizotróp-e?
- Az összeköttetési mintázat alapján a vizuális kéreghez hasonlóan elmondható-e, hogy a szenzoros kérgi interakciók azonos méretű területek kommunikációján alapulnak-e, valamint hogy a szenzoros kérgi feldolgozás hasonló kérgi mintázaton alapul-e?

- A szomatoszenzoros információ feldolgozásában milyen szerepet játszanak a szomatoszenzoros axonok célsejtjeit képező egyes GABAerg gátló interneuron típusok?

3. Módszerek

3.1 Kísérleti helyszín

A fiziológiai és neuronális nyomkövető beadási kísérletek a Vanderbilt Egyetem Pszichológia Tanszékével (Nashville, TN, USA) együttműködve a partner laboratóriumában történtek részvételünkkel. A leírt hisztológiai kísérletek a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstan Intézetében laboratóriumunkban történtek.

3.2 Kísérleti állatok

A kísérletben nyolc felnőtt mókusmajom, 4 nőstény (J, V, M, R) és 4 hím (M, Mo, P, T) vett részt. Az állatok életkora 2-9 év között volt, súlyuk pedig 0,6-1,1 kg között. A tartási és műtéti eljárások megfeleltek az IACUC-nak (Institutional Animal Care and Use Committee) valamint a NIH (National Institutes of Health) előírásainak.

3.3 Funkcionális térképezés

A kezdeti altatás ketamin-hidrokloriddal (10 mg/kg) történt majd izoflurán (0,9-1,3%) inhalációval tartottuk fent. A kranio- és durotómia után a pre- és posztcentrális gyrusnak megfelelő terület (BA1, BA3b, BA3a, M1) került feltárássra. Az ujj-specifikus kérgi területek aktivációjának topografikus felépítése az ujj disztális, középső és proximális részén található szőrtelen bőr vibrotaktilis ingerlésével került feltérképezésre. Így a centrális sulcus laterális végét használva viszonyítási pontként az elektrofiziológiai térképezés wolfram microelektródokkal történt a felső-középső kérgi

rétegekben. Az adott területet intrinzik jel optikai képalkotó technikával (IOS) is feltérképeztük.

3.4 Pályajelölés

A kézreprezentáció fiziológiai módszerekkel történő feltérképezését követően biotinilált-dextrán-amint (BDA) (10K - anterorográdf jelölési preferencia és 3K - retrográdf jelölési preferencia) iontoforetikus úton 1:1 arányban injektáltunk a BA3b, BA3a és BA1 disztális ujjbegy reprezentációs területére.

3.5 Hisztológia

3.5.1. Fénymikroszkópia

50 µm vastag metszetek agyfelszínnel párhuzamosan, tangenciálisan metszett, 110 µm kihagyással gyűjtött sorozatát vizsgáltuk. A BDA jelölés láthatóvá tételére standard ABC protokollt használtunk nikkel-intenzifikált diaminobenzidin kromogén segítségével.

3.5.2. Fluoreszcens immunhisztokémia

20 µm vastag metszetek agyfelszínnel párhuzamosan, tangenciálisan metszett, az 50 µm vastag fénymikroszkópra szánt metszetekkel alternálva gyűjtött sorozatát vizsgáltuk. A többszörös fluoreszcens immunhisztokémiai jelölést szabadon úszó metszeteken végeztük laborunk standard protokollja szerint.

3.6 BDA jelölés térképezése

Retrográdf jelölés esetén a perikarion az axonok által felvett jelölőanyag a sejtestbe történő transzportja révén jelölődik, tehát az injektált régió bemeneti területeit segít azonosítani.

Az anterográdf jelölődés esetén háromféle jelet különböztettünk meg. Az egyik esetben a hosszan követhető rostok, a másikban a

foltoakat alkotó terminális axon arborizációk által jelzett célterületek, a harmadik esetben a jelet a bouton-szerű struktúrák adták, melyeket mintavételezéssel vizsgáltunk.

3.7 Adatelemzés

Az adatelemzéshez a retrográd és anterográd jelölődés elemzésén túl a retrográd jel kernel sűrűségterképeit, DBSCAN klaszterelemzést és anizotrópia elemzést használtuk fel. Az adatok könnyebb értelmezése miatt bizonyos adatokból arányokat képeztünk.

4. Eredmények

4.1 Retrográd jelölődés

Az eredmények BA1 (három állat) és BA3b (három állat) beadásokból származnak. A retrográd jelölődött neuronok többsége piramissejt, néhány „sima”, tüske nélküli dendrittel rendelkező, feltehetőleg gátló interneuron is látható a beadási hely körül. A neuronok mindkét beadás esetén az injektált áréában jelölődtek magasabb számban. A rétegi eloszlás elemzésénél BA3b beadás után találtunk nagyobb szupragranuláris értékeket interaréálishan, tehát BA1-ben. BA1 injektálás után nincs különbség a két área között a rétegi eloszlásban.

Az IOS mérés során aktivált területen belül jelölt neuronok aránya mindkét beadás esetében BA3b-ben mutatott nagyobb retrográd jelölődést.

A retrográdan legsűrűbben jelölődött ekvivalens területek esetében az intraaréális értékek nagyobbak voltak.

A legsűrűbben jelölt területek és az IOS mérés során aktiválódott területek aránya BA1-ben magasabb.

A térbeli csoportosulást sűrűség alapú DBSCAN klaszter algoritmussal vizsgáltuk. A hosszparaméter növekedésével a klaszterek száma hamar eléri a csúcspontot, aztán exponenciálisan csökken pár darabra és jóval kisebb maximális értéket ér el lassabb klaszterszám csökkenéssel interaréális jelölődés esetén. Ezzel szemben a klaszterek méretének diverzitása sokkal fokozatosabb csökkenést mutat az intra- és interaréális jelölődés esetében is.

4.2 Anterográd jelölődés

Az eredmények BA1 (három állat) és BA3b (három állat) beadásokból származnak. A túlélési idő megfigyeléseink szerint jobban hat az anterográd jelölésre, mint a retrográdra. Az anterográdan jelölt struktúrák jelölődésében nagyobb egyedi variációt figyelhetünk meg. BDA jelölődött terminális arborizációk a retrográd jelhez képest egyenletesebben oszlottak el a két áréában. BA3b beadás esetén az intraaréáisan jelölődött terminális arborizációk aránya magasabb volt, mint a szomszédos áréában jelölődöttek. A rétegi eloszlásban sehol nem figyelhető meg különbség az injektált és szomszédos áréa között a két beadás esetén.

Az összeillesztett metszetsorozatokon mindegyik esetben megfigyelhető, hogy a terminális arborizációk csoportokat formálnak a szomszédos sorozatmetszeten található terminális arborizációkkal oszlop szerű előfordulást sugallva. Átlagosan csak a terminális arborizációk 15-17%-a nincs átfedésben egyetlen másikkal sem. A beadási áréában átlagosan 3-4 terminális arborizáció alkot egy csoportot, ehhez képest a szomszédos áréában már 5 vagy annál több terminális arborizációból álló csoportok fordulnak elő gyakrabban.

BA3b és BA1-ben a terminális arborizáció csoportok mérete különbözik ha a két beadást együtt vizsgáljuk, interaréáisan nagyobb méretű csoportokat találunk.

A terminális arborizáció csoportok horizontális eloszlása mindkét beadás esetén az injektált áréán belül volt nagyobb.

A terminális arborizáció csoportok legközelebbi szomszédjainak vizsgálata azt mutatja, hogy BA1 beadás után a csoportok nagyobb távolságra helyezkednek el egymástól.

A terminális arborizáció csoportok és az IOS-területek méretének aránya BA1 beadás esetében 1 körül mozog, azt mutatva, hogy a két terület körülbelül egyforma méretű, és BA3b beadás értékeinél tízszer nagyobbak az injektált áréákat összehasonlítva.

A retrográd és anterográd jelölődés összehasonlítása megmutatta, hogy az injektált áréában a terminális arborizáció csoportok több csökkenő sűrűségű területen oszlottak el, mint a szomszédos áréában. BA3b beadás után jelölődött terminális arborizáció csoportok jóval koncentráltabban helyezkedtek el a retrográdan sűrűbben jelölt áréákban, mint a BA1 beadás után jelölődöttek.

4.3 A retrográd és anterográd jelölődött kérgi terület és az általa reprezentált bőrfelületek méretének összehasonlítása

A retrográd jelölődés esetében az áréakra függetlenül kiszámolt legsűrűbb területek BA3b beadás után BA1-ben nagyobb bőrfelületet reprezentáltak. Az ekvivalens sűrűségű területek esetében számolt területek esetében az injektált áréák azonos méretű bőrfelületet reprezentálnak BA3b-ben és BA1-ben.

Az anterográd jelölődés esetében BA3b-ben kisebb értékeket kapunk mindkét beadás esetén ha a terminális arborizáció csoportok méretéből számoljuk ki a reprezentált bőrfelület nagyságát. Ha a terminális arborizáció csoportok laterális kiterjedéséből számoljuk ki a bőrfelületen található távolságot, akkor BA3b beadás esetén nem

találunk különbséget az injektált és a szomszédos terület között, míg BA1 beadás esetében az injektált área nagyobb bőrterületet reprezentál. Az injektált áréak által lefedett bőrterületek közül BA1 háromszorosan nagyobb területet reprezentál, mint BA3b.

4.4 A retrográd és anterográd jeleloszlás anizotrópiája

A kapcsolatok anizotrópiájának kiterjedése és irányultsága megmutatja, esetünkben a szomatotópiás térképen, hogy a retrográd és anterográd jelölődés mutat-e valamilyen irányultságot. Az anterográd és retrográd jel eloszlása is anizotrópnak mutatkozott.

4.5 Vastag, egyenes lefutású rostok eloszlása

Mind BA3b-ben, mind BA1-ben találtunk BDA jelölt mielinizált axonokat elektronmikroszkóppal a beadási helytől függetlenül, amelyek a gyors információ szállításért lehetnek felelősek.

4.6 BDA-jelölt afferensek szelektív végződése különböző GABAerg interneuronokon a szomatoszenzoros kéregben

Az eredmények BA1 (három állat) és BA3a (két állat) beadásokból származnak, az áréak közötti (BA1-BA3b és BA3a-M1) és lokális kapcsolatokat vizsgáltuk parvalbumin (PV) és szomatosztatin (SOM) pozitívan jelölődött interneuronok esetében.

Az autofluoreszcencia mértéke csökkenthető volt réz-szulfát kezeléssel és a primer ellenanyaggal történő inkubáció során történt megvilágítással, de teljesen nem volt kiküszöbölhető.

A feltérképezett boutonok 5,6%-a képzett közeli kapcsolatot valamilyen immunpozitívan jelölődött GABAerg interneuronnal. A közeli kapcsolatok 53%-a a szupragranuláris rétegekben volt megtalálható. BA1 beadás után átlagosan a boutonok 5,6%-a, BA3a

beadás után 5,8%-a képez közeli kapcsolatot valamelyik immunjelölt interneuronnal.

Általában elmondható, hogy a SOM festés kevesebb struktúrát jelölt, mint a PV.

A PV pozitív sejtek esetén nincs különbség az injektált és a szomszédos áréában képzett közeli kapcsolatok megoszlása között egyik beadás esetében sem. Ehhez hasonlóan a PV interneuronokat célzó BA1 beadás után jelölődött axonok sem mutattak área preferenciát, míg BA3a beadás után csak M1-ben találtunk PV interneuronnal létesített kapcsolatot. A supra- és infragranuláris rétegek közötti eloszlásban sincs különbség.

A SOM interneuronokkal létesített kapcsolatokat mindkét beadás után áréán belüli jelölt afferensek alkották magasabb arányban. BA1 beadás után csak a dendriten figyeltünk meg közeli kontaktusokat, BA3a beadás után az arány a sejtestek felé tolódik el.

5. Következtetések

5.1 BA3b és BA1 kolumna méretű területeinek áréán belüli és áréák közötti kapcsolatai

Kolumna méretű agykérgi területek bemeneteinek (neuronok) és célterületeinek (efferens terminális arborizációk) horizontális kiterjedését az ujjbegy reprezentációs területén reciprok összeköttetésben és hierarchikus funkcionális kapcsolatban álló BA3b és BA1 területén kombinált anatómiai, elektrofiziológiai és IOS mérések segítségével vizsgáltuk. A tanulmány a magas jeldenzitású területekre fókuszált.

5.1.1 A kapcsolatok laterális kiterjedése

A felszálló kapcsolatok erősen konvergálnak így alakítva ki az RF központi részének bemeneti kapcsolatait az SI-ben. Ezzel ellentétben a leszálló és áréán belüli kapcsolatok nagyobb laterális kiterjedése az extra klasszikus RF tulajdonságok kialakításában, általánosabban a szomatotópia és almodalitás információk integrálásában, van szerepe az SI-ben.

Megmutattuk, hogy BA3b és BA1 áréán belüli kapcsolatai nem különböznek egymástól nagy mértékben, viszont a kisebb CMF BA1-ben nagyobb bőrfelületről érkező információ integrációját teszi lehetővé.

5.1.2 A vetítő neuronok klaszterezettsége

A BA3b és BA1-ben található vetítő neuronok klaszterezettsége eltérő volt, ami a BA3b és BA1-ben található RF-k eltérő méretéből adódhat.

5.1.3 A kérgi populációs válasz anatómiai alapjai

Az áréák közötti le- és felszálló kapcsolatok eloszlása és az IOS mérés során aktiválódott területek viszonya alátámasztja, hogy ezek a kapcsolatok a kérgi populációs válaszhoz eltérő mértékben járulnak hozzá. Az IOS-terület nagysága változott a CMF-hez képest, és nagyobb volt BA3b-ben, mint BA1-ben. A le- és felszálló kapcsolatok esetében is megfigyelhető volt az a tendencia, hogy BA1-ben nagyobb bőrfelület reprezentálódik, mint BA3b-ben.

Megmutattuk, hogy hasonlóan az áréán belüli kapcsolatokhoz az áréák közötti fel- és leszálló kapcsolatok is anizotropikus felépítést mutatnak. és ez az ujjbegy reprezentációra merőleges.

Az interakciók dinamikáját illetően az eredmények azt mutatják, hogy a vizuális kéregben leírtakhoz hasonlóan van egy gyorsan vezető vastag, részben mielinizált rostokból álló pálya BA1 és BA3b között.

5.2 Kérgi gátlás

Az SI-ben az axonok célsejt szelektivitása a gátló internuronokon hasonló eloszlást mutat főemlősben mint rágcsálóknál. A gátló interneuronok és az ezeknek a sejteknek bemenetet adó anterográdfelölődés kapcsolatának vizsgálata megmutatta, hogy a főemlősökben és rágcsálókban található sejteloszlás és bemeneti kapcsolatok mintázata hasonló.

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Pálfi E., Zalányi L , Ashaber M , Palmer C , Kántor O , Roe AW , Friedman RM , Négyessy L. Connectivity of neuronal populations within and between areas of primate somatosensory cortex. *Brain Struct Funct.* 223: (6) 2949-2971. (2018) **IF: 4.698 (2016)**

Pálfi E., Ashaber M , Palmer C , Friedman RM , Roe AW , Négyessy L. Neuronal connections within the hand representation in areas 3b and 1 of the somatosensory cortex in primates ~"Neuronális összeköttetések a szomatoszenzoros kérgi área 3b és área 1 kézreprezentációs területén foemlosökben". *Orvosi hetilap.* 157:(33) pp. 1320-1325. (2016) **IF: 0.349 (2016)**

Ashaber M , Pálfi E., Friedman RM , Palmer C , Jakli B , Chen LM , Kántor O , Roe AW , Négyessy L. Connectivity of somatosensory cortical area 1 form an anatomical substrate for the emergence of multifinger receptive fields and complex feature selectivity in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol.* 522:(8) pp. 1769-1785. (2014) **IF: 3.225 (2014)**

Négyessy L , Pálfi E., Ashaber M , Palmer C , Jakli B , Friedman RM , Chen LM , Roe AW. Intrinsic horizontal connections process global tactile features in the primary somatosensory

cortex: Neuroanatomical evidence. *J Comp Neurol.* 521:(12) pp. 2798-2817. (2013) **IF: 3.508 (2013)**

6.2 A disszertációhoz kapcsolódó konferencia kiadványokban közölt eredmények

Pálfi E, Kántor O, Ashaber M, Roe AW, Friedman RM, Dávid Cs, Nitschke R, Négyessy L. Areal and laminar distribution of Interneurons targeted by somatosensory cortical afferents in the non-human Primate *Samiri sciureus*. IBRO Workshop 2014, Debrecen, Magyarország.

Pálfi E, Kántor O, Ashaber M, Roe AW, Friedman RM, Dávid Cs, Nitschke R, Négyessy L. Selective targeting of inhibitory interneurons by sensorimotor cortical afferents in the non-human primate *Saimiri sciureus*. IBRO Workshop 2016, Budapest, Magyarország.

6.3 Egyéb közlemények

Fekete Z , Pálfi E, Márton G , Handbauer M , Bérces Zs , Ulbert I , Pongrácz A , Négyessy L. Combined in vivo recording of neural signals and iontophoretic injection of pathway tracers using a hollow silicon microelectrode. *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL* 236: pp. 815-824. (2016) **IF: 5.401 (2016)**

Kantor O , Benko Z , Enzsoly A , David C , Naumann A , Nitschke R , Szabo A , Palfi E, Orban J , Nyitrai M , Nemeth J , Szel A ,

Lukats A , Volgyi B. Characterization of connexin36 gap junctions in the human outer retina. *Brain Struct Funct.* 221: pp. 2963-2984. (2016) **IF: 4.698 (2016)**

Kantor O , Varga A , Toth R , Enzsoly A , Palfi E , Kovacs-Oller T , Nitschke R , Szel A , Szekely A , Volgyi B , Negyessy L , Somogyvari Z , Lukats A. Stratified organization and disorganization of inner plexiform layer revealed by TNAP activity in healthy and diabetic rat retina. *Cell Tissue Res.* 359:(2) pp. 409-421. (2015) **IF: 2.948 (2015)**