

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

Doktori értekezés

Pálfi Emese

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Kisvárday Zoltán, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kovács Tibor, M.D., Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Víggh Béla, M.D., Ph.D., D.Sc., egyetemi professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

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

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

Budapest

2018

Tartalom

1	Rövidítések jegyzéke	8
2	Bevezetés	11
2.1	Áttekintés	11
2.2	A tapintás anatómiai alapjai: receptorok, taktilis modalitások	14
2.3	A primer szomatoszenzoros kéreg felépítése: struktúra és funkció	16
2.3.1	Az área 3b és área 1 kolumnáris szerkezete	17
2.3.2	Receptív mező tulajdonságok área 3b és área 1-ben	18
2.3.3	Az agykérgi nagyítási faktor	19
2.4	Az agykéreg kapcsolatainak eloszlása	20
2.4.1	Rétegeloszlás	20
2.4.2	Horizontális eloszlás	21
2.5	A gátlás szerepe a kérgi interakciók szabályzásában	22
3	Célkitűzések	25
4	Módszerek	26
4.1	Munkamegosztás	26
4.2	Állatok és tartási körülményeik	26
4.3	Műtét	27
4.4	Funkcionális térképezés	28
4.4.1	Ujjbegy ingerlés	28
4.4.2	Mikroelektrodás elektrofiziológiai térképezés	28
4.4.3	Intrinzik jel optikai képalkotás	28
4.4.3.1	Képfelvétel	29
4.4.3.2	Képelemzés	30
4.4.4	A kézrepresentáció feltérképezése a két áréában	31
4.5	Pályajelölés	31

4.5.1	Pályajelölő anyagok és beadásuk	31
4.5.2	Perfúzió	32
4.6	Hisztológia.....	33
4.6.1	Fénymikroszkópia	33
4.6.2	Fluoreszcens immunhisztokémia	33
4.6.2.1	A primer ellenanyagok kiválasztása és tesztelése	33
4.6.2.2	Autofluoreszcencia csökkentésére alkalmazott módszerek	35
4.6.2.3	Alkalmazott fluoreszcens immunhisztokémiai protokoll.....	36
4.7	Sorozatmetszetek térképezése és illesztése	36
4.7.1	BDA jelölés térképezése	36
4.7.1.1	Retrográd jelölődés.....	37
4.7.1.2	Anterográd jelölődés.....	37
4.7.2	A sorozatmetszetek illesztése	37
4.8	Adatelemzés	39
4.8.1	A BDA jelölés területi eloszlásának vizsgálata.....	39
4.8.2	A szupra- és infragranuláris rétegek meghatározása.....	39
4.8.2.1	A szupragranuláris rétegekben jelölődött struktúrák aránya.....	39
4.8.3	A retrográd jel eloszlásának elemzése	40
4.8.3.1	Kernel sűrűség elemzés	40
4.8.3.2	A legsűrűbben jelölődött területeinek méretének és az IOS mérés során aktiválódott területek méretének viszonya.....	41
4.8.3.3	Sűrűség alapú térbeli klaszterelemzés	41
4.8.3.4	A retrográd jelölődés és az IOS mérés során aktiválódott területek kapcsolata.....	42
4.8.4	Az anterográd jel eloszlásának elemzése.....	43
4.8.4.1	A terminális arborizációk tömegközéppontja	44

4.8.4.2	A terminális arborizáció csoportok mérete	44
4.8.4.3	A terminális arborizáció csoportok laterális eloszlása	44
4.8.4.4	A terminális arborizáció csoportok szórtsága	44
4.8.4.5	A terminális arborizáció csoportok mérete és az IOS mérés során aktiválódott területek méretének viszonya.....	44
4.8.4.6	A retrográd jelölődés és a terminális arborizáció csoportok térbeli eloszlása közötti kapcsolat	44
4.8.5	Az összeköttetések által reprezentált bőrfelület mérete	45
4.8.6	Az összeköttetések anizotrópiájának mérése.....	46
4.8.7	A vastag axonok térképezése.....	47
4.8.8	Gátló interneuronok bemeneteinek elemzése	47
4.8.9	Statisztikai elemzés	49
5	Eredmények.....	50
5.1	Beadási hely	50
5.2	A retrográd jelölődés	51
5.2.1	A retrográd jelölődés általános leírása	51
5.2.2	A retrográd jelölődés réteg- és laterális irányú eloszlása	54
5.2.3	A retrográd jelölődés és az IOS mérés során aktiválódott területek aránya	55
5.2.4	A retrográd jelölődés sűrűség eloszlása.....	56
5.2.4.1	A retrográdan legsűrűbben jelölődött területek mérete	58
5.2.4.2	A legsűrűbben jelölt területek és az IOS mérés során aktiválódott területek aránya.....	59
5.2.5	A retrográd jelölődés klaszteres szerkezete.....	60
5.3	Az anterográd jelölődés.....	61
5.3.1	Az anterográd jelölődés általános leírása	61
5.3.2	Az anterográd jelölődés réteg- és laterális irányú eloszlása	65

5.3.3	A terminális arborizációk eloszlása	66
5.3.3.1	A terminális arborizációk csoportosulása	67
5.3.3.2	A terminális arborizáció csoportok horizontális eloszlása	67
5.3.3.3	A terminális arborizáció csoportok szóródása	68
5.3.4	A terminális arborizáció csoportok és a funkcionális térképek kapcsolata	69
5.3.4.1	Terminális axon arborizáció csoportok méretének összehasonlítása az IOS mérés során aktiválódott terület méretével.....	69
5.3.4.2	Az anterográd és retrográd jeleloszlás összehasonlítása	70
5.4	A retrográd és anterográd jelölődött kérgi terület és az általa reprezentált bőrfelületek méretének összehasonlítása.....	71
5.4.1	A retrográd jelölődés által reprezentált bőrfelület nagysága	72
5.4.2	Az anterográd jelölődés által reprezentált bőrfelület nagysága	73
5.4.2.1	A terminális arborizáció csoportok méretéből számított bőrfelület nagysága.....	73
5.4.2.2	A terminális arborizáció csoportok laterális kiterjedéséből számított bőrfelület nagysága.....	74
5.5	A retrográd és anterográd jeleloszlás anizotrópiája	74
5.6	Vastag, egyenes lefutású rostok eloszlása	76
5.7	BDA-jelölt afferensek szelektív végződése különböző GABAerg interneuronokon a szomatoszenzoros kéregben.....	78
5.7.1	A fluoreszcens jelölés jellemzése.....	78
5.7.2	Az autofluoreszcencia csökkentésére tett kísérletek eredménye.....	78
5.7.3	A különböző típusú GABAerg interneuronok specifikus jelölése	78
5.7.4	A feltérképezett bouton szerű struktúrák jellemzői	80
5.7.4.1	Közeli kapcsolatot képző boutonok jellemzése	80

5.7.4.2	A parvalbumin pozitív sejtek és dendritek és a BDA-jelölt axonok közötti közeli kontaktusok szelektivitása	81
5.7.4.3	A szomatosztatin pozitív sejtek és dendritek és a BDA-jelölt axonok közötti közeli kontaktusok szelektivitása	82
6	Megbeszélés és következtetések	84
6.1	Áttekintés.....	84
6.2	Módszeri megfontolások	87
6.2.1	Esetszám	87
6.2.2	Kétirányú nyomkövetés	88
6.2.3	Rétegeloszlás	89
6.2.4	Az anatómiai és funkcionális térképek illesztésének pontossága	89
6.2.5	A terminális arborizációk azonosítása	90
6.2.6	A különböző típusú GABAerg interneuronok fluoreszcens jelölése	90
6.3	A populációs kapcsolatok anatómiai alapjai a kéregben	91
6.3.1	Kapcsolatok oldalirányú kiterjedése és a hierarchikus szerveződése	91
6.3.2	A kérgi populációs válasz anatómiai alapjai	92
6.3.3	A bemenet klaszteres szerveződése	93
6.3.4	A szomatoszenzoros kérgi kapcsolatok anizotróp eloszlása	93
6.3.5	Funkcionális megfontolások.....	93
6.4	Kérgi gátlás	94
6.4.1	Funkcionális következtetések	95
7	Összefoglalás.....	96
8	Summary.....	98
9	Irodalomjegyzék.....	99
10	Saját publikációk jegyzéke	112
10.1	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	112

10.2	A disszertációhoz kapcsolódó konferencia kiadványokban közölt eredmények.....	113
10.3	Egyéb közlemények.....	113
11	Köszönetnyilvánítás.....	115

1 Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
5HT3a	5-hydroxytryptamine/serotonin	szerootonin
BA1	Brodmann area 1	Brodmann área 1
BA3a	Brodmann area 3a	Brodmann área 3a
BA3b	Brodmann area 3b	Brodmann área 3b
BDA	biotinilated dextran amin	biotinilált dextransz amin
CCD	charge-coupled device	töltés-csatolt eszköz
CMF	cortical magnification factor	agykérgi nagyítási faktort
CR	calretinin	calretinin
cRF	classical receptive field	klasszikus receptív mező
ecRF	extra classical receptive field	extra-klasszikus receptív mező
CS	cross section	keresztmetszet
D	dendrite	dendrit
d2/4t	digit 2/4 tip	2/4 ujj ujjbegy
FA	fast adaptating	gyorsan adaptálódó
FB	feedback	visszacsatoló kapcsolat
FF	feedforward	előrecsatoló kapcsolat
fMRI	functional magnetic resonance imaging	funkcionális mágneses rezonanciavizsgálat
ecRF	extra-classical receptive field	extra-klasszikus receptív mező
EEG	electroencephalogram	elektroencefalográfia
EKG	electrocardiogram	elektrokardiográfia
ET-CO ₂	end-tidal CO ₂	kilégzés-végi CO ₂
GABA	gamma amino butyric acid	gamma amino vajsav
GFAP	glial fibrillary acidic protein	gliális fibrilláris savas fehérje
Hbr	oxyhemoglobin	oxihemoglobin
HbO ₂	deoxyhemoglobin	dezoxihemoglobin
IOS	intrinsic optical imaging signals	intrinzik optikai jel

log	logarithm	logaritmus, logaritmált érték
M1	primary motor cortex	elsődleges mozgató kéreg
MUA	multi unit activity	többsejt aktivitás
NA	not applicable	nincs adat
NiDAB	nickel intensified di amino benzidine	nikkel intenzifikált diaminobenzidin
PB	phosphate buffer	foszfát puffer
PBS	phosphate buffered saline	sós foszfát puffer
PB	portion of boutons	boutonok aránya
PC	Pacianian receptor	Pacini-féle receptor
PN	portion of neurons	neuronok aránya
PDS-95	postsynaptic density protein 95	posztzinaptikus denzitás 95 fehérje
PTA	portion of terminal arborizations	terminális arborizációk aránya
PV	parvalbumin	parvalbumin
RF	receptive field	receptív mező
RA	rapidly adaptating	gyorsan adaptálódó
SA	slowly adaptating	lassan adaptálódó
SEM	standard error of the mean	átlag szórása
SD	standard deviation	szórás
SI	primer somatosensory cortex	elsődleges szomatoszenzoros kéreg
SII	secunder somatosensory cortex	másodlagos szomatoszenzoros kéreg
SB	supraganular layer boutons	szupragranuláris réteg bouton arány
SN	supragranular layer neuron	szupragranuláris rétegekben jelölődött neuronok
SOM	somatostatin	szomatosztatin

STA	supragranular layer terminal arborizations	szupragranuláris rétegekben jelölődött terminális arborizációk
SpO ₂	oxygen saturation	perifériás kapilláris oxigén telítettség
TA	terminal axon arborization	terminális arborizáció
TS	tangential section	hosszmetszet
TX	TritonX-100	TritonX-100 detergens
V1	primary visual cortex	elsődleges vizuális kéreg
V2	secondary visual cortex	másodlagos vizuális kéreg
VIP	vasoactive intestinal peptide	vazoaktív intestinalis peptid
VP	ventral posterior nucleus of the thalamus	nucleus ventralis posterior thalami
VPL	ventral posterolateral nucleus of the thalamus	nucleus ventralis posteriolateralis thalami

2 Bevezetés

2.1 Áttekintés

„A tapintási érzékelés a testfelszín bármelyik részének ingerléséből fakadhat. Valóban a bőrt úgy is lehetne jellemezni, mint a tapintás érzékének egyetlen nagy receptorát. De ha megtapintunk egy tárgyat, leggyakrabban a kezünk az ingerlés szerve.” (Sekuler és Blake 2004) Emberben illetve főemlősökben leginkább a kezet, azon belül is az ujjbegyeket tekintjük a tapintás szerveinek. A tapintás fontos érzékszervi modalitás és esetleges hiányával nem nagyon foglalkozunk, valamint neurobiológiai alapjai sem annyira ismertek, mint a látás vagy hallás esetében, így nagyon fontos megismernünk a tapintás alapvető mechanizmusait, ezen belül is a különböző agykérgi területek közötti összeköttetések felépítését.

Az agykéreg különböző területei komplex hálózatokon keresztül kommunikálnak egymással (Sporns 2015). Az áréakon belüli információ feldolgozás ebbe a nagy az áréák között létrejövő hálózatba van beágyazva. Az asszociációs (áréák közötti) és az intrinzik (áréán belüli) információ neuronális szintű integrálása, ami az agykérgi hálózat működésének alapja, kevésbé ismert. Az elsődleges szomatoszenzoros kérgi (SI) reprezentáció alapvető szerepet játszik a tapintás percepció folyamatában (Sathian és mtsai. 2016; Yau és mtsai., 2016), ám az áréakon belüli és áréák közötti kapcsolatok szerepe kevésbé ismert ezekben a működésekben. Jelen dolgozatban a tapintásban kiemelt fontosságú agykérgi területek populációs szintű kapcsolati mintázatának és e területek működésének szabályozásában részt vevő gátló sejtek vizsgálatát tűztük ki célul.

A struktúra és funkció speciális kapcsolatát a vizuális kéregben jól ismerjük (összefoglaló: Lund 2003). Számos tanulmány foglalkozik ezeknek az összeköttetéseknek a leírásával, az áréakon belüli kolumnáris felépítéssel, mint például a primer látókéregben (V1) található különböző funkciójú kolumnák (okuláris dominancia: Malach és mtsai. 1993; orientációs: Sincich és Blasdel 2001; szín: Ts'o és Gilbert 1988), vagy az áréák közötti kapcsolatok laterális eloszlásával*, például a

*A laterális eloszlás a kolumnák horizontális, oldalirányú összeköttetéseit jelöli.

primer és szekunder látókéreg (V1 és V2) között (Roe és Ts'o 2015; Shmuel és mtsai. 2005; Sincich és mtsai. 2010; Federer és mtsai. 2013; Yarch és mtsai. 2017). Ezeknek a neuronális hálózatoknak a leírása tette lehetővé, hogy megértsük a vizuális ingerek integrációjának alapját és ezért segítséget nyújthat a taktilis információ feldolgozásának megértésében is.

Az idegsejtek szintjén az érzékelt tulajdonságok integrációja a receptív mező (RF) tulajdonságain alapszik. Receptív mezőnek nevezzük azt a perifériás területet, amelynek ingerlése a szenzoros idegsejtet aktiválja. Klasszikus receptív mezőnek (cRF) tekintjük azt a területet, amelynek optimális paraméterekkel történő ingerlése aktiválja a szenzoros neuront (Hubel és Wiesel 1962; Barlow és mtsai. 1967). Vizuális kérgi tanulmányok alapján beszélhetünk még extra-klasszikus receptív mezőről (ecRF), ahol a stimulus nem tud direkt választ kiváltani, de a cRF választ modulálni tudja (Henry és mtsai. 2013). Az RF centrumában kiváltott válasz, ha megegyezik az RF-et körülvevő ecRF adekvált stimulusával, csökkenni fog (Rao és Ballard 1999). A vizuális kérgen végzett vizsgálatok alapján felállított modell szerint az ecRF feladata, hogy a bejövő információ és a magasabb hierarchiájú terület általi predikció közti esetleges eltéréseket azonosítsa (Rao és Ballard 1999).

A vizuális kéregben a hierarchikus felépítés fontos szerepet játszik a receptív mezők térbeli struktúrájának kialakításában a felszálló (az angolszász irodalomban elterjedt nevezéktan és nemzetközileg elfogadott rövidítések alapján: feedforward - FF), leszálló (feedback - FB) és áreán belüli horizontális kapcsolatok térbeli szerveződésével (Bair 2005; Harrison és mtsai. 2007; Bardy és mtsai. 2009; Jeffs és mtsai. 2009; összefoglaló: Angelucci és Bressloff 2006). A cRF tulajdonságok meghatározásában a FF kapcsolatok a meghatározók, míg az ecRF tulajdonságok kialakításában a FB valamint az intrinzik kapcsolatok. Ennek megfelelően a különböző kérgi kapcsolatok eltérő oldalirányú kiterjedéssel rendelkeznek: a FF kapcsolatok kisebb, a FB kapcsolatok pedig nagyobb kérgi területen oszlanak el (Angelucci és Bressloff 2006; Jeffs és mtsai. 2009). Ezek az ismeretek arra mutatnak rá, hogy a különböző hierarchiájú kapcsolatok interakciója neuron populációk között valósul meg, ami az agykérgi hálózat szerveződésének mezoszkópos szintje.

A vizuális kérgi összeköttetések másik fontos tulajdonsága a felsőbbrendű emlősökben (macskafélék, majmok) megfigyelhető klaszteres eloszlás. A V1 és V2

áreán belüli és áreák közötti kapcsolatai moduláris felépítést mutatnak (Gilbert és Wiesel 1989; Lund és mtsai. 1993; Buzás és mtsai. 2006; Jeffs és mtsai. 2009; Markov és mtsai. 2014; Rockland 2015). Az áreán belül és közötti összeköttetéseket teremtő neuronok V1-ben erősebb klaszterezettséget mutatnak, mint V2-ben (Gilbert és Wiesel 1989; Jeffs és mtsai. 2009; Negwer és mtsai. 2017). Az újabb nagy felbontású fMRI kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a vizuális kéregben az áreák közötti interakciók azonos méretű kérgi területek között valósulnak meg (Harvey és Dumoulin 2011).

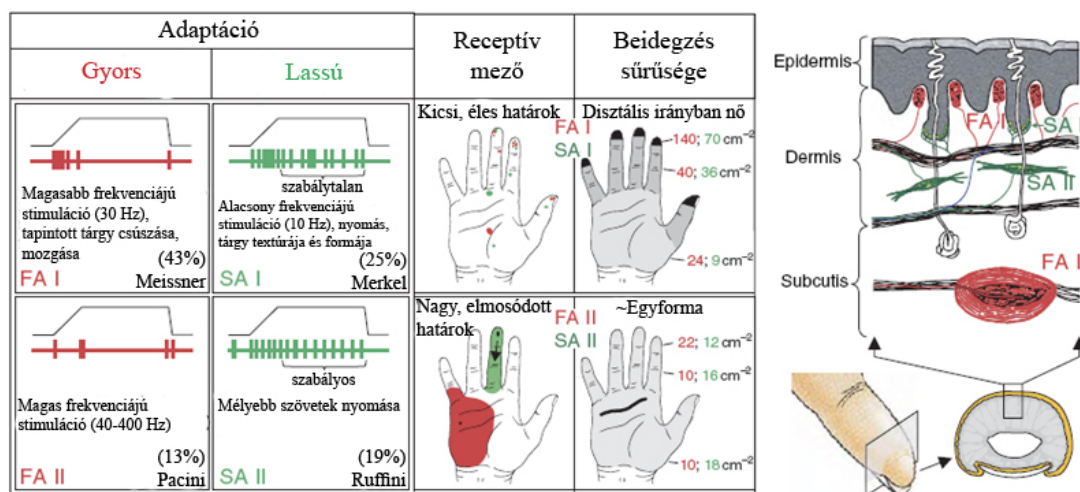
Nem emberszabású főemlősök primer szomatoszenzoros kérgében eddig kevés összehasonlítható ismeretünk van az RF tulajdonságokat kialakító kérgi kapcsolatok működésének szabályszerűségeiről. Főemlősökben az SI Brodmann áreá 3b (BA3b) és áreá 1 (BA1) és a vizuális kéreg V1 és V2 területe között vonható párhuzam a hierarchia és relatív RF méret tekintetében (Iwamura 1998; Kaas 2004a). A BA3b és BA1 fontos területei az ujjakról érkező információk integrálásának (BA3b: Iwamura 1983a, Chen és mtsai. 2003; Friedman és mtsai. 2008; Reed és mtsai. 2008, 2010a, 2010b; Pei és mtsai. 2009; Lipton és mtsai. 2010; Thakur és mtsai. 2012, BA1: Mountcastle és Powell 1959; Jones és mtsai. 1978; Hyvarinen és Poranen 1978; Costanzo és Gardner 1980; Sur és mtsai. 1980, 1982, 1985; Iwamura és mtsai. 1983b; Sinclair és Burton 1991; Iwamura és mtsai. 1993; Iwamura 1998; Sripathi és mtsai. 2006; Hsiao 2008; Pei és mtsai. 2010). A szomatotopias felépítés és az almodalítások integrációja a V1 ecRF tulajdonságainak kialakulására emlékeztet, amelyet a környező területekkel kialakított interakciók biztosítanak (Angelucci és Bressloff 2006).

A populációs szintű kapcsolatrendszer feltérképezése nélkülözhetetlen az RF tulajdonságok megértéséhez. A vizuális kéregből ismert, hogy a cRF és ecRF tulajdonságok a FF, FB és intrinzik kapcsolatok eloszlásán alapulnak (Angelucci és Bressloff 2006). A dolgozatban a BA3b és BA1 intrinzik és interaréalis reciprok kapcsolatai két fő szempontból kerülnek leírásra. Az egyik a kapcsolatok laterális kiterjedésének nagysága és viszonyuk az intrinsic signal optical imaginggel (IOS) rögzített populációs aktivitáshoz. A másik a kapcsolatok a szomatotopikus reprezentációhoz képest való eloszlásának specifikitása.

2.2 A tapintás anatómiai alapjai: receptorok, taktilis modalitások

A szomatoszenzoros rendszernek a finomabb és bonyolultabb tapintásért (tapintással való felismerés, két pont elkülönítése, vibráció) felelős részét vizsgáltuk részletesebben. A kéz, különösen az ujjbegyek reprezentációja az agykéreg felszínén aránytalanul nagy területet foglal el a többi testrészhez képest, mivel ezek a test legnagyobb receptordenzitású területei közé tartoznak (Kandel, 1991).

A tapintás szempontjából különösen fontos szőrtelen bőr (tenyér, ujjbegyek) receptoraiból két lassan és két gyorsan adaptálódó pálya indul: a lassan adaptálódó (slowly adapting - SA) (Merkel-SA I) és (Ruffini-SA II), és a gyorsan adaptálódó RA vagy FA (rapidly/fast adapting)(Meissner-RA és Pacini-PC) receptorokból. A receptorok elhelyezkedését és tulajdonságait az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra. A tapintásban szerepet játszó bőr receptorok és pályák tulajdonságai.

Az adaptáció szerinti csoportosítás esetén megkülönböztetünk két gyorsan (FA I és FA II) és két lassan (SA I és SA II) adaptálódó receptort. Az egyes receptorokat leíró panelekben látható a receptorok trapezoid stimulusra (szürke vonal) adott válasza (piros és zöld tüzelési frekvenciát mutató vonalak), egy rövid leírás az adekvált ingerről valamint a receptor előfordulásának százalékos eloszlása. A receptív mezők és a beidegzés sűrűségét rajz szemlélteti. A receptorok térbeli elhelyezkedését egy ujjbegy keresztmetszeti képén láthatjuk. (Johansson és Flanagan nyomán, 2010)

A Merkel és a Meissner receptorok felszínesen az epidermis és a dermis határán helyezkednek el, míg a RA és PC mélyreceptorok, a dermis és a subcutis kötőszövetes állományába ágyazódnak. A felszíni receptorok primer afferenseinek receptív mezője kicsi (durván 1 mm^2), négy-tíz az ujjbegyen és a tenyéren található bőrbarázdát főgnak át (Martin és Jessel 1991) így érve el nagy felbontást. A Merkel testek az alacsony frekvenciájú stimulációra (10 Hz), nyomásra szenzitívek, meghatározó szerepük van a tárgy textúra és forma kódolásában. A Meissner testek magasabb frekvenciájú stimulációra (30-40 Hz), a tapintott, megfogott tárgy csúszására és mozgására aktiválódnak a legkisebb küszöbvel, fontosak az időben folyamatosan változó ingerek érzékelésében. A Pacini testek magas frekvenciájú (~200 Hz) stimulálásra, míg a Ruffini testek legfőképpen mélyebb szövetek nyomására és ízületek mozgására aktiválódnak. A tapintás szempontjából fontos négyféle bőr receptor közül tehát mind az úgynevezett felszíni illetve mély receptorok között találunk 1-1 lassan és gyorsan adaptálódó típust.

Három féle almodalitást közvetítő pálya szelektív ingerlése különböző érzeteket vált ki, ezek: nyomás (SA I), „flutter”, amely ütögetés/remegés szerű érzet (RA) és rezgés (PC). A Ruffinivel (SAII) kiegészülve ezek együttesen teszik lehetővé a tárgy formájának, textúrájának érzékelését. SAII Ruffiniból indul, feltehetően proprioceptív funkcióval bír. A textúra meghatározásakor különböző kategóriákba sorolhatjuk a megfogott tárgyat: csúszós, érdes, bőr szerű, nedves. Ezek közül a kategóriák közül csak keveset ismerünk. A rezgés érzékelését két almodalitás fedi le, az egyik a „flutter”, azaz a lassú hullámú rezgés, amely a 40 Hz alatti frekvenciákra aktiválódik, a másik a rezgés, amely a 40 Hz feletti frekvenciákra aktiválódik. Ez a két érzet lefedi az 5-400 Hz-ig kiterjedő tartományt (Hendry és mtsai. 1999).

A modalitások párhuzamos pályákkal (*labeled line code*) érik el az agykérget, ami azt jelenti, hogy a receptorok axonjai parallel, modalitás-specifikus pályákként létesítenek kapcsolatot a periféria és a központi idegrendszer között (Martin és Jessel 1991).

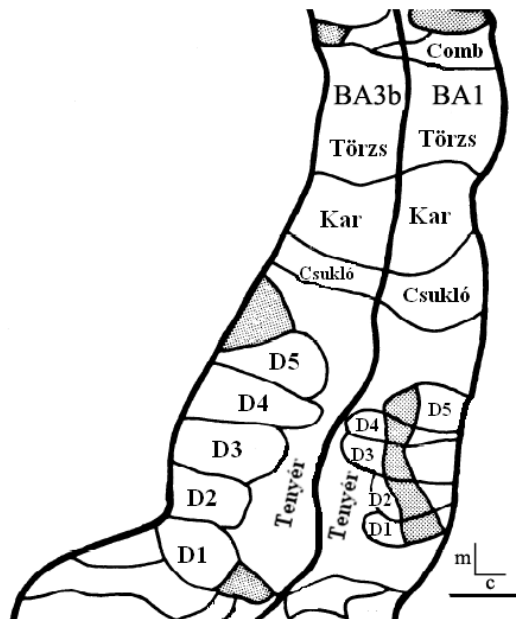
Az ujjbegyek receptoraiból a hátsó kötegi lemniscus medialis szállítja az információt az SI-be az agytörzsön és thalamuson át.

2.3 A primer szomatoszenzoros kéreg felépítése: struktúra és funkció

Az SI a posztcentrális gyruson helyezkedik el és négy citoarchitektúrájában különböző területből áll, melyek a Brodmann área 3a, 3b, 1 és 2. Főemlősökben a testfelszínről ezeken a területeken külön-külön szomatotóp vetülést találunk (lásd BA3b és BA1 esetében a 2. ábraát)(Kaas és mtsai. 1979; Sur és mtsai. 1982).

BA3b és BA1-ben egymással tükörszimmetrikus szomatotópiás térképek találhatók (2. ábra): a kéz esetében az ujjbegyek reprezentációs területe a BA3b rosztrális határán és még a BA1 kaudális határán található, míg a tenyér alapjának reprezentációs területe a BA3b és BA1 közös határán húzódik. A kéz és az ujjak reprezentációs területe erről a határvonalról tükröződik BA3b-ben és BA1-ben.

Mindegyik áréában a negyedik rétegben nagyszámú sűrűn elhelyezkedő interneuron található (Jones 1975; Lund 1984), emiatt hívjuk a szomatoszenzoros kérget granuláris kéregnek.



2. ábra. A kéz reprezentációjának felépítése az SI-ben BA3b és BA1 területén keleti éjímajomban (*Aotus trivirgatus*).

A két área egymás mellett helyezkedik el és bennük a kezek reprezentációja egymásra tükörszimmetrikus. Az áreahatár mellett találjuk a tenyér, majd BA3b esetében ettől rosztrálisan, BA1 esetében kaudálisan az ujjak reprezentációit. D1-5: az ujjak reprezentációs területe, m: mediális, c: kaudális. A szürke területek a kéz- és lábujjak szőrrel borított dorzális területeinek reprezentációit jelölik. Méretvonal: 1 mm. (Sur és mtsai nyomán, 1980)

Az SI mindegyik régiója a thalamus ventro-posterio magjának (VP) különböző részeiből kap bemenetet. A BA3a a thalamus ventrális posterolaterális magját (VPL) körülvevő héj régióból kapja a bemenetet és leginkább a durva tapintási ingerek feldolgozásával foglalkozik. BA3b a VPL központi mag régiójából kapja a bemenetét. Ennek a területnek karakterisztikus tulajdonságai macskában, patkányban és főemlősben, hogy csak tapintás által kiváltott ingerre aktiválódik. A thalamikus bemenet mellett BA1 és BA2 erős bemenetet kapnak BA3b-ből és neuronjaik receptív mezeje több ujjat is átér. Mindkét áréát aktiválja a finom érintés, valamint a BA2-ben emellett a propriocepció is megjelenik.

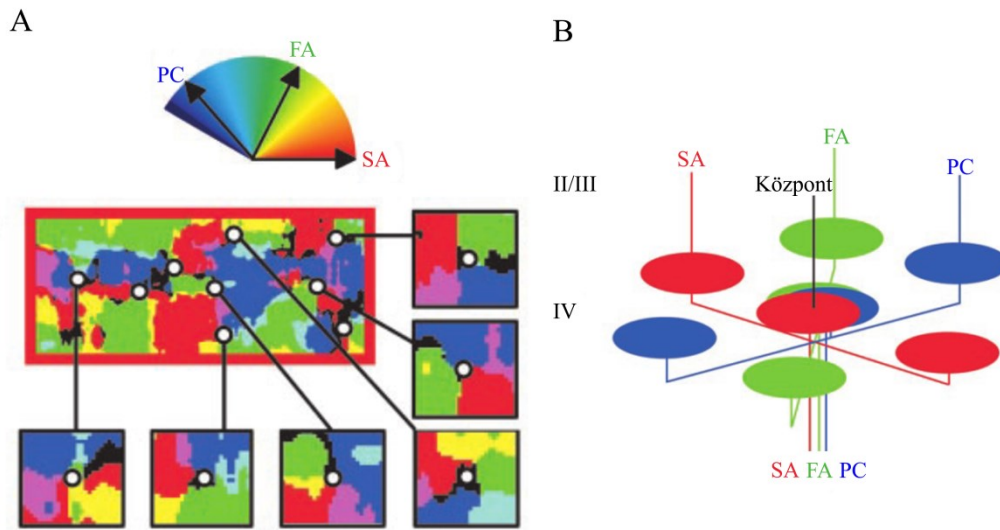
Összehasonlítva a BA3b és BA1-et, utóbbiban nagyobb receptív mezővel rendelkező neuronokat lehet megfigyelni, amelyek több ujjat lefednek. BA3a/3b határ a disztális ujjbegyek között húzódik, itt az aktivitás változás a bőr felszínesebb receptorairól a mélyebb receptorok felé tolódik el, amelyek ízületi mozgásra aktiválódnak BA3a-ban (Kandel és Jessel 1991; London és mtsai. 2008). Az újvilági majmoknál BA2 létezése vitatott (Kaas 2004a). Ennek ellenére a BA1-től kaudálisan elhelyezkedő területre BA2-ként hivatkozunk. BA1/2 határ is a disztális ujjbegyek között húzódik, BA2 felé a bőr ingerlésére adott válasz nagymértékben csökken (Pons és mtsai. 1985).

2.3.1 Az área 3b és área 1 kolumnáris szerkezete

A párhuzamos pályákként felfutó almodalitások miatt lehetséges, hogy a szomatoszenzoros kéreg kisebb ismétlődő egységekből, kolumnákból épül fel. Ezeket a vertikálisan kapcsolódó idegsejtekből álló egységeket Lorente de Nó írta le az 1900-as évek közepén. A kolumnák elektrofiziológiai tulajdonságait Mountcastle (1955), míg az anatómiai felépítését Szentágothai (1975) írta le. Egy kolumna sejtjei a II-VI. réteg között helyezkednek el és az egy kolumnához tartozó sejtek azonos típusú perifériás receptor stimulálására, tehát egyféle almodaliásra, aktiválódnak közel egy időben. Ez a típusú szerveződés anatómiailag leginkább rágszálók szomatoszenzoros kérgében figyelhető a barrelek formájában. Ezekben a fajokban minden egyes bajuszszőr egy hozzá tartozó barrelben reprezentálódik.

Összességében tehát BA3b-ben és BA1-ben a funkcionális térképek szomatotópiásan rendezett, almodalitás specifikus formában (nyomás, „flutter”, rezgés)

jelennek meg, hasonlóan a V1 retinotopikusan rendezett orientációs kolumnáihoz (Sur és mtsai. 1980; Friedman és mtsai. 2008)(3. ábra).



3. ábra. BA1 almodalításokat bemutató vektortérképe.

(A) A piros, zöld és kék a nyomás (SA receptor), flutter (FA receptor) és vibrációra (PC receptor) mutatott preferenciát jelzi. A piros keretben egy 6 színnel megjelenített almodalitás térkép látható, ahol a fehér pontok a különböző almodalítások lehetséges találkozásait jelölik. Figyeljük meg, hogy az almodalítások szélkerék szerűen mindkét irányba rendezetten megtalálhatók. (B) Az SA, FA és PC preferencia modellje BA1-ben. A BA1 4. rétegét elérő thalamokortikális vagy kortiko-kortikális bemenetek összetettek és 200-300 μm átmérőjű kolumnákban képeződnek le. Néhány SA, FA és PC bemenet egy központ (fehér pont) köré rendeződve átfed. (Friedman és mtsai. 2004 nyomán)

2.3.2 Receptív mező tulajdonságok área 3b és área 1-ben

A szenzoros információ térbeli helyzetének meghatározásához két dolognak kell teljesülnie: (1) a stimulus lokalizálásának és (2) két egymáshoz közeli stimulus megkülönböztetésének képességének (Martin 1991). A Weber (1846) által bevezetett „2 point limen” érték azt a két pont közti távolságot írja le, amelynél még meg tudjuk különböztetni a két pontot egymástól. Ennek a tárgy formájának érzékelésében, a térbeli feloldóképességben van nagy szerepe. Az ujjbegyeken ez az érték 0,9 mm körül van (Hendry és mtsai. 1999).

A vizuális és szomatoszenzoros neuronok RF tulajdonságai nagyon hasonlítanak egymáshoz. A szomatoszenzoros neuronokra is jellemző, hogy a neuronok RF mérete azokon a helyeken kisebb, ahol nagyobb térbeli felbontásra van szükség. Az ujjbegyek specifikusan ilyen területek, itt találjuk a legnagyobb receptor sűrűséget és a legkisebb RF-t (Kandel és Jessel 1991). A vizuális és szomatoszenzoros rendszerre is igaz, hogy a thalamusban az RF egy kör alakú központból és a körülötte található perifériás részből áll. A kéregben az RF bonyolultabb szerkezetet mutat, ahol új tulajdonságok jelennek meg mint például az irány és mozgás szelektivitás (Bensaïa és mtsai. 2008).

BA3b receptív mezői kis méretűek, alapvetően egy ujjbegyre lokalizálódnak, finom érintésre adott gyors válasszal rendelkeznek (Nelson és mtsai. 1980; Pons és mtsai. 1987; Sur és mtsai. 1982). Altatott és éber majmokon végzett kísérletek leírták, hogy ujjak reprezentációi közötti információ integrálás már BA3b-ban megkezdődik (Chen és mtsai. 2003; Lipton és mtsai. 2010; Reed és mtsai. 2008).

BA1 RF-i nagyobbak, több ujjbegyet lefednek és komplex ingerekre adnak választ, mint a mozgás, az irány és a sebesség (Iwamura és mtsai. 1993; Sur és mtsai. 1982). BA1 bemeneteinek többsége BA3b-ból származik, az általánosan elterjedt nézet szerint a BA1 neuronjainak összetett választulajdonságait a BA3b efferenseinek konvergenciája eredményezheti.

2.3.3 Az agykérgi nagyítási faktor

Az RF tulajdonságok és az ehhez köthető agykérgi nagyítási faktor (cortical magnification factor - CMF) fontosságát először a vizuális kéregben írták le (Daniel és Whitteridge 1961). A látókéreg esetében Azzopardi és Cowey (1993) tárták fel, hogy a retina foveájában elhelyezkedő ganglionsejtek 3-6-szor nagyobb területre vetítenek a primer látókéregben, mint a foveától perifériásabban elhelyezkedő ganglionsejtek. Az RF tulajdonságok egyes neuronokra jellemzőek, míg a CMF megmutatja, hogy mekkora kérgi területen zajlik egy adott perifériás területről érkező információ feldolgozása. A szomatoszenzoros kéreg neuronjainak RF területe nem egyforma a testfelszínen elfoglalt helyzettől függően (pl.: Meissner receptor RF az ujjbegyen 3-4 mm, míg a törzsön százszor nagyobb, Kandel és Jessel 1991). Az olyan testrészeket reprezentáló idegsejtek, amelyeknek kisebb RF-jük van nagyobb területet foglalnak el a kérgen, így biztosítva a pontos feldolgozást. A szomatoszenzoros reprezentációk leírásánál a CMF megmutatja a különböző testrészek agykérgi reprezentációjának és a reprezentált

bőrfelület területeinek arányát (agykérgi terület/reprezentált bőrterület)(Sur és mtsai. 1980; Friedman és mtsai. 2008). A beidegzés sűrűsége és az adott szenzoros bemenet agykérgi reprezentációjának nagysága közötti kapcsolatot először Welker és Van der Loos (1986) írta le egerek sinus-szőreivel kapcsolatban. A sinus-szőrök esetében az agykérgi nagyítás a perifériás beidegzés sűrűségének tükörképe (Catania és mtsai. 2011).

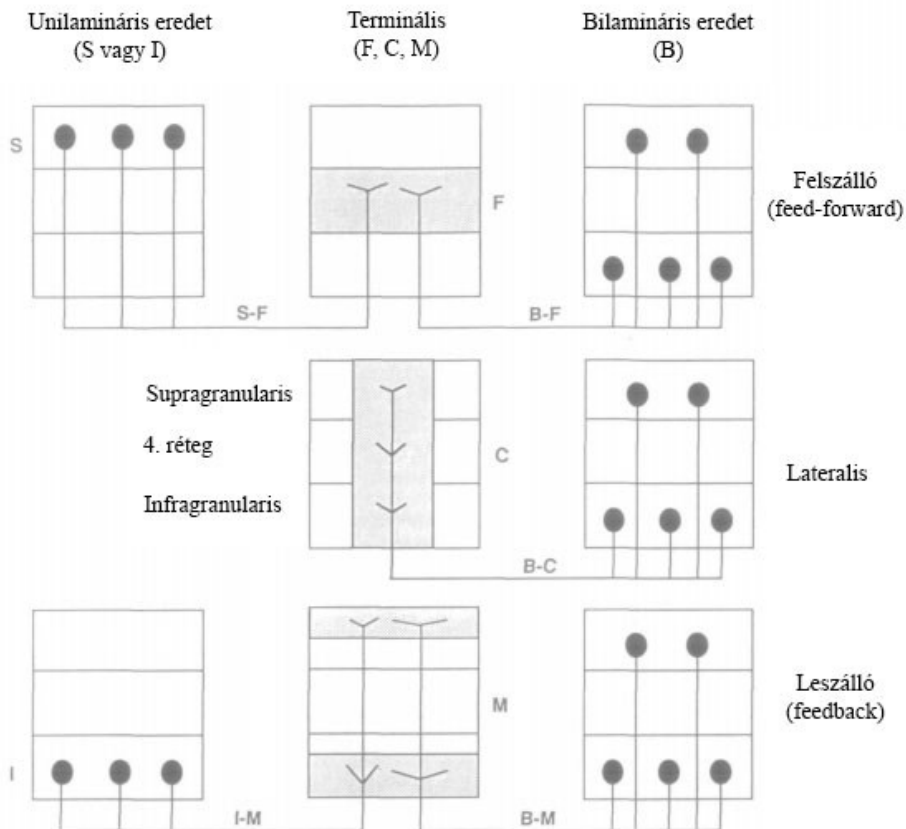
A CMF értékek megismerése a szomatoszenzoros kéreg esetén azért fontos, mert az összeköttetések kérgi kiterjedése által reprezentált bőrfelület méretei alapján következtethetünk a funkcionális integrációra. Továbbá megvizsgálhatjuk, hogy vonható-e párhuzam V1 és V2-vel a CMF és a kapcsolatok szerveződésében BA3b és BA1-el.

2.4 Az agykéreg kapcsolatainak eloszlása

2.4.1 Rétegeloszlás

A kérgi kapcsolatok hierarchikussága a rétegeloszlásban is megfigyelhető. A FB és FF kapcsolatok struktúráját a sejttestek és a terminális axon arborizációk (később terminális arborizáció vagy TA) rétegbeli eloszlásával lehet jellemezni (4. ábra; Rockland és Lund 1983; Felleman és Van Essen 1991; Barone és mtsai. 2000). Felleman és munkatársai a vizuális kéregben három jellemző terminális eloszlási mintázatot állapítottak meg: a FF kapcsolatok a 3-4. rétegben végződnek, a FB kapcsolatok mélyen vagy a szuperficiális rétegekben, a laterális kapcsolatok pedig kolumnárisan szervezettek (4. ábra).

A Felleman és munkatársai által leírt modellhez jól igazodik a Barone és munkatársai (2000) által bevezetett mérőszám, amely a szupragranuláris rétegekben jelölődött neuronok arányát adja meg az áréában a kéreg egész mélységében jelölődött neuronjaihoz képest (SN). Az egymással közeli kapcsolatban álló területek SN értékei magasak, míg a fizikai és hierarchia szempontjából egymástól távol elhelyezkedő területek SN-je kicsi. A kotiko-kortikális vetítő neuronok rétegi eloszlása meghatározza a pálya irányát, FF vagy FB, és a kérgi áréák hierarchia viszonyát.



4. ábra. A kérgi kapcsolatok lamináris mintázata a hierarchia jellemzéséhez.

A középső oszlopban a három jellemző eloszlási mintázat látható: a 4. réteget preferáló végződések (F mintázat), a minden rétegben hasonló sűrűséget mutató végződések (C, kolumnáris mintázat) és a 4. réteget elkerülő mintázat (M, multilamináris mintázat). A sejtek eredetétől függően is három jellemző mintázatot találunk. Bilamináris (B) mintázat (jobbra) közel azonos számú sejtet mutat a szuperficiális és mély rétegekből és minden rétegben megjelenik a három típusú terminális mintázat. Az unilaminaris mintázatot (balra) a szuperficiális (S mintázat, F terminálisokkal) és infragranuláris inputok jellemzik (M terminálisokkal). (Felleman és Van Essen nyomán, 1991)

2.4.2 Horizontális eloszlás

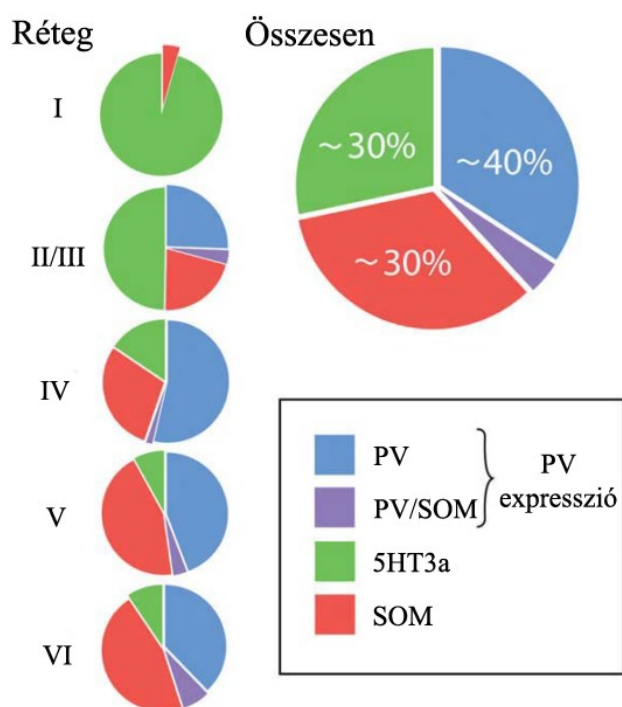
Populációs szinten, tehát neuron csoportok között, a kortiko-kortikális kapcsolatok moduláris felépítést mutatnak, ebben az esetben az efferens kapcsolatok terminális arborizációkban fejeződnek ki felsőbbrendű emlősökben, például macskában és főemlősökben (Lund és mtsai. 1993; Buzás és mtsai. 2006). A milliméter alatti mérettartományban az áreán belüli afferens kapcsolatok többségében lokálisan a

környező neuroncsoportokból származnak (Lund és mtsai. 1993; Buzás és mtsai. 2006, Markov és mtsai. 2014). Az aktivitás integrációja az intrinzik és asszociációs összeköttetéseken keresztül valósul meg, a kérgi hálózatok működésének alapját adva. A bemenetek és kimenetek a kapcsolatok típusától függően rétegespecifikusan szerveződnek és tükrözik a kortiko-kortikális kapcsolatok kérgi hierarchiáját (összefoglaló: Markov és mtsai. 2013). Ezzel ellentétben a kérgi modulok között horizontálisan szerveződő kapcsolatok felépítése szinte csak a vizuális kéregben ismert emlősökben, pedig ezek ismerete az SI-ben a cRF és ecRF tulajdonságok megértésében segítenének. Ennek a kérdésnek a fontosságára világítanak rá a nagy felbontású, milliméter skálájú nyugalmi állapotban készült fMRI tanulmányok, amelyek horizontális eloszlású funkcionális kapcsolatot mutatnak ki az SI és vizuális kéreg kisebb területei között, melyek a kérgen belüli neuronpopulációkat reprezentálják (Harvey és Dumoulin 2011; Wang és mtsai. 2013).

2.5 A gátlás szerepe a kérgi interakciók szabályzásában

A primer szomatoszenzoros kéreg kapcsolatai a primer motoros kéreggel fontos szerepet játszanak a tapintott tárgy megfelelő fogásában. A BA3b és BA1 közötti erős reciprok kapcsolat a disztális ujjbegyek homotóp reprezentációi között teremt kapcsolatot, míg a BA3a és M1 közötti kapcsolat a disztális ujjbegy reprezentáció és a fogásért felelős terület között valósul meg. A rendszer szabályozásában és finomhangolásában részt vevő interneuronok mind gátló, mind serkentő bemenetet kaphatnak.

A gátló interneuronok alapvető szerepet játszanak a kérgi funkciók finomhangolásában (összefoglaló: Lampl és Katz 2016) a haptikus funkciókért felelős primer szomatoszenzoros FF és FB kapcsolatok valamint az RF tulajdonságok szabályzásában betöltött funkciójukról azonban nem rendelkezünk kellő ismerettel főemlősben.



5. ábra. Az SI-ben megjelenő GABAerg gátló interneuronok megoszlása rétegenként.

(Rudy és mtsai. nyomán, 2011)

A neokortexben előforduló GABAerg interneuronok az idegsejt populáció 12-15%-át (Ren és mtsai. 1992; Beaulieu 1993; Meyer és mtsai. 2011) teszik ki rágcásalókban. Főemlősben ez az arány akár a 30%-ot is elérheti. (Rudy és mtsai. 2011). Az adatok azt mutatják, hogy a neokortikális gátló interneuronok majdnem 100%-át három nagy csoport adja: parvalbumin (PV), szomatostatin (SOM) és a szerotonin receptor (5HT3aR) tartalmú sejtek (Rudy és mtsai. 2011)(5. ábra).

A PV kalcium kötő fehérje tartalmú GABAerg interneuronok egységes populációt alkotnak és a kéreg IV. rétegében jelennek meg a legnagyobb számban (5. ábra). Az 1980-as évek óta tudjuk, hogy a PV tartalmú sejtek gyors tüzelési mintázatot mutatnak és nem adaptálódnak (Kawaguchi és mtsai. 1987). Két fajtájukat különböztetjük meg: a multipoláris morfológiájú kosársejteket, amelyek a posztszinaptikus sejten a sejttesten és az proximális dendriteken szinaptizálnak, valamint a kandeláber sejteket, amelyek a posztszinaptikus sejtek axon iniciális szegmentumán szinaptizálnak. Általánosságban elmondható, hogy a PV sejtek szabályozzák az akciós potenciál generálást a posztszinaptikus sejten (Atallah és mtsai. 2012; Lovett-Barron és mtsai. 2012).

A SOM neuropeptid tartalmú sejtek is egységes populációt alkotnak, a kéreg V. rétegében jelennek meg a legnagyobb számban (5. ábra). A SOM tartalmú interneuronokat a Martinotti sejtekkel azonosítjuk. Ezek olyan GABAerg interneuronok, amelyek axonjai elérik a kéreg legfelső rétegét, majd ott horizontális irányban futva a szomszédos kolumnák piramissejtjeinek dendritjein, dendrittüskéin szinaptizálnak, így szabályozva a posztszinaptikus sejt szinaptikus integrációját (Gentet 2012; Murayama és mtsai. 2009).

Az 5HT_{3a}R az egyetlen ionotróp szerotonin receptor, amely rágcsálókban minden PV és SOM negatív sejten megtalálható (Lee és mtsai. 2010). Elsődlegesen a kéreg I-III. rétegében találhatóak meg (5. ábra). Lee és mtsai. (2010) kimutatták, hogy minden vazóaktív intesztinális peptid (VIP) pozitív interneuron expresszál 5HT_{3a}R-t. Elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján több csoportba oszthatók, de specifikus markerek hiányában ezek a megállapítások nem teljes mértékben alátámasztottak (Rudy és mtsai. 2011). Rágcsálók SI-ben anatómiai bizonyíték van rá, hogy a gyorsan tüzelő neuronok (pl.: PV pozitív neuronok) kapnak VIP pozitív sejtektől bemenetet (Dávid és mtsai. 2007).

A PV és SOM tartalmú sejtek nem átfedő csoportokat képeznek (Gonchar és Burkhalter 1997; Rudy és mtsai. 2011), habár fejlődéstanilag mindkét típusú neuron a mediális gangliondombból származik (Rudy és mtsai. 2011). Az 5HT_{3a}R-t expresszáló sejtek a kaudális gangliondombból származnak (Rudy és mtsai, 2011).

3 Célkitűzések

Mókusmajom (*Saimiri sciureus*) BA3b és BA1 neuronális összeköttetéseit vizsgáltuk a taktilis információ integrációjának és hierarchikus kapcsolatainak szemszögéből. A tapintás szempontjából legfontosabb területekre, az ujjbegyek disztális reprezentációira fókuszáltunk. A következő hipotéziseket teszteltük:

- A magasabb rendű BA1-ben található áréán 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 komplexebb RF tulajdonságok kialakulásához?
- CMF figyelembe vétele változtat-e az előző pontban említett mintázaton?
- Az összeköttetések erőteljesebb klaszterezettséget mutatnak-e az alacsonyabb hierarchiájú BA3b-ben, mint a magasabb hierarchiájú BA1-ben?
- 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?
- Hogy viszonyul az FF és FB kapcsolatok horizontális eloszlása az intrinzik kapcsolatokhoz, egymáshoz, a populációs aktivitáshoz valamint az intrinzikhez hasonlóan anizotróp-e?
- A szomatoszenzoros információ feldolgozásában milyen szerepet játszanak a szomatozenzoros axonok célterületeit képező egyes GABAerg gátló interneuron típusok?

4 Módszerek

4.1 Munkamegosztás

A kísérletek a Vanderbilt Egyetem Pszichológia Tanszékével (Nashville, TN, USA) együttműködve valósultak meg.

A 4.2-6. fejezetekben leírt fiziológiai kísérletek a partner laboratóriumában történtek részvételünkkel. A 4.7-8. fejezetekben leírt hisztológiai kísérletek néhány kivétellel a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében laboratóriumunkban valósultak meg. A 4.8.5.1-2 fejezetekben leírt adatelemzést dr. Zalányi László, a Wigner Fizikai Kutatóközpont munkatársa végezte. A 4.8.10 fejezetben leírt mikroszkópos adatelemzést a freiburgi Alberts Ludwigs Universitát Zentrum für Biosystemanalyse Life Imaging Center-ben végeztük.

4.2 Állatok és tartási körülményeik

Főemlősök rendjébe tartozó mókusmajom (*Saimiri sciureus*)(6. ábra) az újvilági/szélesorrú (*Platyrrhini*) majmokhoz tartozik. Ezen belül is az orrtükör nélküliek (*Strepsirrhini*) alrendjébe és a csuklyásmajomfélék (*Cebidae*) családjába. A Közép- és Dél Amerikában őshonos, nappali életmódot folytató maximum 1 kg-os testtömegű és 50 cm hosszúságú állat a fákon él.



6. ábra. A mókusmajom (*Saimiri sciureus*).

(<https://hu.m.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Common.squirrel.monkey.arp.jpg>)

Keze kiemelkedően fontos tapintási szerv, lábai és farka már kevésbé érzékenyek, farkát fogódzkodásra nem használja. Az újvilági majmokon belül csak a mókusmajom és a csuklyásmajom rendelkezik opponálható hüvelykujjal. Így az emberhez hasonló kézfelépítése mellett fejlett agya teszi jó kísérleti állattá a tapintás agykérgi alapjainak megismeréséhez. Mindemellett viszonylag nagyméretű (~26 g), lysencephalikus (sima felszínű) agyfelépítése lehetővé teszi elektrofiziológiai és képalkotó vizsgálatok egyszerű kivitelezését az agykéreg működésének vizsgálatában (Chen és mtsai. 2005).

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.

Az állatházban állandó körülmények, 22 ± 2 °C hőmérséklet, valamint 50-60%-os páratartalom volt biztosítva.

4.3 Műtét

A kezdeti altatás ketamin-hidrokloriddal (10 mg/kg) történt, az altatószer miatt bekövetkező nyáktermelés csökkentésére atropinnal (0,05 mg/kg) együtt lett alkalmazva. Az anesztéziát, a sztereotaxisba való behelyezés után, izoflurán (0,9-1,3%) inhalációval tartottuk fent. A következő életjelek folyamatos megfigyelés alatt voltak a műtét során: vér oxigén-telítettsége (SpO_2), pulzusszám, EKG, EEG, CO_2 szint (ET- CO_2), légzésfrekvencia, hőmérséklet. Az állatok testhőmérsékletét $37,0-38,5$ °C között keringő víztakaró segítségével (Gaymar Industries, Orchard Park, NY, USA) biztosítottuk. Az állat dehidratáció ellen inravenásan Ringer-laktát (2,5%-os dextróz) oldatot kapott a műtét folyamán (3ml/kg/h).

A kraniotómia (bregmától anteroposterior irányban 6 mm és mediolaterálisan 15 mm) és a durotómia során a pre- és posztcentrális gyrussal homológ területet (BA1, BA3b, BA3a, M1) tártuk fel. A további tájékozódás a pia mater vérerei alapján történt. A neuronális jelölőanyag beinjektálása után a feltárt területet mesterséges durával fedtük le, majd a leválasztott koponyacsont darab cementtel került rögzítésre, végül a bőr összevarrása zárta a műtétet. Az állatok felébresztése után a posztoperatív fájdalom kezelése érzéstelenítővel történt. Az újabb kranió- és durotómiaig minimum 10 nap telt el.

4.4 Funkcionális térképezés

4.4.1 Ujjbegy ingerlés

Az ujj reprezentáció specifikus kérgi területek aktivációjának topografikus felépítése az ujj disztális, középső és proximális részén található szőrtelen bőr vibrotaktilis ingerlésével lett feltérképezve (Chen és mtsai. 2001; Chen és mtsai. 2003; Friedman és mtsai. 2004). Az ujjak körmök felőli oldalát gyurmába rögzítettük a megfelelő területek szabadonhagyásával a taktilis ingerléshez. A 2-4 ujjak ujjbegyeit ingerelve először egy hurkapálcával, majd von Frey szőrökkel egy durva felbontású térképet készítettünk. A már beazonosított területeken egy 2 mm átmérőjű rúddal, piezokeramikus egységhez (Noliac, Kvistgaard, Dánia) csatoltan, kerültek a vizsgált áréak nagyobb részletességgel térképezésre. A meghajtást egy Grass 88 stimulátor (Grass-Telefactor, West Warwick, RI, USA) biztosította. Az ujjbegyek kérgi szomatotópiájának optikai felérképezéséhez a taktilis inger egy 3 másodpercenkénti 8 Hz-es négyszögimpulzus-sorozatból állt (impulzus időtartama 30 ms, amplitúdója 0,48 mm). A szünetben, illetve az ingerlés nélküli (vak) állapotban a szonda finoman érintkezett a bőrrel.

4.4.2 Mikroelektrodás elektrofiziológiai térképezés

A kéz területének szomatotópiás és funkcionális felépítése jól ismert mókusmajomban (Sur és mtsai. 1982; Chen és mtsai. 2001). A BA3b a sulcus centralistól rosztrolaterálisan, az BA1 kaudolaterálisan helyezkedik el. A BA1 a BA3b-től kaudális irányba található, míg az BA3a a BA3b-től rosztrális irányba (Sur és mtsai. 1982; Chen és mtsai. 2001; Friedman és mtsai.,2004; Friedman és mtsai. 2008). Így a centrális sulcust használva viszonyítási struktúraként az elektrofiziológiai térképezés wolfram mikroelektrodokkal történt a felső-középső kérgi rétegekben (200-500 μ m-es mélységben) a BA1, BA2, BA3a, BA3b és M1 területén. Az idegsejt aktivitásért felelős bőrterületet az ellenoldali kéz ingerlésével azonosítottuk, audio erősítőn hallgatva a tüzelő neuronokat. Az aktiválódó idegsejtek egyszeri és többszörös, valamint finom érintésekre adott válaszok alapján lettek karakterizálva.

4.4.3 Intrinzik jel optikai képalkotás

Az intrinzik jel optikai képalkotó technika ("intrinsic optical imaging signals", IOS) térbeli felbontása $\sim 100 \mu$ m, időbeli felbontása ~ 100 ms (Chen és mtsai. 2007), így

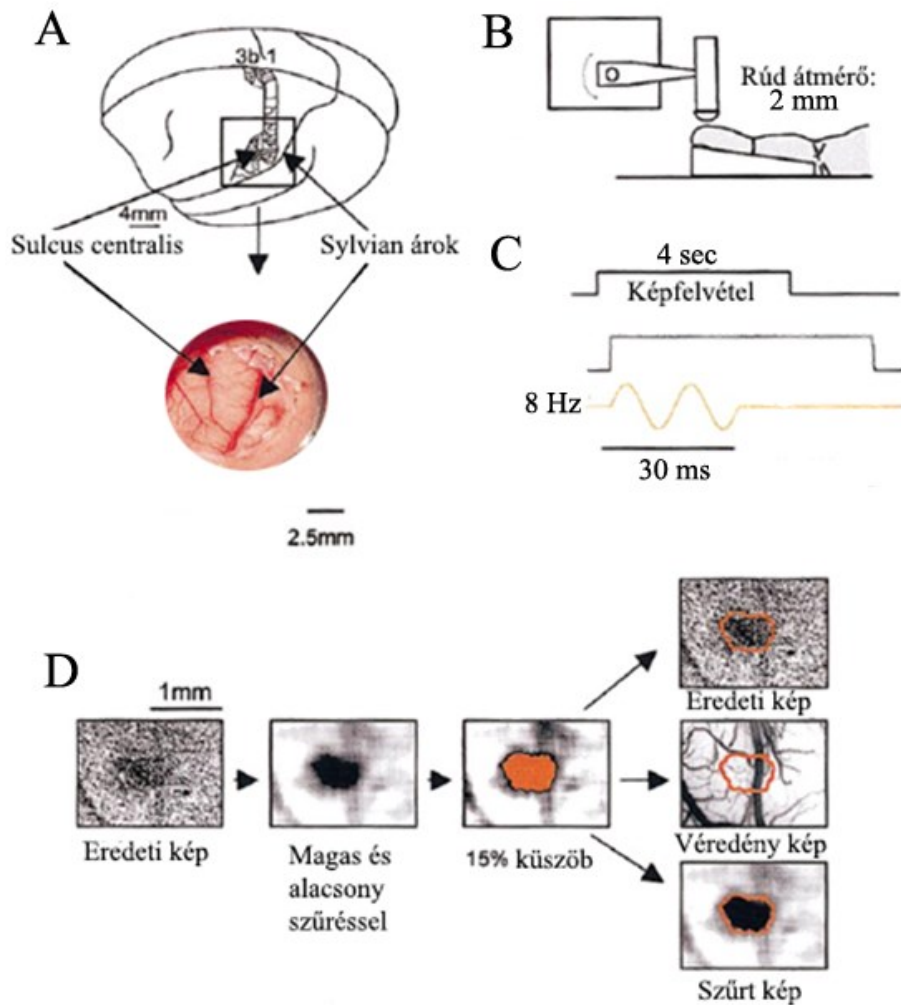
a szenzoros információ kérgi feldolgozását lehet vele tanulmányozni. Ennek a technikának a térbeli felbontása megengedi az agykéreg kisebb működési egységeinek, a kolumnáknak a vizsgálatát, amelyeknek átmérője 200-300 μm körüli (Mountcastle 1957). A fényhullámhossz-függő reflektancia változás egy adott kérgi terület aktivitásától függ, aktivitás esetén az adott terület reflektanciája kisebb. Ezt az átáramló vér oxigén- (HbO₂) és dezoxihemoglobin (Hbr) arányának változása okozza. Az 570-630 nm-es (vörös) hullámhosszon a rendszer a Hbr oxigenáltsági változásaira a leg szenzitívebb, mivel a Hbr erősebben abszorbeál ezen a hullámhosszon, mint a HbO₂. A válasz ezen a hullámhosszon két fázisú: az elsőben csökken a reflektancia, melyet növekedés követ. Az első a metabolikus aktivitással függ össze, a második pedig a vérátáramlás megnövekedésével. A CCD kamera felvételeken az aktiválódott terület sötétebb lesz.

4.4.3.1 *Képfelvétel*

A képek 630 nm-es hullámhossz megvilágítással egy optikai kamrán keresztül CCD kamerával készültek Redshirt Imaging System által futtatott CortiPlex szoftverrel (Redshirt Imaging, Decatur, GA, USA) vagy az Imager 3001 rendszerrel (Optical Imaging Inc., Germantown, NY, USA) egy tandem szisztémájú lencserendszer segítségével. A visszavert fény nagy része a kéreg felső 500 μm -éből származott (Ratzlaff és Grinvald, 1991). A későbbi tájékozódáshoz használt értékép 570 nm-es megvilágítással készült.

A taktilis ingerek véletlenszerűen blokkokban követték egymást. Egy blokk 4 féle kondíciót tartalmazott (pl.: proximális, középső, disztális részek egyazon ujjon és vak, ingerlés nélküli állapot, disztális ujjbegypárna a 2, 3, 4-es ujjakon és vak). Minden ingerléshez 40-50 blokk tartozott. 5 kép/másodperc 4 másodpercen át került felvételre 200 miliszekundummal a stimulus megjelenése előttől. A stimulusok között eltelt idő 8-10 másodperc volt.

4.4.3.2 Képelemzés



7. ábra. Az *intrinsic optical imaging signals (IOS)* és a *taktilis ingerlés módszere*.

(A) A vizsgált terület felülnézete. A parietális kéreg felett történt kraniotómia során a sulcus centralis és a Sylvius árok között fekvő elsődleges SI vált láthatóvá. Az optikai kamra a feltárt terület fölé lett beültetve. A kép az ujjbegy reprezentációk területét mutatja BA 3b-ben. Méretarány: 4 mm és 2,5 mm. (B) Az ingerlő felszerelés. Az ujjbegyet 2 mm átmérőjű teflonrúd segítségével ingerelték. (C) Stimulus hullámalak. Négyzet alakú feszültséget (frekvencia: 8 Hz, amplitudó: 0,48 mm, teljes időtartam 3 sec) alkalmaztak a szomatoszenzoros kérgi struktúrák feltérképezéséhez. A teljes ingerlés 3 másodpercig tartott. A kép felvétele az ingerlés előtt 200 milliszekundummal kezdődött és 4 másodpercig tartott. (D) Standard képanalízis. 15 %-os küszöbérték feletti aktív zóna kiszűrése (narancssárga). A határ a narancsszínű área, az összehasonlításhoz a feldolgozatlan képpel lett összeillesztve a véredénytérkép. (Chen és mtsai. nyomán, 2001)

Az egyfajta stimuláláshoz tartozó 5-6 kép került átlagolásra a jobb jel-zaj arány eléréséhez. „Vak” referencia képként egy 3 másodperces felvétel szolgált, amelyet stimulus hiányában rögzítettünk. Ebből még kivonásra került a vérerek által létrehozott alapvonalkép. A legerősebb aktivációt mutató területek körülhatárolásához a képekre egy 10 pixeles (150 μm sugarú) alul áteresztő térbeli Gauss szűrőt alkalmaztunk.

4.4.4 A kézrepresentáció feltérképezése a két áréában

Az IOS és elektrofiziológias mérések eredményeinek egyszerre történő felhasználásával meghatározható a kéz szomatotópiás felépítése az SI-ben. Az áréak közötti határok az elektrofiziológiai adatok, receptív mező tulajdonságok és IOS adatok és szomatotópiás vetülés alapján lettek megbecsülve. Mivel a sok elektródaszúrás nyoma akadályozhatja a pályajelölő anyag terjedését a szövet roncsolása miatt, így a mérések száma limitált: J 8, M 46, Mc 42, Mo 20, P 40, R 60, T 75 és V 4 mérőpont.

4.5 Pályajelölés

4.5.1 Pályajelölő anyagok és beadásuk

A kézrepresentáció fiziológiai módszerekkel történő feltérképezését követően biotinilált-dextrán-amint (BDA, Invitrogen)(10% 0,05M foszfát pufferben (később PB), pH 7,4) iontoforetikus úton injektáltunk a BA3b, BA3a és BA1 funkcionálisan azonosított területére. Azért ezt a neuronális pályajelölőt választottuk, mert megfelelő kombinációban kétirányú jelölésre alkalmas valamint kompatibilis a fluoreszcens immunhisztokémiával. A beadások paramétereit az 1. táblázat foglalja össze.

A kétirányú neuronális térképezéshez egy a főemlősökben is már leírt módszert alkalmaztunk (Rockland és Knutson 2000; Rockland és Knutson 2001; Li és mtsai. 2003): két különböző molekulásúlyú BDA, 10K (anterorográd jelölési preferencia) és 3K (retrográd jelölési preferencia) 1:1 arányú keverékét 3 μA árammal, 7 másodperces on/off ciklussal a kéreg felszín alatt 350 μm -re (BA3b) 20 percen át, 350 és 750 μm -re (BA1) 10-10 percen át és 350 és 750 μm -re (BA3a) 20-20 percen át adtuk be. A beadást a 2-es ujjbegy (d2t) és egy esetben (Mo) a 4-es disztális ujjbegy (d4t) reprezentációs területén végeztük BA1 és BA3b esetében, amely SAI szelektivitással rendelkezett. BA3a beadás esetében is a 2-es ujjbegy reprezentációs területe lett injektálva.

1. táblázat. A BA3b, BA3a és BAI BDA beadások paramétereit és jellemzőit.

Minden érték μm -ben van megadva. Az üvegapilláris átmérője a beadás után lett le mérve. Az üvegapilláris végének átmérője a belső átmérőt jelenti. A beadási mélység a piális felszíntől mért távolságot jelenti, melyet mikromanipulátorral mértünk. A beadás központi régiójának átmérőjét a sorozat azon metszetein mértünk, ahol a legsűrűbb és legnagyobb kiterjedésű volt a jel. A szűrt csatorna mélysége közelítőleges és a legnagyobb értéket mutatja. A beadási és a szűrt csatorna-mélység közti különbség adódhatott abból, hogy a beadás során az agy pulzált és duzzadt. Mo és P esetén a szűrt csatorna bilamináris megjelenésű, mivel a szűrt csatorna átmérő kisebb volt $640 \mu\text{m}$ mélyen, mint a felette és alatta levő metszetek esetén (320 és $800 \mu\text{m}$). R és T esetében az üvegapilláris végének belső átmérőjéről, valamint a szűrt csatorna mélységéről nincs adatunk (NA).

Állatok	Üvegapilláris végének belső átmérője	Beadás mélysége	Központi régió átmérője	Szűrt csatorna mélysége	Metszetek száma	Granuláris réteg mélysége
Mc	12	350	260	260	5	520
V	20	350	380	390	9	520
J	15-17	350	330	390	10	520
M	30	350, 750	313	320	9	480
Mo	10	350, 750	295	160-800	16	640
P	10	350, 750	403	160-800	10	650
R	NA	350, 750	435	800	8	640
T	NA	350, 750	420	1120	8	640

4.5.2 Perfúzió

10-20 napos túlélés (J: 10 nap, M: 14 nap, Mc: 14 nap, Mo: 16 nap, P: 10 nap, R: 14 nap, T: 15 nap, V: 20 nap) után transzkardiális perfúziót végeztünk. Fiziológias sóoldattal (0,9 %-os NaCl desztillált vízben) történő öblítés után 40 percig, 4 %-os paraformaldehidet, 0,1%-os glutáraldehidet és 0,2%-os pikrinsavat tartalmazó (0,1 M PB-ben, pH 7,3) fixálót áramoltattunk az agyban. A vizsgálni kívánt területet ezután kivágtuk a kéregből és 4%-os paraformaldehid oldatban (0,1 M PB-ben, pH 7,3) egy éjszakán át enyhe nyomással kiterítve utófixáltuk.

4.6 Hisztológia

4.6.1 Fénymikroszkópia

50 µm vastag metszetek agyfelszínnel párhuzamosan, tangenciálisan metszett, 110 µm kihagyással gyűjtött sorozatát vizsgáltuk. Az agyfelszíntől számított 2x100 µm vastag metszetek után következtek a sorozat metszetei. A blokk tetejéről levágott 100 µm vastag metszetek az arachnoideális (1. és 2. metszet) és részben a neurális szövet tetejéről (3. metszet) származtak és az anatómiai és funkcionális térképek összeillesztéséhez kellett, amelyet az érhaló mintázat segítségével valósítottunk meg, mivel ezekben a metszetekben a vérerek párhuzamosak az agyfelszínnel. Az idegszövetben ugyanakkor az erek már függőleges irányban futnak; a nagyobbak követhetők a sorozatmetszeteken, ez a tulajdonság segítette a metszetsorozatok összeillesztésekor.

A BDA jelölés láthatóvá tételére standard ABC protokollt (Vectastain Elit ABC Kit, Vector) használtunk nikkel-intenzifikált diaminobenzidin (NiDAB) kromogén segítségével. Borohidrid oldatát (1 % NaBH₄ 0,1 M PB-ben, 30 percig) használtuk a szabad aldehid csoportok, és 1% H₂O₂ oldatot (0,1 M PB-ben 30 percig) az endogén peroxidáz aktivitás blokkolására. Krioprotektáns anyaggal (30%-os cukor 0,1 M PB-ben) kezelt metszeteket fagyasztásos-olvasztásos technikával kezeltük a jobb penetráció érdekében, majd a metszeteket egy éjszakán át 4 °C-on ABC-ben inkubáltuk (1:200 PB-ben, 0,1 M, pH 7,4). A NiDAB reakció elvégzése után a metszeteket ozmiummal kezeltük (1% OsO₄ és 5% szacharóz 0,1 M PB-ben 40 percig) és műgyantába (Durcupan, Sigma-Aldrich Kft.) ágyasztuk. A beágyazásra a metszetek torzulásának minimalizálása miatt volt szükség a funkcionális térképekkel történő jobb illeszthetőség miatt (Kisvárdy és mtsai. 2000). A metszeteket Hobbytimeos (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) tárgylemezre helyeztük, majd műgyantába ágyazva (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) szintén mártott fedőlemezzel lefedtük.

4.6.2 Fluoreszcens immunhisztokémia

4.6.2.1 *A primer ellenanyagok kiválasztása és tesztelése*

A primer és szekunder ellenanyagokat először patkány, mint kontroll, és csak erre a célra gyűjtött mókusmajom metszeteiken teszteltük.

A fluoreszcens immunhisztokémiai reakciókat szabadon úszó 20 µm vastagságú metszeteken végeztük el laborunk standard protokollja szerint (Kántor és mtsai. 2006). A metszeteket többször mostuk 0,2% TritonX-100 detergenst tartalmazó 25mM-os PB-ben (később TX-PB) a nem specifikus jelölés blokkolása előtt, amely 10%-os normál számár szérummal történt (TX-PB-ben higítva). A felhasznált ellenanyagok listája a 2. táblázatban olvasható.

A metszeteket 48 órára +4°C-on inkubáltuk a primer ellenanyagban, egyes esetekben többszörös jelölést is alkalmaztunk. Megfelelő számú mosás után a metszetek 2. táblázatban olvasható szekunder ellenanyagok keverékével lettek inkubálva (minden Alexa konjugált ellenanyag a Life Technologies, Budapest, Magyarország és minden DyLight konjugált ellenanyag a Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK terméke). Az ellenanyagok 3%-os normál szérumban TX-PB-ben lettek higítva. Az inkubáció 3 órán át szobahőmérsékleten sötétben történt. Az inkubációt követő megfelelő számú mosás után a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk fel és Vectashield Hard Set Mountig Mediummal fedtük le (Vector Laboratories Inc., USA) meghatározott vastagságú (170 µm) fedőlemezzel.

2. táblázat. A fluoreszcens jelöléshez tesztelt ellenanyagok felsorolása és azok higítása.

A listában szereplő primerek és szekunderek kombinációit használtuk.

Primer ellenanyagok	Szekunder ellenanyagok
egér anti-CR (1:1000, Swant)	számár anti-nyúl DyLight405 (1:500; Jackson)
nyúl anti-CR (1:500, 1:1000, 1:3000; Swant)	számár anti-kecske Alexa488
egér anti-GFAP (1:10.000, Sigma)	(1:500; Life Technologies)
nyúl anti-SOM (1:3000; Peninsula)	számár anti-nyúl Alexa488 (1:500, Jackson)
nyúl anti-SOM (1:500, 1:1000, 1:3000; Dr. Görös Tamás saját készítménye)	számár anti-kecske Alexa555
patkány anti-SOM (1:100, Millipore)	(1:500; Life Technologies)
egér anti-PSD 95 (1:1000, Millipore)	számár anti-egér Alexa647 (1:500, Life Technologies)
egér anti-PV (1:10.000, Sigma)	számár anti-patkány Alexa647 (1:500, Jackson)
egér anti-PV (1:10.000, Swant)	számár anti-egér DyLight649 (1:500; Jackson)
kecske anti-PV (1:1000, Swant)	
nyúl anti-PV (1:10.000, Swant)	

A meteszetek vizsgálata után határoztuk meg a később használt ellenanyagokat és hígításukat.

4.6.2.2 *Autofluoreszcencia csökkentésére alkalmazott módszerek*

A primer és szekunder ellenanyagok tesztelése során figyeltünk fel a mókusmajom metszetekben fellépő igen magas autofluoreszcenciára. A valószínűsíthetően a műtétek alatt aktiválódott gliasejtekben felhalmozódó lipofuscin granulomok okozta autofluoreszcencia csökkentésére több módszert is kipróbáltunk.

4.6.2.2.1 Aktiválódott gliasejtek festése

A gliasejtekre jellemző gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) megfestésével a 2. táblázatban látható hígítás szerint megfelelő szekunder ellenanyag hozzákötésével próbáltuk azonosítani az autofluoreszcenciát okozó sejteket.

4.6.2.2.2 Inkubálási idő alatti megvilágítás

A metszetek primer ellenanyagban való 48 órás +4°C-on történő inkubálása során folyamatos megvilágítást alkalmaztunk az inkubáló platekre helyezett erős fehér fényt kibocsátó lámpákkal (Neumann és Gabel 2002).

4.6.2.2.3 Réz-szulfát kezelés

Schnell és mtsai. (1999) nyomán az immunhisztokémiai protokoll elvégzése után, de még a felhúzás előtt 0,05% réz-szulfátot (Cu-SO₄, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) és 0,4% ammónium-acetátot (CH₃COONH₄) tartalmazó pH5 oldatban (desztillált vízben) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Az inkubálás után gyors desztillált vizes öblítés, majd 0,1M PB-ben történő mosás következett.

4.6.2.2.4 Szudán fekete B kezelés

Oliveira és mtsai. (2010) nyomán az immunhisztokémiai protokoll elvégzése és a metszetek felhúzása után, 1 órás száradást követően, a tárgylemezen gyors mosást (0,1M sós foszfát pufferben, később PBS) végeztünk majd 01,% szudán-fekete B (Allied Chemical, New York, NY, USA) oldatban (70%-os alkoholban) inkubáltuk 10 percre szobahőmérsékleten. Az inkubáció után 70%-os alkoholban történő mosással távolítottuk el a felesleges festéket. A kezelés után mosás (0,1M PBS) majd vízbázisú

lefedővel (Fluoro Gel, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), a szudán-fekete B lipid természete miatt, történő lefedés következett.

4.6.2.3 *Alkalmazott fluoreszcens immunhisztokémiai protokoll*

A fluoreszcens adatok a következő állatokból származnak: M, Mo, P, R, T.

20 µm vastag metszetek agyfelszínnel párhuzamosan metszett, az 50 µm vastag fénymikroszkópra szánt metszetekkel alternálva gyűjtött sorozatát vizsgáltuk.

A protokoll a 4.6.2.1-es fejezetben leírtak szerint zajlott a 3. táblázatban felsorolt ellenanyagok használatával. Az autofluoreszcencia csökkentésére a 4.6.2.2.3 fejezetben leírtak szerint réz-szulfát kezelést alkalmaztunk. A metszeteket a mikroszkópos vizsgálatig sötétben +4°C-on tároltuk.

3. táblázat. A fluoreszcens jelöléshez felhasznált ellanyagok felsorolása és azok hígítása.

A listában szereplő primerek és szekunderek kombinációit használtuk.

Primer ellenanyagok	Szekunder ellenanyagok	Egyéb
nyúl anti-CR (1:3000; Swant)	szamár anti-nyúl DyLight405	Streptavidin Alexa488 (1:500;
nyúl anti-SOM (1:3000;	(1:500; Jackson)	Invitrogen)
Peninsula)	szamár anti-kecske Alexa488	Streptavidin Alexa568 (1:500;
nyúl anti-SOM (1:3000; Dr.	(1:500; Life Technologies)	Invitrogen)
Görcs Tamás saját készítménye)	szamár anti-kecske Alexa555	
kecske anti-PV (1:1000, Swant)	(1:500; Life Technologies)	
egér anti-CR (1:1000, Swant)	szamár anti-egér Alexa647	
	(1:500, Life Technologies)	
	szamár anti-egér DyLight649	
	(1:500; Jackson)	

4.7 Sorozatmetszetek térképezése és illesztése

4.7.1 BDA jelölés térképezése

A fénymikroszkópos eredmények a következő állatokból származnak: J, Mc, V (BA3b beadás) és M, Mo, P (BA1 beadás).

A BDA beadás retrográd és anterográd jelölődést eredményezett, ennek térképezését Neurolucida® programmal (MicroBrightField Europe, E.K. Magdeburg, Németország) Olympus mikroszkóppal, amelyhez motorizált tárgyasztal tartozik (MultiControl 2000, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Németország) végeztük. A retrográd térképezést 10x és 20x, az anterográd térképezést 10x, 20x, 40x és 100x-os objektív nagyításon végeztük.

4.7.1.1 *Retrográd jelölődés*

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

4.7.1.2 *Anterográd jelölődés*

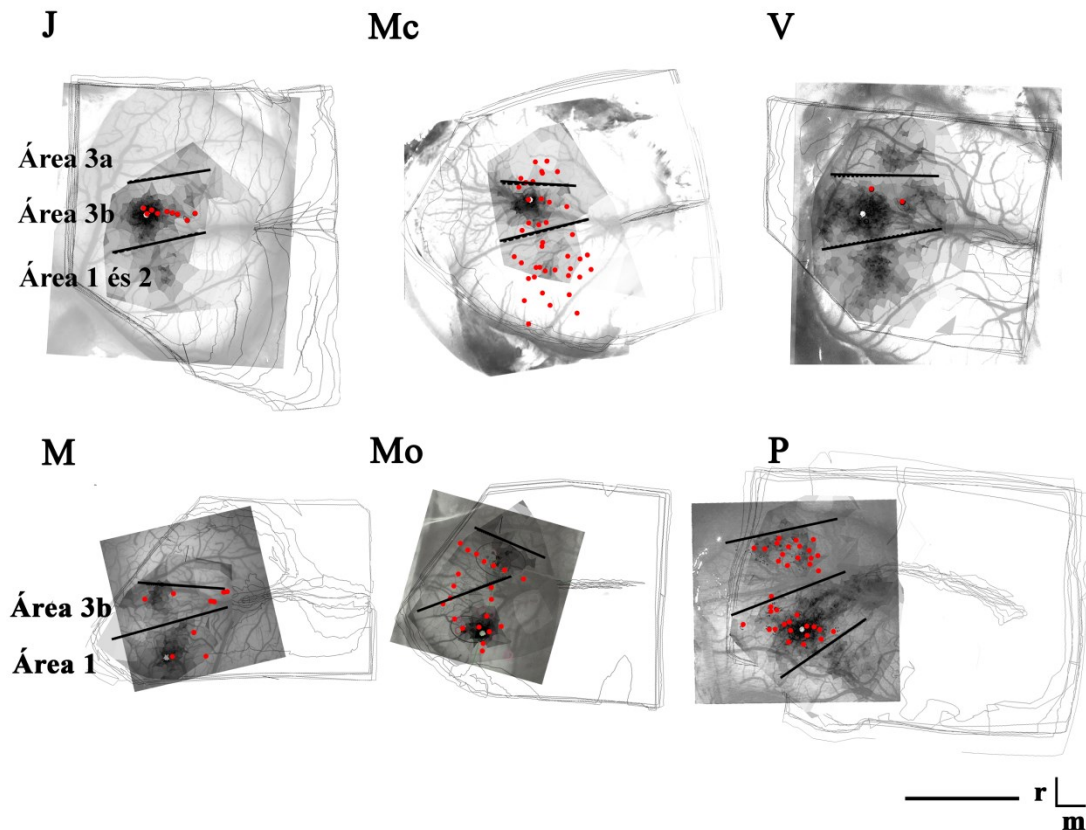
Az anterográd jelölődés esetén háromféle jelet különböztettünk meg. Az egyik esetben a hosszan követhető rostok, a másokban a foltokat alkotó terminális axon arborizációk által jelzett célterületek, ahol az axonok finom ágakra bomlanak és sok bouton-szerű öblösödést képeznek (24. ábra). Körülhatárolásuk viszonylag kis nagyításon (10x, 20x) is elvégezhető.

A harmadik féle jelet a bouton-szerű struktúrák adták, melyeket mintavételezéssel terminális arborizációkon belül, a hosszú rostokon és retrográdan nem jelölődött területeken számoltunk. A mintavételezés 3 egymással határos $50 \mu\text{m}^2$ nagyságú négyzetben belül 100x objektív nagyítással a meszet teljes mélyégében történt. A mintavételi területek meghatározásánál próbáltuk elkerülni az ereket, perikaryonokat és dendritikus nyúlványokat. BA1 beadás esetében 3712 bouton szerű struktúra került feltérképezésre, terminális arborizációban 19, hosszú rostok területén 14, valamint retrográd és anterográd jelölődés mentes területen 4 helyen. BA3b beadás esetében 18624 db bouton szerű struktúra került feltérképezésre, terminális arborizációban 18, hosszú rostok mellett 16, valamint retrográd és anterográd jelölődés mentes területen 15 helyen.

4.7.2 **A sorozatmetszetek illesztése**

A sorozatmetszeteket egy Scopescan nevű szoftverrel 4x-es nagyításon beszkeneltük a motorizált tárgyasztal segítségével. A szoftver a kamerával szinkronizálva a Neurolucida tárgyasztal mozgató rendszerét kihasználva készítette a

képeket, az egyes látóterületek átfedés mértékének meghatározásával egy meghatározott z-síkban. Photoshop képszerkesztő program segítségével a két legfelső metszet horizontális érmintázatát összeillesztettük az IOS és az elektrofiziológiai mérések alatt az ép agyfelszínről készült digitális képekkel (8. ábra).



8. ábra. Az agyfelszínről készített fénykép, az elektrofiziológiai térkép és a retrográd sűrűségterképek (ld. később) összeillesztése a hat esetben.

Felső sor: BA3b beadás, alsó sor: BA1 beadás. A piros pontok egy-egy elektród helyét jelölik. A fekete vonalak az área határokat jelölik. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 5 mm.

Az egymást követő metszetek összeillesztésénél a beadási hely körüli érmintázatot és a metszetek vágott sarkait valamint az elektródák szűrt csatornáit használtuk. A BDA jelölt struktúrák rekonstrukcióját a NeuroLucida program sorozatmetszet rekonstruáló moduljával végeztük, amelynek eredményeként egy illesztett rajzsorozatot kaptunk a jelölés eloszlásáról, így egy síkba hozott sorozatmetszeteket vizsgálhattunk 2D-ben. Végül ezek a NeuroLucida rajzok kerületek

összeillesztésre a felső metszetek segítségével az agyfelszínnel és a funkcionális térképekkel (elektrofiziológia, IOS).

4.8 Adatelemzés

4.8.1 A BDA jelölés területi eloszlásának vizsgálata

A BDA jel területi eloszlásának leírására egy arányszámot vezettünk be a bouton-szerű struktúrák (PB), neuronok (PN) és terminális axon arborizációk (PTA) esetében. Ez az arány megmutatja, hogy a két áréában jelölődött struktúrák hányad része található a BA3b és BA1-ben.

4.8.2 A szupra- és infragranuláris rétegek meghatározása

A szupra- és infragranuláris rétegek elválasztását a különböző méretű piramis sejtek megoszlása és a laterális kapcsolatok (retrográd, anterográd jelölődés) eloszlása valamint a hozzávetőleges mélység alapján végeztük fénymikroszkópos vizsgálattal. Az I-III. rétegben kisebb méretű, az V. rétegben nagyméretű piramis sejtek találhatók. A II-III. rétegben a retrográd és anterográd jelölődés sűrűsége magas, itt található a laterális kapcsolatok nagy része, míg a IV. rétegben kevés, itt a laterális kapcsolatok kis területre szorítkoznak, a mély rétegekben újra nagyobb kiterjedésűek.

Módszertani limitációnak tekinthető, hogy a metszeten a szupra- és infragranuláris rétegek elválasztása pontosan nem lehetséges a tangenciális metszés és a mintavételezés miatt. A határt a IV-V. réteg között húztuk meg.

4.8.2.1 A szupragranuláris rétegekben jelölődött struktúrák aránya

Ezt a paramétert az összeköttetésbenálló területek anatómiai kapcsolatának leírására vezettük be Barone (2000) nyomán. A szupragranuláris rétegekben jelölődött boutonok (SB), neuronok (SN) és terminális arborizációk (STA) értékeit a következő módon számítottuk ki:

$$SB = \frac{I - IV. \text{ réteg boutonjainak száma}}{\text{a vizsgált áréában található boutonok száma}}$$

$$SN = \frac{I - IV. \text{ réteg neuronjainak száma}}{\text{a vizsgált áréában található neuronok száma}}$$

$$STA = \frac{I - IV. \text{réteg terminális arborizációinak száma}}{\text{a vizsgált áréában található terminális arborizációk száma}}$$

4.8.3 A retrográd jel eloszlásának elemzése

A retrográd jel sűrűségterképének elkészítésénél minden esetben a beadási hely körül lévő 300 μm átmérőjű területet (központi régió) kihagytuk az analízisből, mivel itt a jelölőanyag beadása miatt keletkezett sérülések helyén a neuronok direkt módon, transzport nélkül is felvehették a jelölőanyagot.

4.8.3.1 Kernel sűrűség elemzés

A retrográd jel eloszlásának vizsgálatához Gauss- eloszláson alapuló kernel simítást alkalmaztunk. Ez a fajta analízis lehetővé tette, hogy a legsűrűbben jelölődött területeket körülhatároljuk mind a beadási (intra), mind a szomszédos (inter) áréában. A sűrűség térképek a következőképp kerültek kiszámításra: először a neuronok pozíciójára egy átlagos konvolúciót végeztünk a Gauss-típusú kernellel ($\sigma = 280 \mu\text{m}$, terület = $1800 \times 1800 \mu\text{m}^2$), majd ezek után a legnagyobb sűrűségű értékre normalizáltuk az eloszlás értékeit, így lehetővé téve az összehasonlítást az állatok között. A kapott „sűrűségterkép” relatív, a térbeli sűrűség eloszlást mutatja a terület maximális sűrűségéhez képest.

$$D_{\text{map}}(x, y) = \int G(x', y', \sigma) \sum \delta(x_{\text{neuron}_j} - x - x', y_{\text{neuron}_j} - y - y') dx' dy'$$

$$\widehat{D}_{\text{map}} = D_{\text{map}}(x, y) / \left(\max_{x, y} D_{\text{map}}(x, y) \right)$$

A kapott értékeket logaritmáltuk (log) a jobb szemléltethetőség érdekében, így a színskálán kódolt log sűrűség értékek közül a legsűrűbbek $[-0,5 - 0]$, a második legsűrűbb $[-1,5 - -0,5]$ értékek közé esnek és így tovább. Nyolc különböző sűrűségérték került kiszámításra, amelyekből a négy legsűrűbb került be az analízisbe, tehát a legalsó sűrűség log értéke $[-3,5 - -2,5]$ volt (lásd 17. ábra és 18. ábra).

A sűrűségterképek az egész metszetsorozatra, valamint külön a supra- és infragranuláris rétegekre kerültek kiszámításra minden egyes esetben. Minden állatnál, kivéve M, a szomszédos áréában a jelölődés nem érte el a maximális sűrűség értéket. Az összehasonlíthatóság miatt így a mindkét áréában megjelenő legmagasabb sűrűségű,

ekvivalens sűrűségű, területeket hasonlítottuk össze (ld. Mc esetében a kék területek, Mo esetében a zöld területek. 20. ábra). Néhány elemzéshez csak az adott áréára számolt sűrűségterképeket használtuk fel, habár fontos megemlíteni, hogy a nagy intra- és interárealis különbségek miatt az áréák külön elemzése felülbecsli a szomszédos áréában lévő legsűrűbb terület méretét, viszont sokkal részletesebb képet ad az áréán belüli sűrűség eloszlásról. A kernel sűrűség térképeken (később kernel-térkép) az átlagos feret méret és terület nagyság MATLAB programmal és ImageJ programmal mértük.

4.8.3.2 *A legsűrűbben jelölődött területeinek méretének és az IOS mérés során aktiválódott területek méretének viszonya*

A kernel-térkép az adott áréában legsűrűbben jelölődött terület/IOS mérés során aktiválódott terület (később IOS-terület) arány képzésével vizsgáltuk meg a retrográd jelölődés és az IOS aktivitás mértének viszonyát.

4.8.3.3 *Sűrűség alapú térbeli klaszterelemzés*

Ezzel a módszerrel (DBSCAN, <https://en.wikipedia.org/wiki/DBSCAN>, Ester és mtsai., 1996) vizsgáltuk a retrográdan jelölődött neuronok kompartmentalizációját a két áréában a beadások után, a klaszterméret eloszlásra és variabilitásra fókuszálva. A legkisebb hosszúsági paraméter meghatározásához először a pont és egy adott számú (esetünkben 3) legközelebbi szomszédja közötti távolságot határoztuk meg, minimális értéként. A hosszparaméter alapján azokat a pontokat tekintjük egy klaszterbe tartozóknak, akik köré rajzolt a hosszparaméter által megadott átmérőjű körök átfednek (9. ábra).

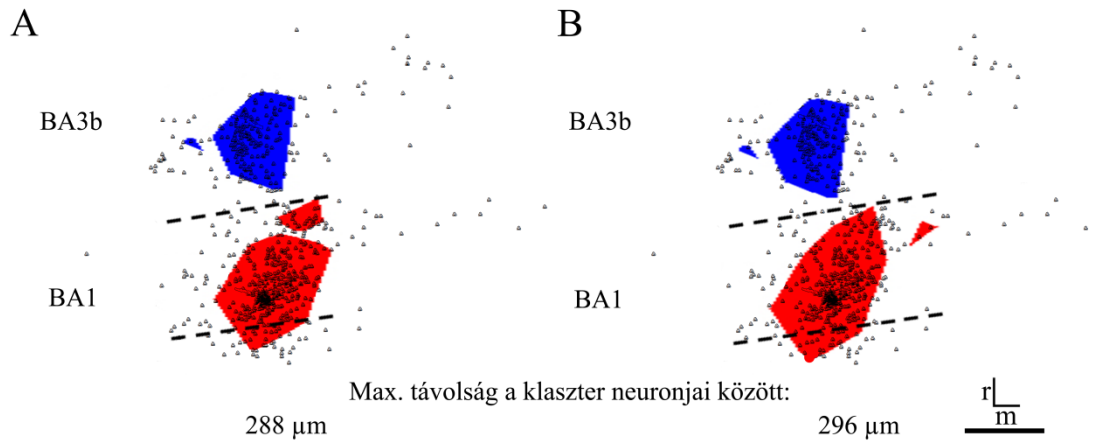
A legkisebb hossz paraméter 8 μm volt és fokozatosan emelkedett 700 μm -ig. A klaszterek száma, mérete és méretük eloszlása került elemzésre a hossz paraméter függvényében. Az eloszlás variabilitásának meghatározásához az egyes hosszúsághoz tartozó entrópia került kiszámításra. Az adott méretű klaszterek számát N_s írja le, tehát az esélye, hogy egy random választott klaszter j klaszter mérettel rendelkezik:

$$P(s) = N_s / \sum_k N_k$$

Az entrópia ebből a valószínűségből került kiszámításra:

$$H = - \sum (p * \log_2(p))$$

A beadásonkénti három eset mediánját külön intra- és interareánkét jelenítettük meg.

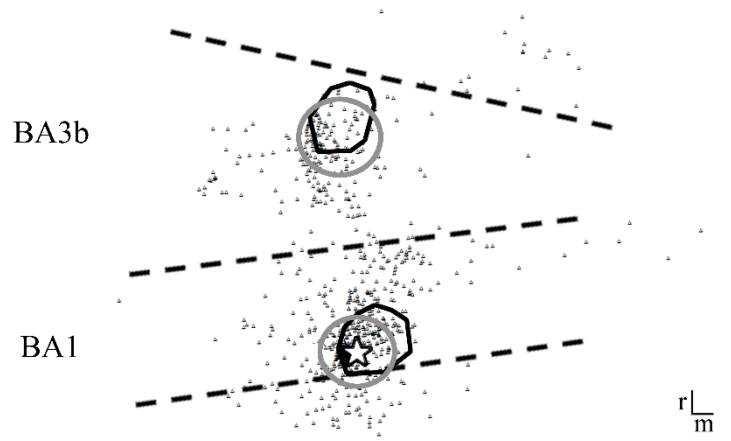


9. ábra. A DBSCAN módszer bemutatása az eredményeken keresztül.

A retrográdan jelölődött neuronok (fekete pontok) által alkotott klaszterek BA1 beadás után különböző hosszparaméterrel. A szaggatott vonalak az área határokat jelzik, a kék területek a BA3b-ben található, a piros területek a BA1-ben található klasztereket jelentik. BA1 beadás esetében nagy sejtek közötti távolság esetében találunk klasztereket BA3b-ben is. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 1mm.

4.8.3.4 A retrográd jelölődés és az IOS mérés során aktiválódott területek kapcsolata

A 4.7.2. fejezetben leírt módszert használtuk arra, hogy a retrográd térképeket és az IOS térképet összeillesszük. A NeuroLucida program segítségével az IOS-sal aktívnak mért területeket rárajzoltuk a retrográd térképre, így a Neuroexplorer programmal meghatározhattuk az ezen a területen belül található neuronok számát. V esetében BA1-ben nem volt mérhető IOS jel, így ebben az esetben egy átlagolt értékkel számoltunk Friedman és mtsai. (2008) alapján.



10. ábra. A centralizált IOS értékek mérése egy BA1 beadás példáján.

A retrográdan jelölődött neuronok (fekete háromszögek) térképével összeillesztett IOS-területek (fekete kontúr) és a centralizált IOS-területek (szürke körök). Figyeljük meg, hogy a beadási hely az IOS-terület szélére esik, viszont a centralizált IOS-területnek a közepére. Fehér csillag: beadási hely, szaggatott vonal: áreahatár. r : rostrális, m : mediális. Méretvonal: 1 mm.

Az abból fakadó hibát, hogy a beadást nem minden esetben az IOS-terület közepére sikerült pozicionálni (lásd 15. ábra) az IOS aktiválta területet egy az átmérőjének megfelelő nagyságú körrel helyettesítettük és úgy pozicionáltuk, hogy annak közepe a beadási hely legyen (10. ábra). Ezt az egyszerűsítést a szomszédos áréában is elvégeztük, itt a legsűrűbb retrográd jelölés tömegközéppontja volt a középpont. Az így kapott értékek „centralizált IOS”-ként kerülnek megbeszélésre.

4.8.4 Az anterográd jel eloszlásának elemzése

Az anterográd jel eloszlásának vizsgálatakor a terminális arborizációkat, az injektált kérgi terület specifikus célterületeit, elemeztük az eloszlás alapján áréanként. Az egyedülálló terminális arborizációkat kihagytuk az elemzésből (kivéve: 4.8.4.1 fejezet), csak a terminális arborizáció-csoportokat vizsgáltuk, ahol több, mint egy metszeten (tehát több mélységben) ugyanazon a helyen oszlop-szerűen jelentek meg.

4.8.4.1 *A terminális arborizációk tömegközéppontja*

A további elemzésekhez az MATLAB programmal meghatároztuk a terminális arborizációk tömegközéppontját, mind az egyedülálló, mind a terminális arborizáció csoportok esetében.

4.8.4.2 *A terminális arborizáció csoportok mérete*

Miután a NeuroLucida program segítségével körülhatároltuk a terminális arborizáció csoportokat a Neuroexplorer programmal meghatároztuk a méretüket.

4.8.4.3 *A terminális arborizáció csoportok laterális eloszlása*

A beadási áréán belül a terminális arborizáció csoportok tömegközéppontjának távolságát a beadási helytől, a szomszédos áréában pedig a retrográdan legsűrűbben jelölődött terület tömegközéppontjától a kernel sűrűségterképen. Megjegyzendő, hogy a kernel sűrűségterkép legsűrűbb területének tömegközéppontja egybeesik az injektált ujjbegy funkcionális reprezentációjával a homotóp áréában.

4.8.4.4 *A terminális arborizáció csoportok szórtsága*

Neuroexplorer program segítségével a terminális arborizáció csoportok tömegközéppontjainak helyzete alapján meghatároztuk a legközelebbi szomszéd átlagos távolságát (a program csak a legközelebbi szomszéd távolságát veszi figyelembe) (11A ábra).

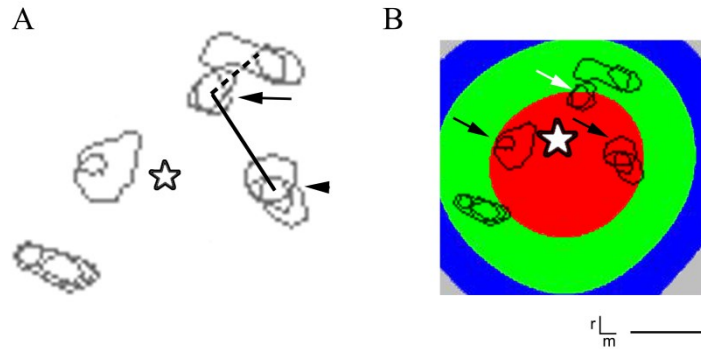
4.8.4.5 *A terminális arborizáció csoportok mérete és az IOS mérés során aktiválódott területek méretének viszonya*

A terminális arborizáció csoport terület/IOS-terület arány képzésével vizsgáltuk meg az anterográd jelölődés és az IOS eredmények viszonyát.

4.8.4.6 *A retrográd jelölődés és a terminális arborizáció csoportok térbeli eloszlása közötti kapcsolat*

A retrográd és anterográd jelölődés térképeinek egymásra illesztésével vizsgáltuk. A kernel térképen meghatároztuk, hogy az egyes csoportok melyik sűrűsége esnek. Abban az esetben, ha egy csoport 2 sűrűségzóna határára esett, akkor fele-fele arányban számoltuk a két zónához az adott csoportot. A jobb összehasonlíthatóság miatt az adott áréában rangsoroltuk a sűrűség intervallumokat, mindig az a sűrűség kapta az

első rangot, amely először mutatott átfedést terminális arborizáció csoporttal (pl.: ha a legsűrűbb retrográdan jelölődött zónában nem volt átfedés, majd a második legsűrűbb zónában igen, akkor a második legsűrűbben jelölődött zóna kapta az első rangot, a többi sűrűségzóna ezt követte függetlenül a sűrűség szomszédságtól)(11B ábra).



11. ábra. A terminális arborizáció csoportok laterális eloszlásának mérése egy BA3b beadás példáján.

(A) A legközelebbi szomszéd távolságának meghatározása. A fekete nyílhoz tartozó terminális arborizáció csoport legközelebbi szomszédját a szaggatott vonal jelzi, a fekete nyílhegyhez tartozó terminális arborizáció csoport legközelebbi szomszédját a fekete vonal jelzi. (B) A kernel sűrűségkép és a terminális arborizáció csoportok viszonya. A fekete nyilak a legmagasabb ranghoz tartozó csoportokat jelölik, a fehér nyíl az első és második ranghoz is tartozó csoportot jelöl. Fehér csillag: beadási hely, szaggatott vonal: áreahatár. *r*: rostrális, *m*: mediális. Méretvonal: 125 μm (A), 250 μm (B).

4.8.5 Az összeköttetések által reprezentált bőrfelület mérete

Az agykérgi nagyítási faktort (CMF) úgy kapjuk meg, hogy az agykérgi területet, amelyen a vizsgált bőrfelület leképeződik, esetünkben az ujjbegy ingerelt területe, elosztjuk a reprezentált bőrfelület területével (Friedman és mtsai. 2008; Barone és mtsai. 2000):

$$CMF = \frac{\text{agykérgi terület}}{\text{a reprezentált testfelszín területe}}$$

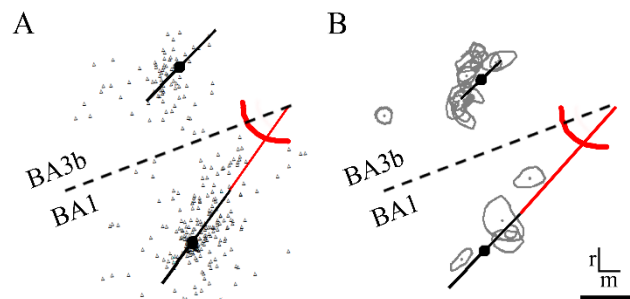
Ez az érték Friedman és mtsai. (2008) munkája alapján BA3b-ben nagyobbnak adódott (BA3b: CMF=0,16), mint BA1-ben (BA1: CMF=0,06). Tanulmányunkban a reprezentált testfelszín területét a retrográd és anterográd jelölődés esetében is kiszámítottuk.

A retrográd jelölődés esetében a kernel sűrűségterképen legsűrűbben jelölődött és ekvivalens sűrűségű területek méretét osztottuk el az adott áréához tartozó már publikált CMF értékkel (Friedman és mtsai. 2008).

Az anterográd jelölődés esetében a terminális arborizáció csoportok méretét és laterális kiterjedését osztottuk el az adott áréához tartozó már publikált CMF értékkel (Friedman és mtsai. 2008).

4.8.6 Az összeköttetések anizotrópiájának mérése

Az anizotrópiát Sincich és Blasdel (2001) nyomán számítottuk ki külön az injektált és a szomszédos áréára. Röviden összefoglalva ez a mérés azt az átlag vektort adja meg, amely a neuronok (12A ábra) vagy az egyedülálló terminális arborizációk és a beadási hely (12B ábra), valamint a homotóp áréában a kernel sűrűségterképen legsűrűbben jelölt terület tömegközéppontja közti sugár határoz meg (12B ábra). A vektor hossza megadja az eloszlás ellipticitását, amíg az áreahatárral bezárt szöge az elterjedés fő irányát mutatja. Az anizotrópia értéke (r_n) 0 abban az esetben, amikor a jelölődött struktúrák szimmetrikusan, kör alakban, helyezkednek el a központ körül és 1, ha egy vonalban helyezkednek el.



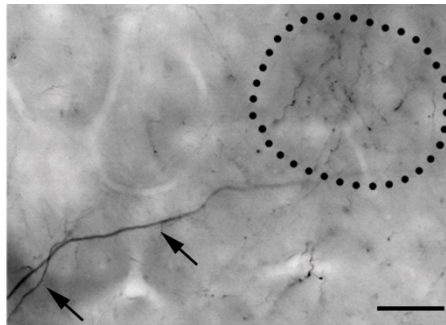
12. ábra. Az anizotrópia vektorok és szögek a retrográd és anterográd jelölődés esetében.

Az anizotrópia vektor (r_n , fekete vonal ponttal a közepén) és szög (piros vonal és az áreahatár között) a retrográd (A) és az anterográd (B) jelölődés esetén egy-egy példán szemléltetve M esetében BAI beadás után. r_n neuron: BA3b: 0,42, BAI: 0,4. r_n TA: BA3b: 0,46, BAI: 0,86. Anizotrópia szög neuron: BA3b: 32°, BAI: 42°. Anizotrópia szög TA: BA3b: 36°, BAI: 38°. A fekete háromszögek a neuronokat jelölik (A). A szürke kontúrok a terminális arborizációkat jelölik, a bennük található pontok az adott terminális arborizáció tömegközéppontját jelölik (B). A szaggatott vonalak az áreahatárokat jelölik. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 500 μ m.

Az anizotrópia vektor szögét az BA3b és BA1 közötti határvonalhoz viszonyítva adtuk meg, mert ez a tenyér reprezentációján keresztül fut, így az ujjbegyek reprezentációjához viszonyítva is keresztül fut. A méréseket NeuroLucida Explorer, ImageJ és/vagy MATLAB segítségével végeztük.

4.8.7 A vastag axonok térképezése

A BDA jelölt horizontálisan futó vastag axonok viszonylag egyenes lefutást mutattak (13. ábra).



13. ábra. A BDA-jelölt vastag és egyenes lefutású rostok.

A vastag és egyenes lefutású feltételezhetően mielinizált axon (fekete nyilak) fénymikroszkópos képe. A pontozott körvonal egy terminális axon arborizációt határol. Méretvonal: 25 μ m.

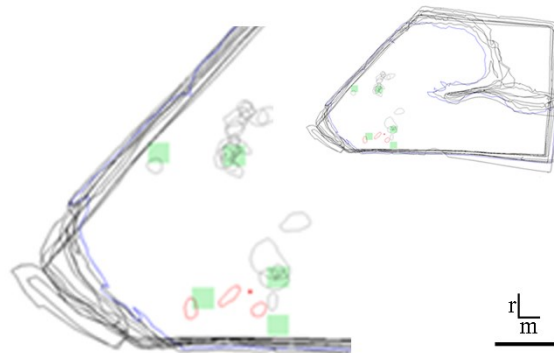
Ezeket a típusú axonokat külön térképeztük a NeuroLucida segítségével, majd a NeuroLucida Explorer programmal polar plotokat készítettünk. Az egyes esetek polar plotjait beadások szerint egymásra illesztettük különböző fix pontok segítségével. Így ezzel a módszerrel meghatározhattuk az ilyen típusú axonok irányultságát. A térképezés befejezése után kiválasztott területek kivágásra kerültek a metszetből és további elektronmikroszkópos módszerrel megvizsgáltuk ezen axonoknak a mielinnel való borítottságát.

4.8.8 Gátló interneuronok bemeneteinek elemzése

A fluoreszcens képeket a freiburgi Alberts Ludwigs Universität Zentrum für Biosystemanalyse Life Imaging Centerében kétfajta, azonos felszereltségű, lézer scanning konfokális mikroszkóppal készítettük. Az LSM U2 és az LSM Duo Live (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Németország) mikroszkópokon futó Zen 2010 és 2011-es programokhoz írt házi fejlesztésű, publikálásra nem került a LIC tulajdonát képező

programmal (Macro 1.1) készítettünk a metszetek különböző pontjain z-stackeket 100x-os objektívvel.

A megvizsgálendő régiók kijelölését az anterográd jelölődés feltérképezése után végeztük, a beadási hely közelében valamint a hosszú rostok elvégződésénél, vagy ilyen rostok hiányában a szomszédos áréának egy kijelölt területén, az itt lévő terminális arborizációkon belül (14. ábra). A vizsgálatra kijelölt teületeken 3x3 vagy 4x4 négyzetet jelöltünk ki a terminális arborizáció méretétől függően. Egy négyzet nagysága 100x100 μm volt, a voxelméret pedig 0,09x0,09x0,5 μm . Az egymást követő metszeten olykor különbözőképpen kellett elhelyezni a négyzeteket, hogy minden esetben egy terminális arborizáción belül vizsgálódjunk. A z-stack vastagsága megfelelt a metszet vastagságának.



14. ábra. A célterületek kijelölése M esetében.

Az összeillesztett sorozatmetszeten kék vonal jelöli az aktuális metszetet és azon pirossal láthatók a metszeten feltérképezett terminális arborizációk. A fekete körvonalak a sorozat többi metszetének szélét jelölik, a szürke körök pedig az ezekhez tartozó terminális arborizációkat. A beadási helyet piros pont jelöli. A zöld területek jelentik azokat a helyeket, ahol z-stackeket készítettünk. A kis képen az egész metszetsorozat látható. r: rosztális, m: mediális. Méretvonal: 1 mm, kis kép 250 μm .

Bouton szerű képleteket és azok lehetséges kapcsolatait GABAerg interneuronokkal a következő áréákban vizsgáltuk: BA3b, BA3a, BA1 és M1. A BA1 beadás esetén (M, Mo, P) a bouton szerű struktúrákat 150 régióban (intra-área: 73, inter-área: 77), BA3a beadás után (R, T) pedig 31 régióban (intra-área: 16, inter-área: 15) vizsgáltuk.

A képek elemzését a NeuroLucida program Virtual Tissue moduljával (MicroBrightField Europe, E.K. Magdeburg, Németország) végeztük. Megjelöltük az anterográd boutonokat valamint a sejttesten képzett kontaktus esetében magát a sejttestet, nyúlványon található kontaktus esetében pedig a nyúlványt. Kontaktusnak vettünk minden olyan bouton-sejttest és bouton-nyúlvány kapcsolatot, ahol nem volt fekete pixel a struktúrák között.

4.8.9 Statisztikai elemzés

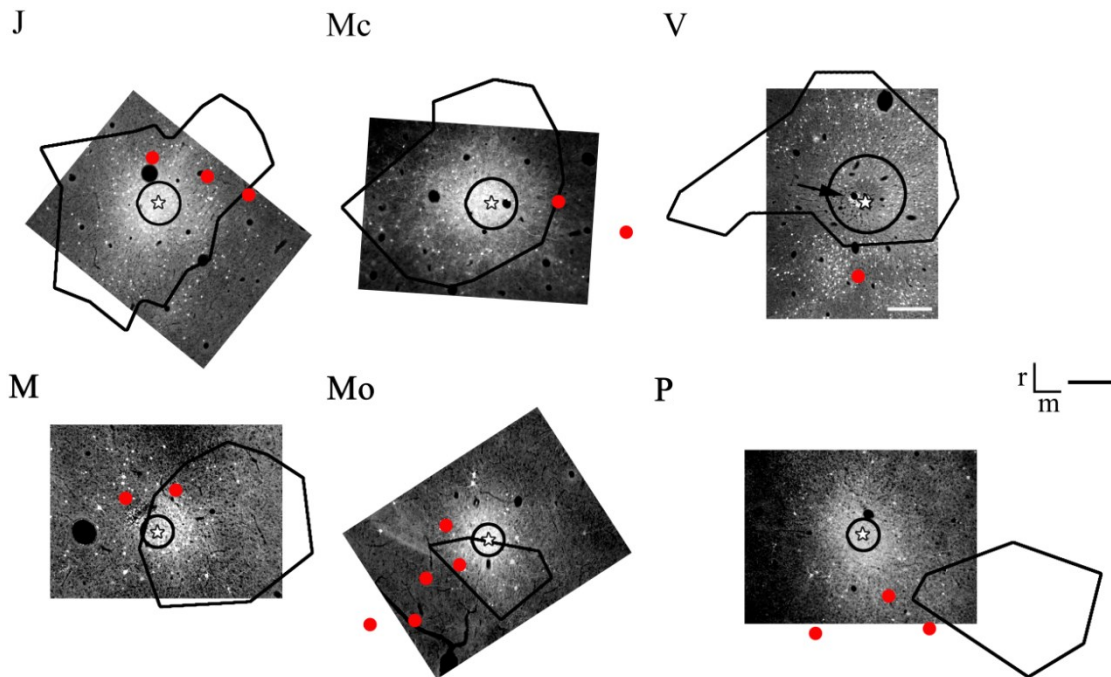
Az adatelemzés során f-tesztet, egyszélű kétmintás, párosított t-próbát és kétutas ismétléses ANOVA-t használtunk az MS Excelben. Mivel a retrográd és anterográd jelölődés eloszlásainak nagy értékeire fókuszáltunk, így egyszélű kétmintás t-tesztet alkalmaztunk.

5 Eredmények

5.1 Beadási hely

BA3b és BA1 beadás három-három állat esetében történt. BA3b: J, Mc, V. BA1: M, Mo, P.

A beadások mind a 6 esetben a középső és a szupragranuláris rétegekre lokalizálódtak és a központi régiók nagyjából azonos méretűek voltak: kb. 250 μm átmérő (1. táblázat, 15. ábra).



15. ábra. Beadási helyek sötét látóteres képe a hat majomban.

A beadási helyet fehér csillag jelöli, a körülötte található kör az „udvar” régiót jelöli. A fekete kontúrok az IOS-területet jelzik. A piros pontok az injektált ujjbegyhez tartozó elektrofiziológias mérőpontokat jelölik (a beadási helyek is elektrofiziológiai mérőpontok). V esetében a fekete nyíl a szövetroncsolást jelzi a beadási hely mellett. Felső sor: BA3b beadás, alsó sor: BA1 beadás. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 250 μm .

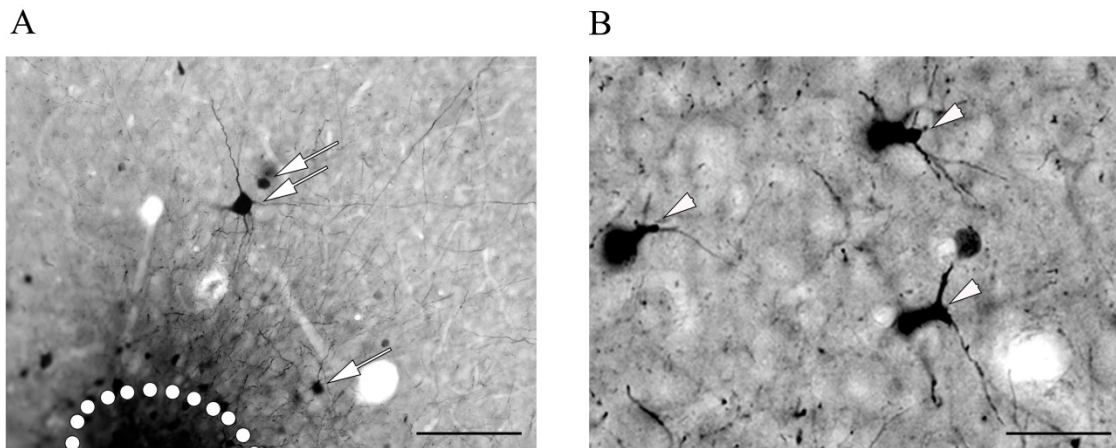
Egy eset kivételével megfigyelhetünk egy központi régiót és a körülötte lévő denz plexusokkal teli „udvart”. Központi régióként definiáltuk azt a területet, ahol csak erősen jelölődött neuronokat találtunk, amelyeknek jele elnyomta a nyúlványokat. Az

udvar régió is tartalmaz BDA jelölt perikarionokat és itt már a nyúlványok is kivehetőek. V beadási helyén a központi régió és az udvar egybeolvadt a hosszú túlélési idő miatt, és egy viszonylag nagy szűrt csatorna látható a beadási hely közepén (15. ábra). Lokális szövetkárosodás is látható a beadási hely mellett, amely egy kis területen a beadási hely körül valószínűleg megakadályozta a BDA transzportját retrográd és anterográd irányban is (15. ábra). A sérülést és az elektród helyének károsodását vérzés okozhatta. Ebben az esetben az agy pulzálása meglehetősen nagy volt a műtét alatt.

5.2 A retrográd jelölődés

5.2.1 A retrográd jelölődés általános leírása

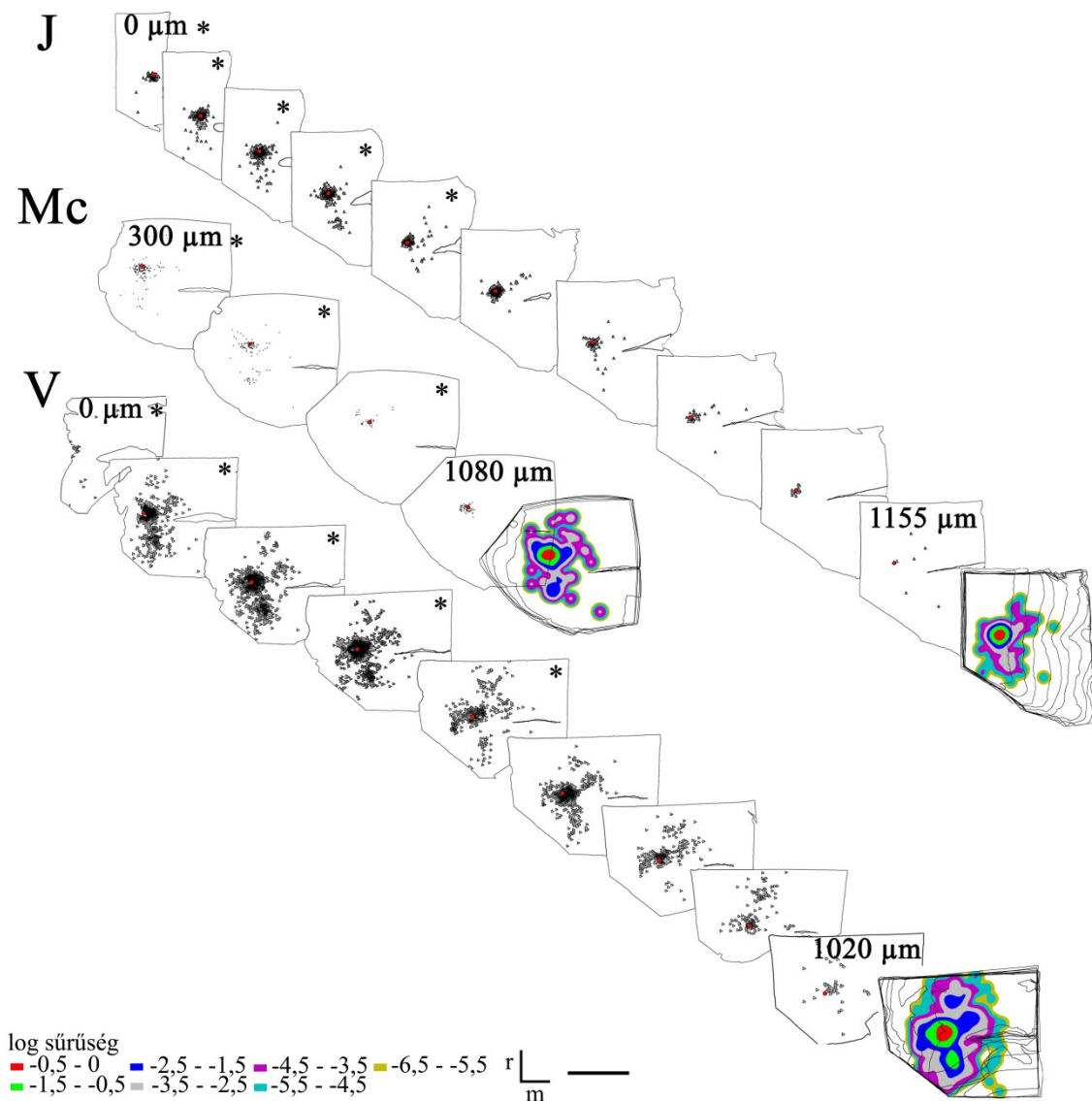
A retrográd jelölődött neuronok többsége piramissejt, sűrűn elágazódó tüskés dendritjeik és apikális dendritjük van (16. ábra). Néhány „sima”, tüske nélküli dendrittel rendelkező, feltehetőleg gátló intereuron is látható a beadási hely körül.



16. ábra. Retrográdan jelölődött neuronok.

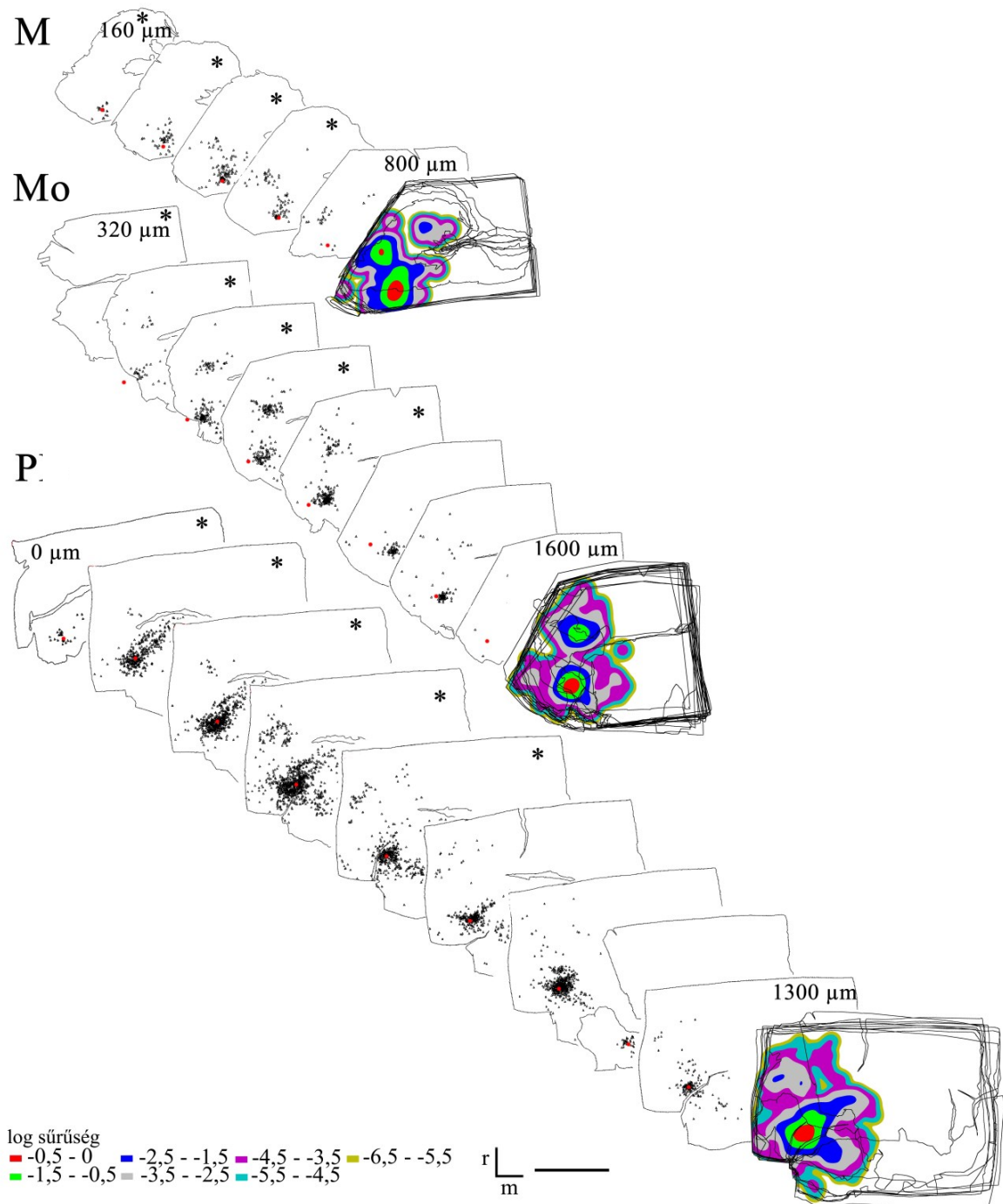
(A) A beadási hely és az annak környékén jelölődött neuronok (fehér nyilak). A fehér pontozott kontúr a beadási hely „központi régióját” határolja. (B) Piramissejtek nagyobb nagyításon. A fehér nyílhegyek az apikális dendrit átmetszeteket jelölik. Méretvonal: 125 μm (A), 50 μm (B).

BDA-jelölt sejtestek a kortikális régióban nagy területen megfigyelhetők (17. ábra, 18. ábra).



17. ábra. Retrográd jelölődés rekonstrukciója sorozatmetszeteken BA3b beadás esetén és a retrográd jelölődésből számított kernel-térképek (a metszetek egy síkban történő ábrázolásával).

Minden fekete pont egy BDA jelölődött sejttestet jelent. A piros pontok a beadási helyeket jelölik. A csillaggal jelölt metszetek a szupragranuláris rétegeket jelölik. Színskála: a retrográd jelölődés sűrűségének logaritmált értékei. *r*: rostrális, *m*: mediális. Méretvonal: 5mm.



18. ábra. Retrográd jelölődés rekonstrukciója sorozatmetszeteken BAI beadás esetén és a retrográd jelölődésből számított kernel-térképek (a metszetek egy síkban történő ábrázolásával).

Minden fekete pont egy BDA jelölődött sejtestet jelent. A piros pontok a beadási helyeket jelölik. A csillaggal jelölt metszetek a szupragranuláris réteget jelölik. Színskála: a retrográd jelölődés sűrűségének logaritmált értékei. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 5mm.

A BDA jelölés mintázatában van némi különbség az esetek között, amely feltehetően az eltérő transzportálási időnek tulajdonítható.

A retrográdan jelölt neuronok eloszlása ugyanaz volt mind a hat esetben (17. ábra, 18. ábra). BA3b beadás esetén a legtöbb jel V-nél található, ezt követi J, majd Mc. A legnagyobb eltérés a jelölt neuronok számában V és J, Mc között van. J-ben és Mc-ben a BDA jelölt neuronok száma nem különbözik jelentősen, ami azt jelenti, hogy a pályajelölő anyag transzportidején kívüli tényező, például a beinjektált BDA mennyisége játszhat szerepet a különbségek létrejöttében (17. ábra). BA1 beadás esetén a legtöbb jel P-nél található, ezt követi Mo, majd M (18. ábra).

5.2.2 A retrográd jelölődés réteg- és laterális irányú eloszlása

A retrográd jelölődés (17. ábra, 18. ábra) elemzését az egymáshoz illesztett sorozatmetszetek 2D-s képén végeztük. A retrográdan jelölődött neuronok rétegi és laterális eloszlását arányszámokkal vizsgáltuk. Meghatároztuk az egyes beadások esetén az adott áréában jelölődött neuronok arányát a két áréában összesen jelölődöttekéhez képest (PN érték, 4. táblázat), valamint a szupragranuláris rétegekben jelölődött neuronok arányát az egyes áréákban összesen jelölődött neuronokéhoz képest (SN érték, 4. táblázat).

4. táblázat

A BDA jelölt perikarionok területi és réteg eloszlása (átlag±szórás).

PN: jelölődött neuronok aránya az áréában, SN: szupragranulárisan jelölődött neuronok aránya.

A csillagok a szignifikánsan nagyobb intra- vagy interáreális értéket jelzik (*: $p < 0,005$). Az összehasonlításra egyszélű, kétmintás, párosított t-tesztet alkalmaztunk.**

Injektált áréa	Áréa 3b beadás		Áréa 1 beadás	
Vizsgált áréa	Áréa 1	Áréa 3b	Áréa 1	Áréa 3b
PN	0,10±0,08	0,90±0,08***	0,83±0,11***	0,17±0,11
SN	0,93±0,06***	0,77±0,05	0,81±0,16	0,84±0,08

A neuronok mindkét beadás esetén az injektált áréában jelölődtek szignifikánsan magasabb számban (egyszélű, kétmintás, párosított t -test: BA3b beadás $p=0,0001$, BA1 beadás $p=0,0008$).

A rétegi eloszlás elemzésénél BA3b beadás után találtunk szignifikánsan nagyobb SN értékeket interaréálisan, tehát BA1-ben (egyszélű, kétmintás, párosított t -test, $p=0,002$). BA1 injektálás után nincs szignifikáns különbség a két área között a rétegi eloszlásban.

5.2.3 A retrográd jelölődés és az IOS mérés során aktiválódott területek aránya

Először az IOS-területen belül jelölődött neuronok számát határoztuk meg, majd ezek arányát az adott áréában jelölődött neuronokhoz képest (5. táblázat). Meg kell jegyezni, hogy a retrográdan legsűrűbben jelölt területek nem minden esetben estek teljesen egybe az IOS-területekkel valószínűleg azért, mert a beadást nem minden esetben sikerült az aktivált terület közepére helyezni. Emiatt ezek a százalékok valószínűleg alábecsülik a valós értékeket. Ezt ellensúlyozandó az értékeket újrámértük (lásd: 4.8.3.4 fejezet).

5. táblázat. Az IOS-területen belül jelölődött neuronok aránya.

A számok átlag \pm szórást jelentenek. Centralizált IOS: az IOS mérés során aktiválódott terület kontúrját úgy csúsztattuk el az ábrákon, hogy a beadási hely, vagy a szomszédos áréában a legsűrűbben jelölődött terület a kontúr közepére essen (lásd: 4.8.3.4 fejezet). A csillagok a szignifikánsan nagyobb intra- vagy interaréális értéket jelzik (*: $0,05 > p > -0,01$). Az összehasonlításra egyszélű, kétmintás, párosított t -tesztet alkalmaztunk.

Injektált área	Área 3b beadás		Área 1 beadás	
Vizsgált área	Área 1	Área 3b	Área 1	Área 3b
IOS	0,25 \pm 0,18	0,72 \pm 0,34	0,21 \pm 0,17	0,40 \pm 0,14
Centralizált IOS	0,21 \pm 0,08	0,71 \pm 0,17*	0,56 \pm 0,38	0,59 \pm 0,08

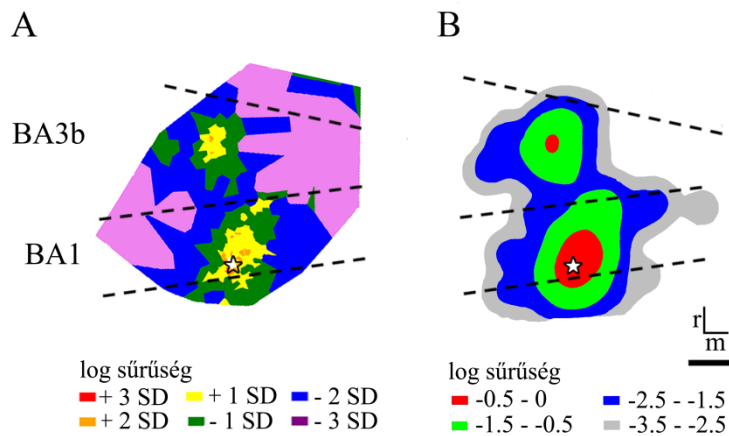
Mindkét arány esetében BA3b-ben találjuk a nagyobb retrográd jelölődést, de ez csak a centralizált IOS arány esetében szignifikánsan nagyobb (egyszélű, kétmintás, párosított t -test, $p=0,02$)(5. táblázat). A centralizált mérésnél BA1 beadás után a két

áreában hasonló arányokat kaptunk. Ennek magyarázata, hogy M esetében a beadási áreában található összes neuron a centralizált IOS-területére esett.

5.2.4 A retrográd jelölődés sűrűség eloszlása

Az elsőként elkészített neuronspecifikus Voronoi sűrűségterképeken (19A ábra) a különböző sűrűségű területek körülhatárolása a foltos eloszlás miatt nem volt kivitelezhető, így a retrográd jelölődésből egy másik módszerrel kernel sűrűségterképeket kerültek kiszámításra (4.8.3.1 fejezet, 19B ábra).

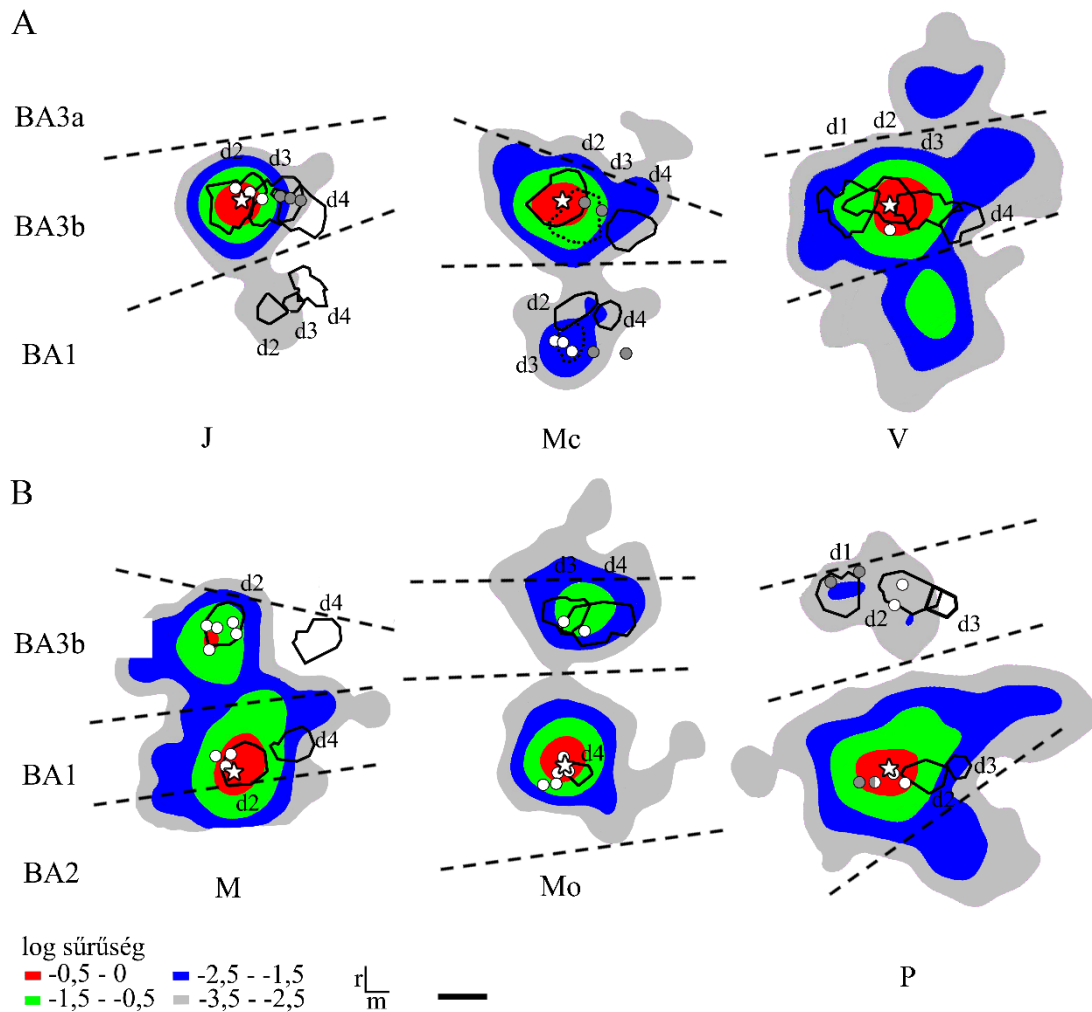
A beadási hely körül jelölődő neuronok eloszlása Gauss-jellegű (Barone és mtsai. 2000; Buzás és mtsai. 2006). Ehhez hasonló eloszlást mutatnak a távoli, áreák közötti kapcsolatokért felelős neuron csoportok (Barone és mtsai. 2000).



19. ábra. A Voronoi és kernel sűrűségterképek összehasonlítása.

A Voronoi (A) és kernel (B) sűrűségterképek egy BA1 beadás példáján. Figyeljük meg, hogy a kernel sűrűségterképeken a különböző retrográd jelölődés sűrűségű területek könnyen körülhatárolhatóak, míg ez a Voronoi sűrűségterképek esetében nem mondható el (narancssárga és sárga területek). Szaggatott vonal: áreák feltételezett határai. Fehér csillag: beadási hely. Színskála (Voronoi): a retrográd jelölődés sűrűségének az átlagtól való szórás egységenkénti logaritmált eltérése. Színskála (kernel): a retrográd jelölődés sűrűségének logaritmált értékei. r : rostrális, m : mediális. Méretvonal: 1 mm.

A retrográd jelölődés Gauss-eloszlásra alkalmazható kernel simításával megkaptuk a kernel sűrűségterképeket (20. ábra).



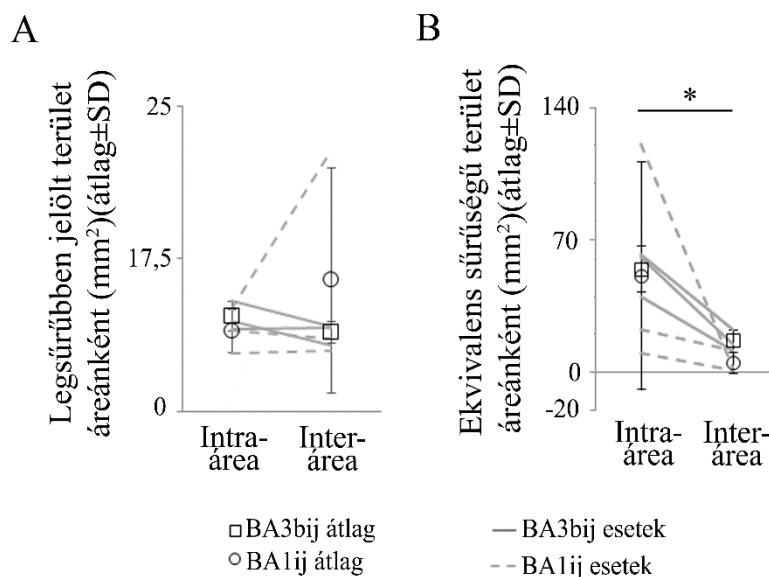
20. ábra. Retrográd jelölődött neuronok kernel-sűrűségterképe BA3b (A) és BA1 beadás (B) esetén az injektált ujjak reprezentációinak elektrofiziológiai mérőpontjaival (fehér és szürke pontok) és IOS-területeivel (fekete kontúr) összeillesztve.

A különböző színek a négy legsűrűbben jelölődött területet mutatják. Szaggatott vonal: areák feltételezett határai. Fehér csillag: beadási hely. Fehér és szürke pontok: elektródák helyei. Színskála: a retrográd jelölődés sűrűségének logaritmált értékei. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 1mm.

A sűrűségterképeken megfigyelhető, hogy nem csak a beadási áréában találunk sűrűn jelölődött területeket viszont BA1 beadás után BA3b-ben relatív nagyobb sűrűségű területeket kaptunk, mint BA3b beadás után BA1-ben. BA1 beadás után M esetében a maximálisan legsűrűbben jelölt terület a szomszédos áréában is megjelenik (piros terület). Mo és P esetében ezt a sűrűséget már nem éri el a szomszédos áréában található területek (zöld és kék területek). BA3b beadás után BA1-ben Mc (kék terület) és V (zöld terület) esetében találunk kiemelkedően sűrűn jelölődött területeket, J esetében ez nem olyan magas (szürke terület). Mc és V esetében BA3a-ban is találunk egy sűrűn jelölődött területet (szürke illetve kék terület).

5.2.4.1 A retrográdan legsűrűbben jelölődött területek mérete

A retrográdan legsűrűbben jelölődött területek méretét kétféleképpen is kiszámoltuk (21. ábra).



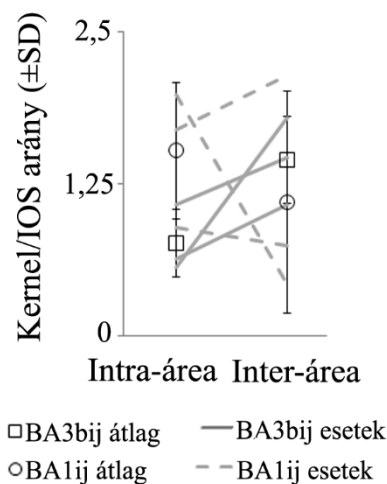
21. ábra. A retrográdan legsűrűbben jelölt terület mérete intra- és inter-árákra külön számolt esetben (A) valamint a retrográdan legsűrűbben jelölt ekvivalens területek mérete (B).

Az egyik esetben mindkét áréára függetlenül számítottuk ki a retrográdan legsűrűbben jelölt területek méretét (21A ábra). A területek méretei között nem találunk szignifikáns különbséget. BA1 beadás esetében a szomszédos áréában kapott nagy szórást PB kiugró értéke okozza.

A BA3b-ben megjelenő nagyobb neuronsűrűsége a kernel-térkép érzéketlen, így a relatív laterális kiterjedéseket jobban mutatja a mindkét áréában megjelenő legnagyobb sűrűségű ekvivalens területek mérete, így azokat hasonlítottuk össze együttes mérésükkel (pl.: Mc esetén a kék területek, Mo esetén a zöld területek)(20. ábra, 21B ábra). A két beadást együtt vizsgálva az intraárealis értékek szignifikánsan nagyobbak (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,02$). BA3b beadás esetében az injektált áréában található terület szignifikánsan nagyobb, mint a szomszédos área azonos sűrűségű területe (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,008$)(21B ábra). BA1 beadás után mindkét vizsgált áréában nagy szórást figyelhetünk meg. Ennek oka a beadási áréában PB (kék terület), a szomszédos áréában Mo (zöld terület) kiugró értéke.

5.2.4.2 A legsűrűbben jelölt területek és az IOS mérés során aktiválódott területek aránya

A legsűrűbben jelölődött kernel área méretének és az IOS-terület méretének aránya a 22. ábrán látható.



22. ábra. A kernel sűrűségterkép áréanként legsűrűbben jelölődött területei és az IOS-területek aránya.

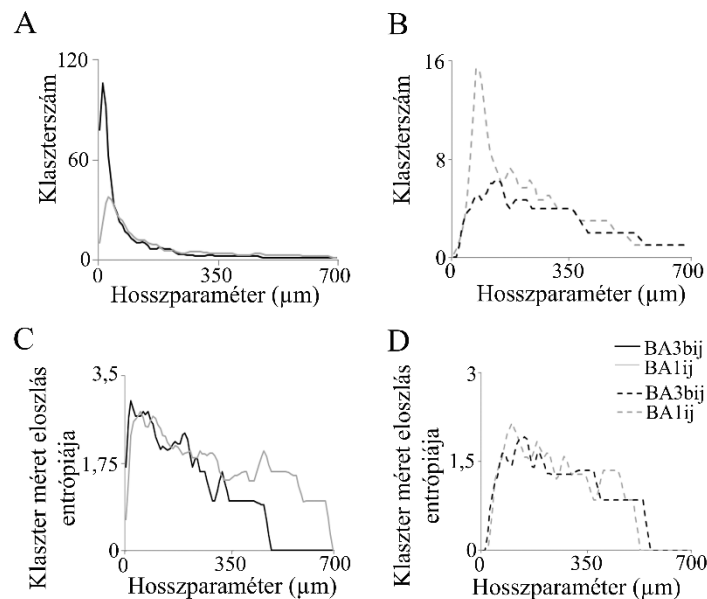
A BA1-ben található arányok magasabbak, mint a BA3b-ben találhatóak (BA3b: $0,76 \pm 0,29$ intra, $1,48 \pm 0,38$ inter valamint BA1: $1,56 \pm 0,59$ intra, $1,12 \pm 0,96$ inter). Ezt

részben az magyarázza, hogy BA1-ben általánosan kisebb IOS-területeket találunk, mind intra- mind interáreaként vizsgálva a területet.

5.2.5 A retrográd jelölődés klaszteres szerkezete

A Voronoi-sűrűségterképeken látott elszórtan megjelenő legnagyobb sűrűségű területek (19A ábra +3 SD, +2 SD területek) felvetették a kérdést, hogy a BA3b beadás esetén erősebb klaszteresedést találunk-e, mint BA1 beadás esetében. A térbeli csoportosulást egy sűrűség alapú DBSCAN klaszter algoritmussal vizsgáltuk (9. ábra).

A 23. ábrán látható, hogy a hosszparaméter növekedésével a klaszterek száma hamar eléri a csúcst, aztán exponenciálisan csökken pár darabra. Ez azt mutatja, hogy egy nagy klaszter körül néhány kisebb klasztert figyelhetünk meg mielőtt az értékek elérnék az 1-et. Érdekes, hogy a klaszterek száma jóval kisebb maximális értéket ér el és lassabb klaszterszám csökkenést mutat az inter-árealis jelölődés esetén (23B ábra). BA3b-ben nagyobb klaszterszám csúcsokat találunk, mint BA1-ben mindkét beadás esetén (23A, B ábra).



23. ábra. A retrográd jelölődés klaszteresedése.

A neuronok klasztereinek száma a hosszparaméter függvényében áreán belüli (A) és áreák közötti (B) jelölődés esetén. A klaszterméret variabilitásának eloszlása a hosszparaméter függvényében áreán belül (C) és áreák közötti (D) jelölődés esetén. A diagramok a három esetet mediánját mutatják. Az adatok 3 adatpontonként (24 μ m) végzett mozgóátlagolással lettek ábrázolva.

A legmagasabb klaszterszámot a beadási áréában BA3b beadás esetében 20 μm -es hosszparaméternél (106 db klaszter), BA1 beadás esetében 36 μm -es hosszparaméternél (38 db klaszter) figyelhetjük meg. A csúcs után a klaszterszám a neuronok közti hosszparaméter növekedésével folyamatosan csökken. Kb. 240 μm -es és annál nagyobb neuronok közti hosszparaméter mellett szinte állandó értéket vesz fel (BA3b: $1,7 \pm 0,75$, BA1: $3,21 \pm 0,96$). A szomszédos áréában mért értékek nem mutatnak ilyen egységes képet. BA3b beadás esetében 76 μm -es neuronok közti hosszparaméternél találjuk a legmagasabb klaszterszámot (16 db klaszter), míg BA1 beadás esetében 132 μm -es hosszparaméternél (6 db klaszter). A klaszterszám innen kezdve nagyobb lépcsőkben csökken, majd 524 μm (BA3b beadás) és 556 μm (BA1 beadás) hosszparaméternél állandó értéket vesz fel.

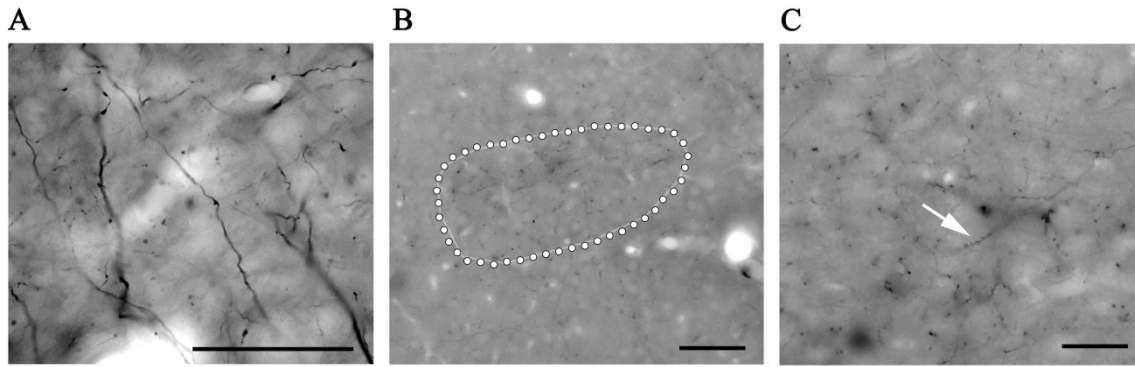
A klaszterszámok eloszlásával szemben a klaszterek méretének diverzitása sokkal fokozatosabb csökkenést mutat az intra- és inter-árealis jelölődés esetében is (23C, D ábra). A lassú csökkenés eredménye képpen a klaszter méret relatív nagy diverzitása nagyobb hosszparaméternél jelenik meg, ahol viszont már a klaszterek száma viszonylag alacsony (23C, D ábra). A klaszterek méretének variabilitása hosszparaméter mellett az áréán belül is egyformának látszódik (23C, D ábra). Nagy hosszparaméter és kis klaszterszám esetén a klaszter méret nagyobb variabilitást mutat BA1-ben az intra-árealis esetben (23C ábra). Az inter-árealis jelölődés esetében a klaszterek méretének variabilitása egyformának vehető a kétféle beadás után, talán BA3b-ben kicsivel magasabb értékek figyelhetők meg (23D ábra)

5.3 Az anterográd jelölődés

5.3.1 Az anterográd jelölődés általános leírása

Az anterográd jelölődés három féle struktúrát jelölt: rostokat, terminális arborizációkat és bouton-szerű struktúrákat (24. ábra).

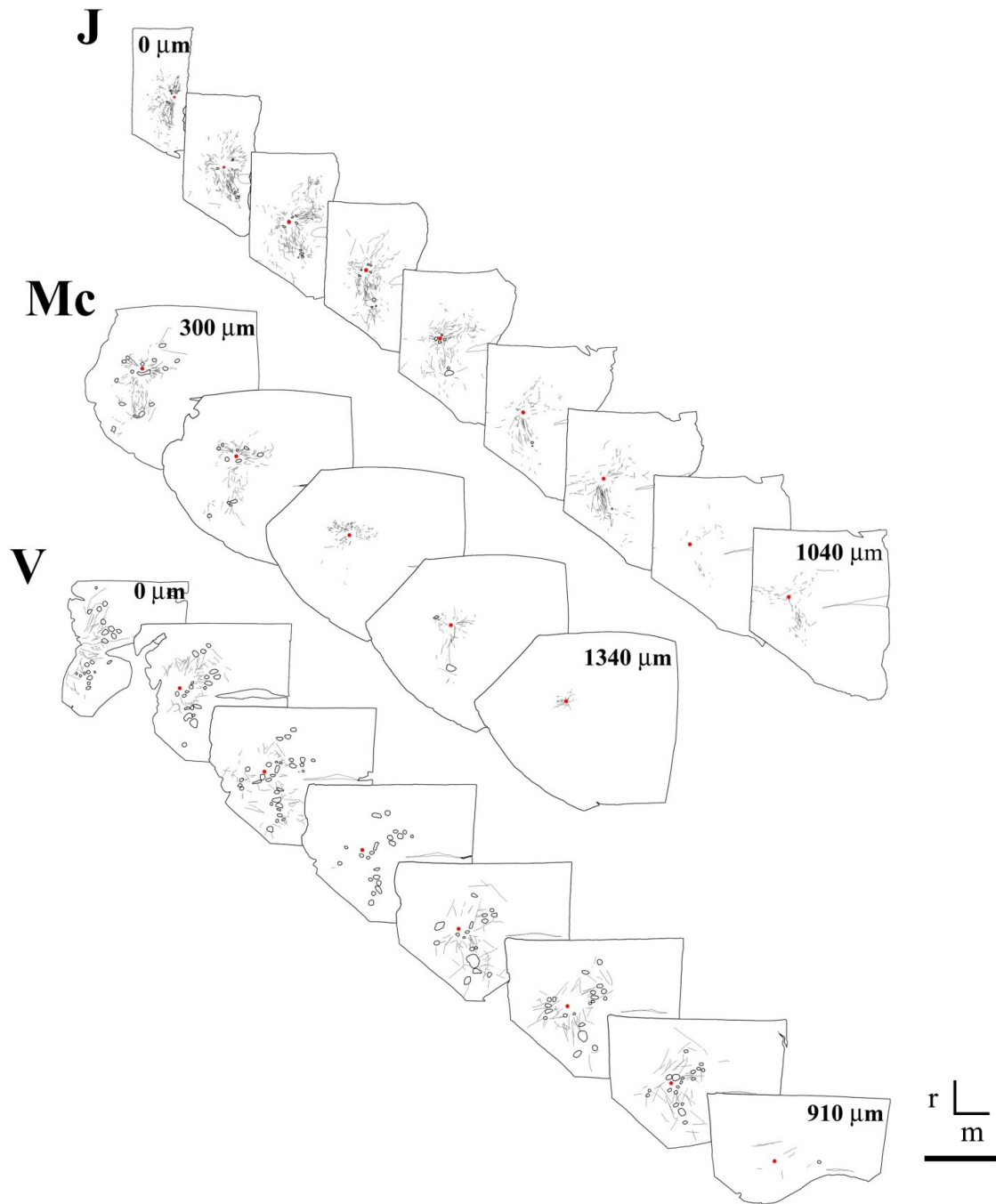
A rostok megjelenése a két área között és az injektált áréán belül volt domináns, a terminális arborizációk leginkább a rostok elvégződéseinél találhatóak (25. ábra, 26. ábra).



24. ábra. Anterográdan jelölődött struktúrák

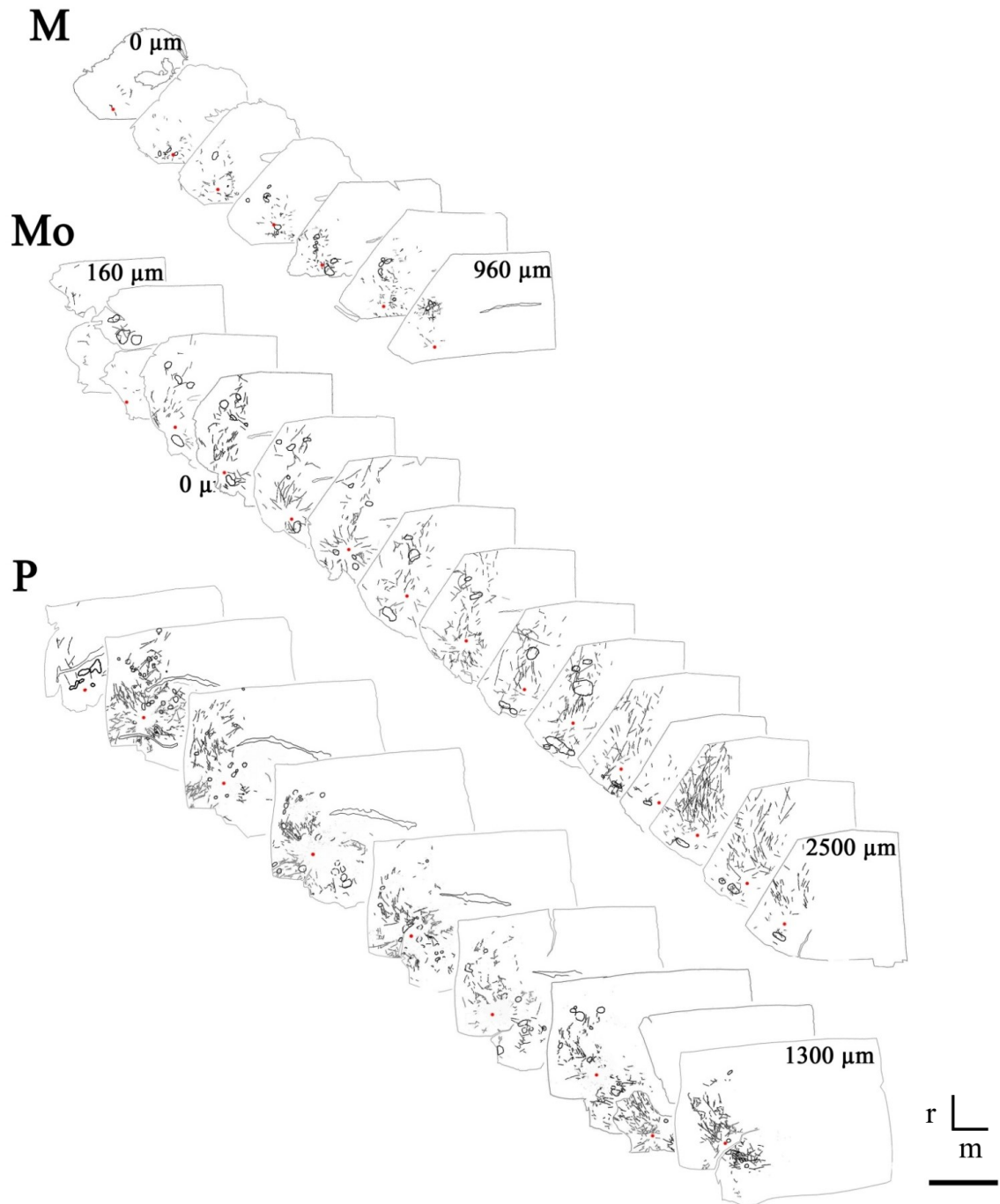
(A) Hosszan lefutó rostok. (B) a terminális arborizáció és határának körvonala (fehér pöttyös kontúr) alacsony nagyításon. (C) Gazdagon elágazódó axonok és bouton-szerű struktúrák (fehér nyíl) nagyobb nagyításon a terminális arborizációban. Méretvonal: 250 μm (A), 50 μm (B) és 25 μm (C).

A túlélési idő megfigyeléseink szerint jobban hat az anterogád jelölésre, mint a retrográdra. Az anterográdan jelölt struktúrák jelölődésében nagyobb egyedi variációt figyelhetünk meg (25. ábra, 26. ábra). BA3b beadás esetén J-ben 10 napos túlélés után csak kevés terminális arborizáció-szerű struktúra figyelhető meg, hosszú, horizontálisan futó rostok viszont bőségesen jelölődtek (25. ábra). A legtöbb terminális arborizáció-szerű struktúra a 20 napos túlélési idővel rendelkező V-ben található (25. ábra). V-ben a hosszú, horizontális rostok a beadási helytől távol találhatóak, ellentétben Mc-el és J-vel, akiknél a hosszú rostok lefutását már a beadási helytől követhetjük (25. ábra). Mc esetében, 14 napos túlélési idő, a beadás után terminális arborizáció-szerű struktúra és horizontális rost egyaránt található a beadási hely közelében (25. ábra). BA1 beadás esetén is igaz, hogy a túlélési idő az anterogád jelre van inkább hatással. A legkisebb túlélési idővel rendelkező P-nél (10 nap) rövidebb rostok és kisebb méretű terminális arborizációk figyelhetők meg (26. ábra), míg Mo-nál (16 nap) hosszabb rostok és nagyobb területű terminális arborizációk dominálnak (26. ábra).



25. ábra. Anterográd jelölődés rekonstrukciója sorozatmetszeteken BA3b beadás esetén.

Körvonalak: a terminális axon arborizációk, vonalak: horizontálisan futó axonok. A piros pontok a beadási helyeket jelölik. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 5 mm.



26. ábra. Anterográd jelölődés rekonstrukciója sorozatmetszeteken BA1 beadás esetén.

Körvonalak: a terminális axon arborizációk, vonalak: horizontálisan futó axonok.

A piros pontok a beadási helyeket jelölik. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 5 mm.

5.3.2 Az anterográd jelölődés réteg- és laterális irányú eloszlása

Az anterográdan jelölődött struktúrák területi és rétegeloszlását a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat. Anterográd BDA jelölt struktúrák területi és rétegi eloszlása (átlag±szórás).

PTA: jelölődött terminális arborizációk aránya, STA: szupragranulárisan jelölődött terminális arborizációk aránya egy-egy áréában, PB: terminális arborizációkon belül jelölődött boutonok aránya, SB: terminális arborizációkon belül szupragranulárisan jelölődött boutonok aránya. A számolás során csak BA3b és BA1-ben jelölődött struktúrákat vettük figyelembe. A csillagok a szignifikánsan nagyobb intra- vagy interaréális értéket jelzik (*: $0,05 > p > -0,01$). Az összehasonlításra egyszélű, kétmintás, párosított *t*-tesztet alkalmaztunk.

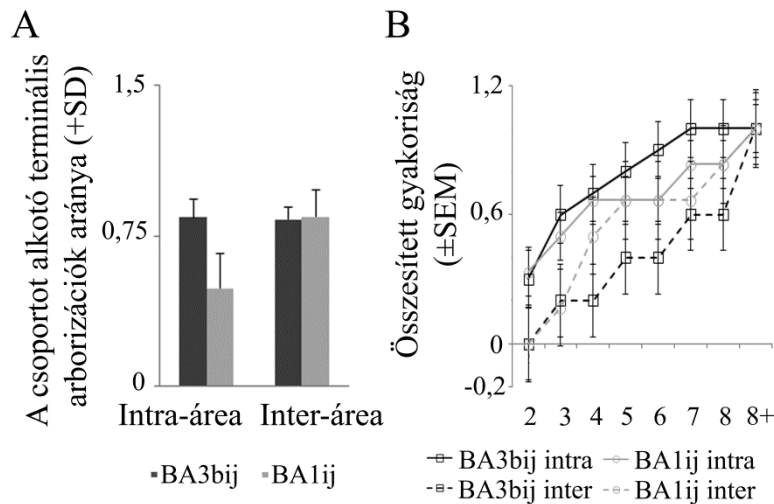
Injektált área	Área 3b beadás		Área 1 beadás	
Vizsgált área	Área 1	Área 3b	Área 1	Área 3b
PTA	0,42±0,02	0,58±0,02*	0,44±0,19	0,56±0,19
STA	0,85±0,02	0,84±0,20	0,62±0,32	0,70±0,12
PB	0,42±0,11	0,58±0,11	0,56±0,28	0,44±0,28
SB	0,90±0,13	0,88±0,10	0,85±0,13	0,67±0,40

BDA jelölődött terminális arborizációk a retrográd jelhez képest egyenletesebben oszlottak el a két áréában (PTA értékek, 6. táblázat). BA3b beadás esetén az intra-aréáisan jelölődött terminális arborizációk aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a szomszédos áréában jelölődöttké (egyszélű, kétmintás, párosított *t*-teszt, $p=0,01$). Ehhez hasonló különbség BA1 beadás esetén nem volt megfigyelhető. A terminális arborizációk esetében a szupragranuláris jelölődés dominált (STA értékek, 6. táblázat). A rétegi eloszlásban sehol nem figyelhető meg különbség az injektált és szomszédos área között a két beadás esetén (STA értékek, 6. táblázat).

A terminális arborizációkhoz hasonlóan a jelölődött bouton-szerű képletek eloszlása hasonló volt a két áréában szupragranuláris dominanciával, habár szignifikáns különbség a rétegi eloszlásban nem volt megfigyelhető (PB, SB értékek, 6. táblázat).

5.3.3 A terminális arborizációk eloszlása

Az összeillesztett metszetsorozatokon mindegyik esetben megfigyelhető, hogy a terminális arborizációk csoportokat formálnak a szomszédos sorozatmetszeten található terminális arborizációkkal oszlop szerű előfordulást sugallva (32. ábra).



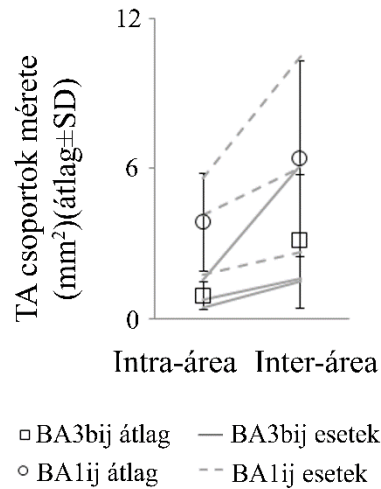
27. ábra. A terminális axon arborizáció csoportok eloszlása és mérete.

(A) A terminális arborizáció csoportok intra- és interaréalis megoszlása a kétféle beadást követően. (B) A terminális arborizáció csoportok méretének arányos eloszlása az őket alkotó terminális arborizációk kumulatív gyakorisága szerint.

Átlagosan csak a terminális arborizációk 15-17%-a nincs átfedésben egyetlen másikkal sem (27A ábra). A csoportok statisztikai összehasonlítása nem mutatott különbséget az áréák és beadások között. A terminális arborizáció csoportok nagysága az őket alkotó terminális arborizációk száma alapján a 27B ábrán látható. 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 (27B ábra).

5.3.3.1 *A terminális arborizációk csoportosulása*

BA3b és BA1-ben a terminális arborizáció csoportok által lefedett kérgi terület mérete szignifikánsan különbözik az intra- és interárában (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,01$) ha a két beadást együtt vizsgáljuk (28. ábra).

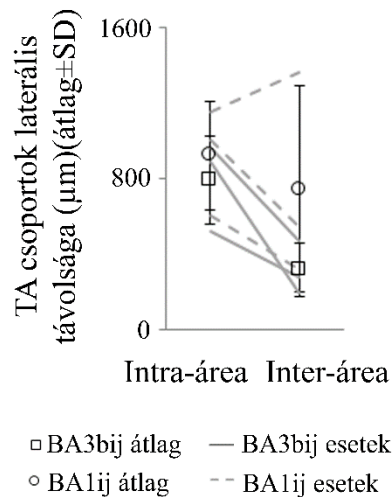


28. ábra. *A terminális arborizációk által alkotott csoportok mérete.*

A nagy szórásokat BA3b esetében a beadási áréában a Mc-nél található kis méretű csoportok okozzák, míg a szomszédos áréában V-nél találunk jóval nagyobb méretű csoportokat. BA1 beadás esetében az injektált áréában Mo-nál találunk nagy méretű csoportokat, a szomszédos áréában pedig P kis méretű csoportjai okozzák a nagy szórást.

5.3.3.2 *A terminális arborizáció csoportok horizontális eloszlása*

4.8.4.3. fejezetben leírt mérés lehetővé teszi, hogy információt kapjunk a kapcsolatok kiterjedéséről és segít megbecsülni többek között a kérgi vetítést, „point-spread” funkciót (Wandell és Winawer, 2015). A terminális arborizációk által lefedett kérgi célterületek terület mérete a 29. ábrán látható.

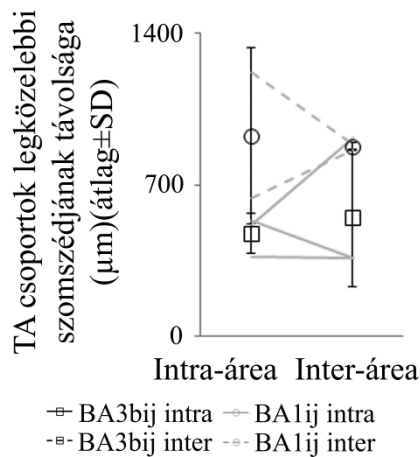


29. ábra. A terminális arborizáció csoportok által lefedett célterületek távolsága az adott áréában meghatározott középponttól mérve.

Mindkét beadás esetén az injektált áréán belül volt nagyobb kiterjedésű a jel, és ez BA3b beadás esetén szignifikánsan nagyobb volt (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,03$). Mindkét beadás esetében az interáréában nagy szórást találunk. Ezt BA3b beadás esetében V, BA1 beadás esetében P kiugró értéke okozza.

5.3.3.3 A terminális arborizáció csoportok szóródása

Az anterográd jel oldalirányú kiterjedését vizsgálhatjuk még a terminális arborizáció csoportok legközelebbi szomszédjának távolságának leírásával (4.8.4.4. fejezet). A 30. ábrán megfigyelhetjük azt a trendet miszerint BA1 beadás után a csoportok nagyobb távolságra helyezkednek el egymástól, habár M esetében csak 1-1 patch csoportot találunk a két áréában, így csak két esetet vizsgálhatunk.

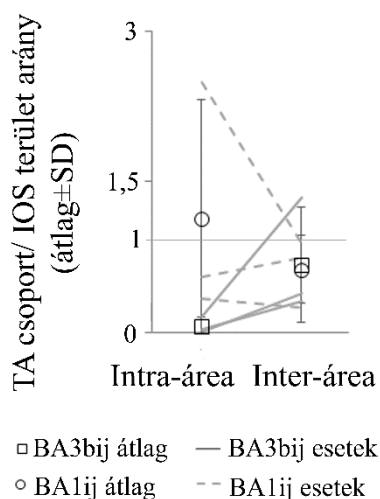


30. ábra. A terminális arborizáció csoportok legközelebbi szomszédjainak távolsága.

5.3.4 A terminális arborizáció csoportok és a funkcionális térképek kapcsolata

5.3.4.1 Terminális axon arborizáció csoportok méretének összehasonlítása az IOS mérés során aktiválódott terület méretével

4.8.4.5. fejezetben leírtak szerint meghatározott arány intraaréális esetben BA1 beadás esetében 1 körül mozog, azt mutatva, hogy a két terület körülbelül egyforma méretű, és BA3b beadás értékeinél tízszer nagyobbak (BA3bij átlag: $0,1 \pm 0,08$, a nagy szórást V kiugró értéke okozza; BA1ij átlag: $1,16 \pm 1,19$, a nagy szórást Mo kiugró értéke okozza)(31. ábra).

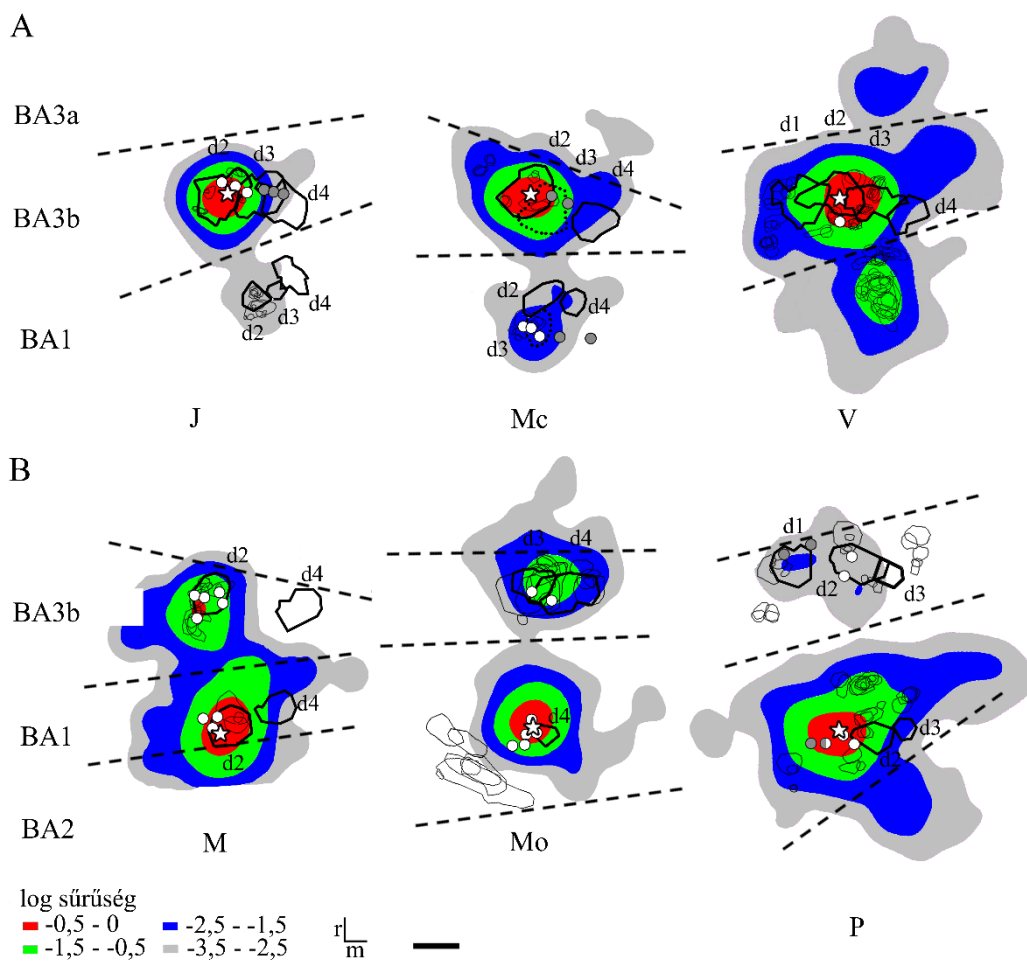


31. ábra. Terminális axon arborizáció csoportok méretének és az IOS-terület méretének aránya.

Interaréálisan mindkét beadásnál egyforma arányokat találunk, amelyek azt mutatják, hogy az IOS kísérlet során aktiválódott terület kicsit több mint kétszer nagyobb a terminális arborizáció csoportok méreténél (31. ábra).

5.3.4.2 Az anterográd és retrográd jeleloszlás összehasonlítása

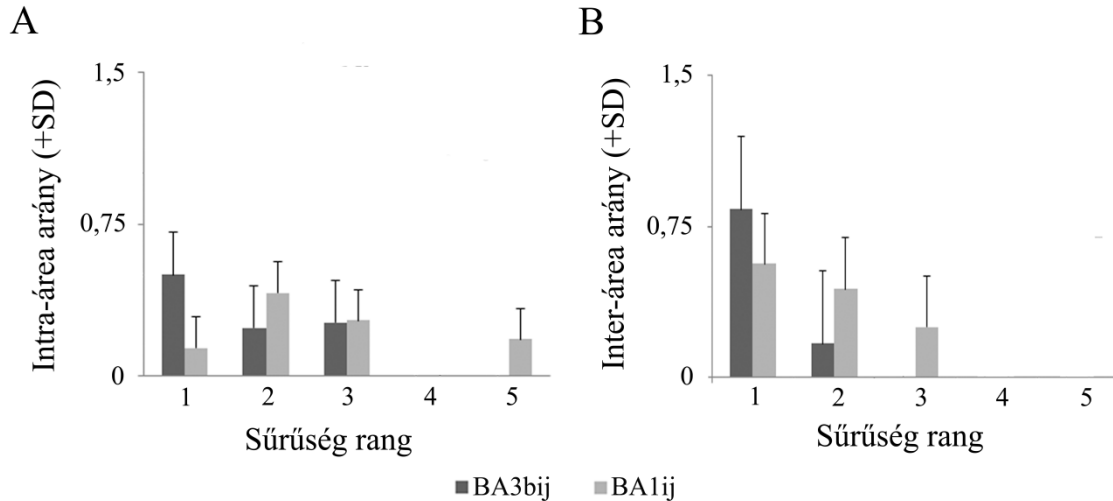
A 32 ábrán megfigyelhetjük, hogy az anterográdan jelölődött terminális arborizáció csoportok a lokálisan legsűrűbben jelölődött területeken belül vagy azok körül helyezkednek el.



32. ábra. A retrográd és anterográd jelölődés oldalirányú kiterjedése közötti kapcsolat.

Retrográd jelölődött neuronok kernel-sűrűségterképe BA3b beadás (A) és BA1 beadás (B) esetén a terminális arborizáció csoportokkal összeillesztve. A négy legsűrűbben jelölődött területet mutatják a különböző színek. A vékony szürke vonalak a terminális arborizáció csoportokat jelölik. A szaggatott vonalak az área határokat jelzik. A csillagok a beadási helyet jelölik. r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 1mm.

A 32. ábra segítségével a 4.8.4.6. fejezetben leírtak szerint készített diagramon látható, hogy az adott áréában legsűrűbben jelölt területtől távolodva a terminális arborizáció csoportok hányad része esik az adott sűrűségű területre (33. ábra).



33. ábra. A terminális arborizáció csoportok eloszlása a kernel sűrűségterképen.

Az injektált áréán (A) és a szomszédos áréán (B) belüli adatok hasonló eloszlást mutatnak: BA3b beadás után a terminális arborizáció csoportok a nagyobb sűrűségű területek felett helyezkednek el, amíg BA1 beadás után a terminális arborizáció csoportok kisebb sűrűségű, így relatíve nagyobb területen terjednek szét.

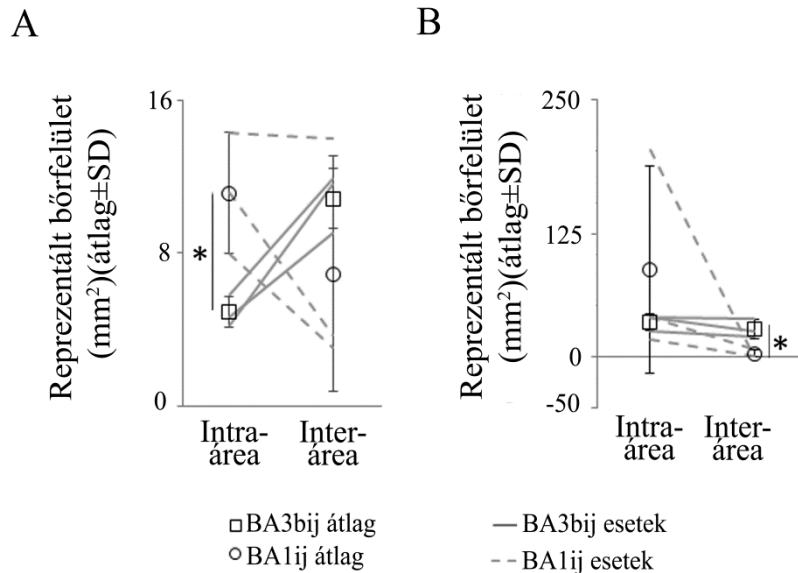
Megfigyelhető, hogy az injektált áréában a terminális arborizáció csoportok több csökkenő sűrűségű területen oszlottak el, mint a szomszédos áréában (33. ábra). BA3b beadás után jelölődött terminális arborizáció csoportok jóval koncentráltabban helyezkedtek el a retrográdan sűrűbben jelölt áréákban, mint BA1 beadás után jelölődtek (33. ábra).

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

A 4.8.5 fejezetben leírtak alapján megvizsgáltuk a kétféle jelölődés kiterjedésének viszonyát a reprezentált bőrfelület nagyságával.

5.4.1 A retrográd jelölődés által reprezentált bőrfelület nagysága

A kernel sűrűségterképeken az áreánkénti legsűrűbb területekhez és az ekvivalens sűrűségű területekhez is kiszámítottuk a megfelelő CMF értékkel a reprezentált bőrfelületek nagyságát (34. ábra).



34. ábra. A retrográdan legsűrűbben jelölődött terület áreánként (A) és a legsűrűbben jelölődött ekvivalens sűrűségű (B) területek méretéből számított reprezentált bőrfelület nagysága.

A csillagok a szignifikánsan nagyobb intra- vagy interaréális értéket jelzik (*: $p \leq 0,05-0,01$). Az összehasonlításra egyszélű, kétmintás, párosított t -tesztet alkalmaztunk.

Az áreákra függetlenül kiszámolt legsűrűbb területek esetében BA3b beadás után BA1-ben szignifikánsan nagyobb bőrfelület reprezentálódik (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,01$)(34A ábra). Az intraaréális értékeket összehasonlítva BA1-ben szignifikánsan nagyobb bőrfelület reprezentálódik (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,03$)(34A ábra). BA1 beadás esetében a szomszédos áreában mért értékeknél található nagy szórás P kiugró értéke okozza.

Az ekvivalens sűrűségű területek esetében számolt területek az injektált áreák azonos méretű bőrfelületet reprezentálnak BA3b-ben és BA1-ben (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,25$)(34B ábra). Az interaréális értékek esetében BA1-ben szignifikánsan nagyobbak az értékek (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt,

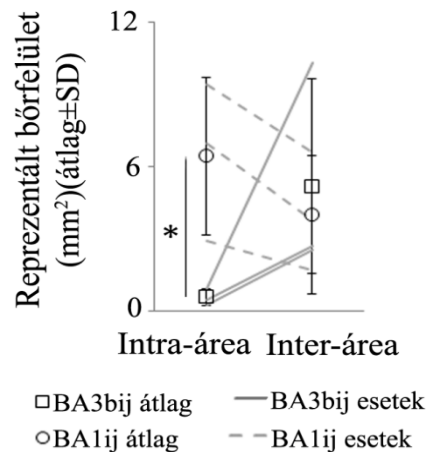
$p=0,03$)(34B). A nagy szórást BA1 esetében P értékei okozzák, ahol a kék területeket hasonlítottuk össze (20. ábra).

5.4.2 Az anterográd jelölődés által reprezentált bőrfelület nagysága

Az anterográd jelölődés esetében a terminális arborizáció csoportok méretével és azok laterális kiterjedésével számítottuk ki a megfelelő CMF értékkel a reprezentált bőrfelületek nagyságát.

5.4.2.1 A terminális arborizáció csoportok méretéből számított bőrfelület nagysága

A terminális arborizáció csoportok méretéből kiszámolt reprezentált bőrfelület nagyságát 35. ábrán láthatjuk.



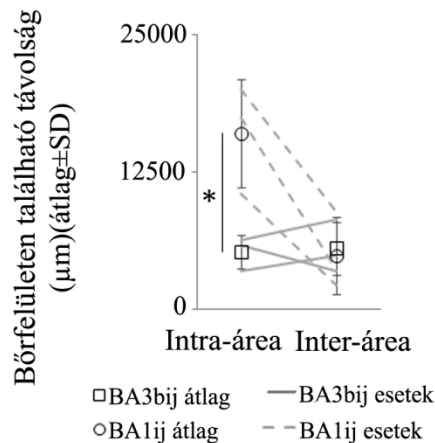
35. ábra. Az anterográdan jelölődött terminális arborizáció csoportok méretéből számított reprezentált bőrfelületek nagysága.

A csillagok a szignifikánsan nagyobb intra- vagy interaréális értéket jelzik (*: $p \leq 0,05-0,01$). Az összehasonlításra egyszélű, kétmintás, párosított t -tesztet alkalmaztunk.

BA3b-ben kisebb értékeket kapunk mindkét beadás esetén (35. ábra), ez az érték BA1 beadás után szignifikánsan kisebb (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,03$). A két intraaréális érték is különbözik, BA1 beadás esetében szignifikánsan nagyobb (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,05$)(35. ábra). BA3b beadás esetén a nagy szórást V értéke, BA1 beadás esetén intraaréálisan P, interaréálisan Mo értékei okozzák.

5.4.2.2 A terminális arborizáció csoportok laterális kiterjedéséből számított bőrfelület nagysága

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 szignifikánsan nagyobb bőrterületet reprezentál (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,01$)(36. ábra). Az injektált áréak által lefedett bőrterületek közül BA1 háromszorosan nagyobb területet reprezentál, mint BA3b (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,02$)(36. ábra). BA1 beadás esetében az interaréális nagy szórást M_o értéke okozza.



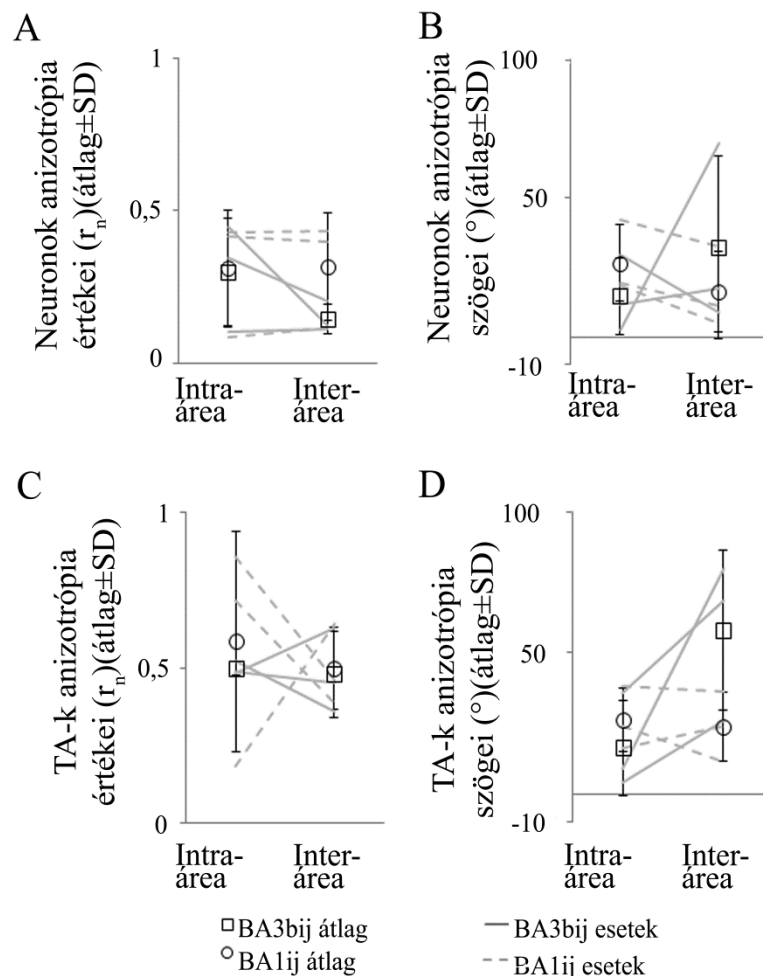
36. ábra. Az anterográdan jelölődöt terminális arborizáció csoportok laterális kiterjedéséből számított reprezentált bőrfelületi távolság.

A csillagok a szignifikánsan nagyobb intra- vagy interaréális értéket jelzik (*: $p \leq 0,05-0,01$). Az összehasonlításra egyszélű, kétmintás, párosított t -tesztet alkalmaztunk.

5.5 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 (37A, C ábra).

Az összehasonlítás nagyobb anizotrópiát mutatott a terminális axon arborizációk esetében, mint a retrográdan jelölődött sejtesteknél (két utas, ismétléses ANOVA, $p=0,002$). Az áréán belüli és áréák közötti anizotrópia értékek összehasonlítása egyik jelölés esetében sem mutat szignifikáns különbséget. A post hoc összehasonlítás megmutatta, hogy az anterográd jelölődés nagyobb anizotrópiával rendelkezik, de csak az interaréális értékek összehasonlítása esetén (retrográd: $0,23\pm 0,15$, anterográd: $0,49\pm 0,12$; egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,005$).



37. ábra. A retrográd és anterográd jelölődés anizotrópia elemzése.

A retrográd (A) és anterográd (C) jelölődés esetében mért anizotrópia indexek. Az anizotrópia vektorok az áreahatárral bezárt szöge a retrográd (B) és anterográd (D) jelölődés esetében.

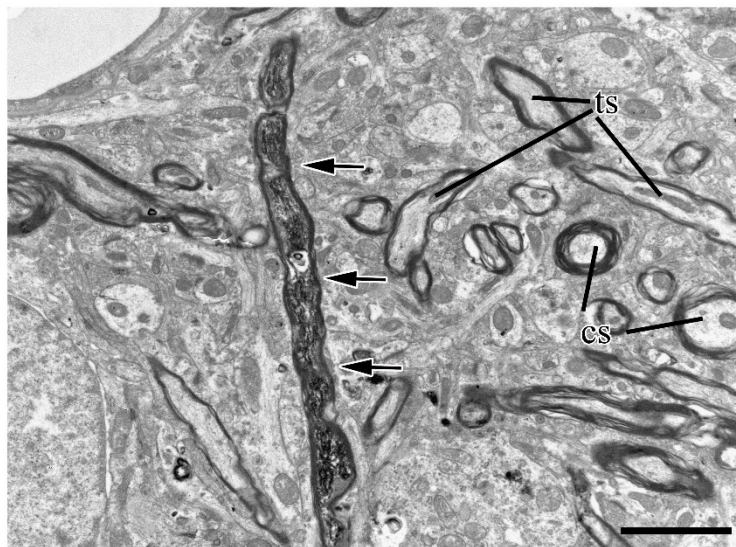
A BDA jelölődés orientációját az anizotrópia vektorok és a BA3b/1 határ közti szöggel határoztuk meg. A BA3b/1 határ párhuzamosnak tekinthető az egymás melletti

ujjbegyek reprezentációjával, így a kis anizotrópia szög azt jelenti, hogy az eloszlás a szomszédos ujjbegy reprezentációkon keresztül helyezkedik el, míg a 90 vagy akörüli szögek az jelentik, hogy a jelölődés az ujj reprezentáció proximális része és a tenyér reprezentációja között húzódik (37B, D ábra). Az elemzés minden esetben viszonylag alacsony szögértékeket adott, egyedül a terminális axon arborizációk interáreálisan mért szögei mutattak nagyobb értékeket, de ezek sem voltak szignifikánsan nagyobbak (két utas, ismétléses ANOVA, terminális arborizációk: $p=0,10$; neuronok: $p=0,78$)(37B, D ábra).

5.6 Vastag, egyenes lefutású rostok eloszlása

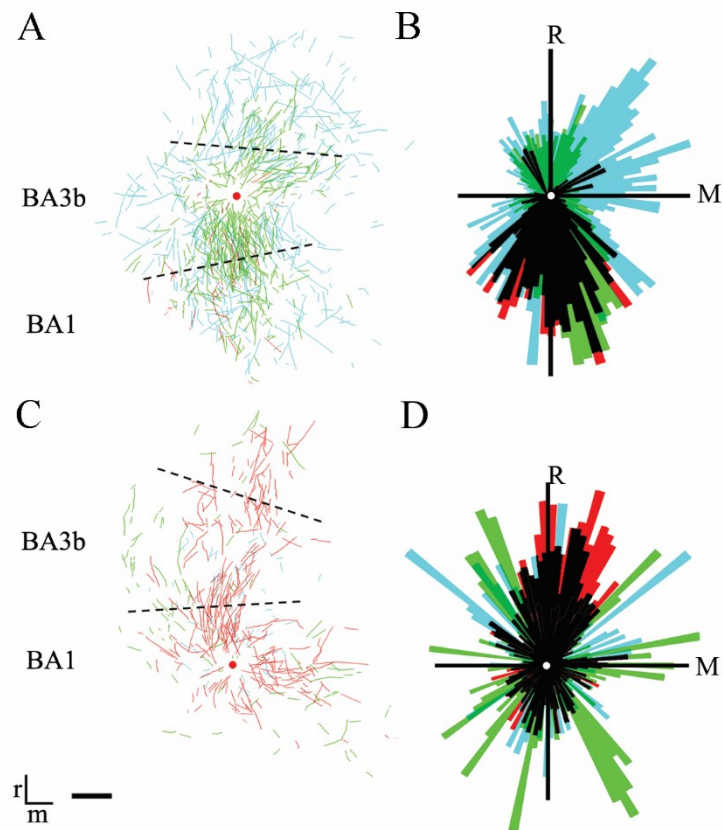
Az anterográdan jelölődött axonok térképezésekor felfigyeltünk arra, hogy az áréak között leginkább horizontálisan futó vastag, sima axonokat találunk.

Azt feltételeztük, hogy ezeket a nyúlványokat, legalábbis részben, mielinizált axonok képezik, amelyek a gyors információ szállításért lehetnek felelősek. Mind BA3b-ben, mind BA1-ben találtunk BDA jelölt mielinizált axonokat elektronmikroszkóppal a beadási helytől függetlenül (38. ábra).



38. ábra. A BDA-jelölt vastag és egyenes lefutású rostok elektronmikroszkópos képe.

A vastag és egyenes lefutású mielinizált axon elektronmikroszkópos (fekete nyilak) képe. Sok BDA által nem festődött kereszt- és hosszmetsetben (cs és ts) futó mielinizált axont figyelhetünk meg a jelölődött mellett (fekete nyilak). Méretvonal: 2 μ m.



39. ábra. A BDA-jelölt vastag és egyenes lefutású rostok eloszlása.

(A, C) A vastag és egyenes lefutású rostok eloszlása a különböző beadások esetén. BA3b (A) és BA1 beadás (C) esetei egymásra illesztve láthatók. (B, D) A térképekből képzett poláris diagramok a rostok fő irányultságát mutatják BA3b (B) és BA1 (D) beadás esetén. Fekete színnel az egy beadáshoz tartozó 3 eset által kijelölt legfőbb irányt láthatjuk. A különböző színek a beadáshoz tartozó egyes eseteket jelentik. A piros és fehér pontok a beadási helyet jelölik, a szaggatott vonalak az áreahatárokat jelzik. A keresztek középpontja (B, D) a beadási helyet jelöli. Orientáció (B, C, E, F): r/R : rosztrális, m/M : mediális. Méretvonal (A, C): 1 mm.

Ezek az axon-szerű nyúlványok a kéreg egész mélységében megtalálhatóak voltak. Már a nyúlványok térképezése közben feltűnt, hogy ezek a vastag axon-szerű nyúlványok leginkább az áreák között természetesen kapcsolatot (39A, C ábra). A jelölt nyúlványok fő irányának meghatározásához az egyes eseteket egymásra illesztettük és poláris diagramon ábrázoltuk az eredményt. A 39B, D ábrán a fekete szín jelzi az átfedő mielins axon-szerű nyúlványokat, amelyek leginkább a két szomszédos área között

találunk. Ez az irányultság merőleges az anizotrópia analízis által mutatott BA1 és BA3b-ben megfigyelt retrográd és anterográd jelölődésre.

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

Az anterográdan jelölt axonok kapcsolatát vizsgáltuk az ezen a területen megjelenő GABAerg interneuronokkal. Az 5.7.1 fejezetben tárgyalt eredmények BA1 és BA3a beadásokból származnak, az áréák közötti (BA1-BA3b és BA3a-M1) és intrinzik kapcsolatokat vizsgáltuk.

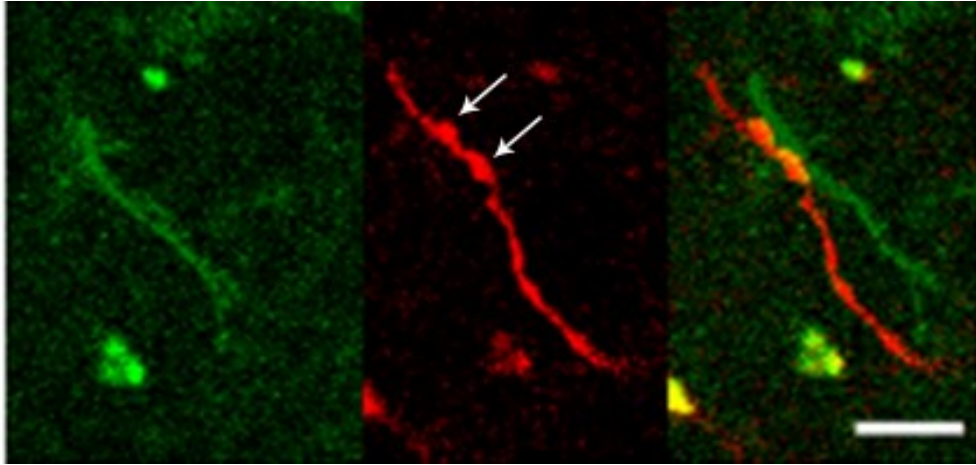
5.7.1 A fluoreszcens jelölés jellemzése

5.7.2 Az autofluoreszcencia csökkentésére tett kísérletek eredménye

A 4.6.2.2 fejezetben leírt módszerek közül végül a primer ellenanyaggal való inkubálás alatti megvilágítást és a réz-szulfát kezelést alkalmaztuk a metszeteken. Az autofluoreszcencia mértéke csökkenthető volt ezekkel a módszerekkel, de teljesen nem kiküszbölhető. A szudán fekete B-vel való kezelés is hatásosnak bizonyult a próbametszeteken, de nem minden általunk használt szekunder ellenanyaggal kompatibilis a módszer (Alexa647). A GFAP primer ellenanyaggal történő festés a metszetek limitált száma és az egy metszeten kivitelezhető többszörös fluoreszcens jelölés megvalósíthatósága miatt nem került használatra.

5.7.3 A különböző típusú GABAerg interneuronok specifikus jelölése

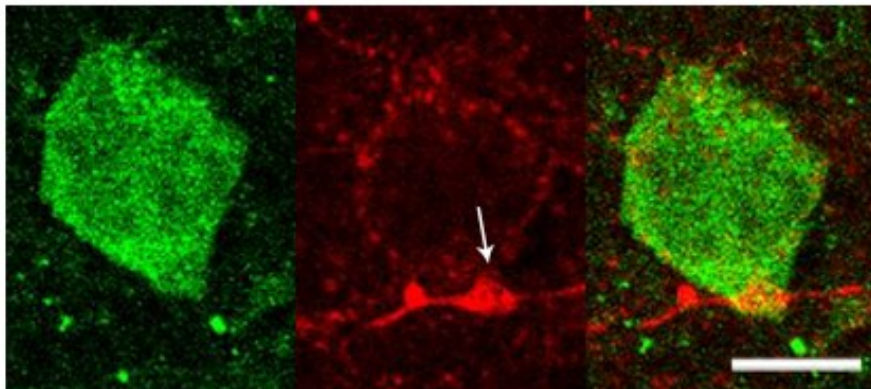
Három típusú GABAerg interneuront jelöltünk meg mindkét beadás esetében. A CR festés után nem találtunk értékelhető jelet a metszeteken. Így a SOM és PV jelöléseket vizsgáltuk.



40. ábra. BDA jelölt axonon található bouron-szerű struktúrák (fehér nyilak) PV dendrittel (zöld) formált közeli kontaktusa BA1 beadás esetében.

Méretvonal: 10 μ m.

A PV festés sejteket és dendriteket (40. ábra) is jelölt. Azokban az állatokban, ahol BA1-t injektáltuk 280 sejt jelölődött, BA3a beadás esetében a jelölés gyenge volt, itt csak 2 sejtet tudtunk megfigyelni. BA1 beadás esetében a sejtek 60% az injektált áréában, míg BA3a beadás esetén az összes PV pozitív sejt az M1-ben volt megfigyelhető. A dendritek esetében a következő volt a helyzet: BA1 injektált área esetében 352 dendritet figyeltünk meg, BA3a injektált área esetében viszont nem láttunk PV pozitív dendritet. BA1 injektált área esetében a dendritek mind az intra-, mind az interáréában fele-fele arányban megfigyelhetőek voltak.



41. ábra. BDA jelölt axonon található bouron-szerű struktúra (fehér nyíl) SOM sejtestel (zöld) formált közeli kontaktusa BA3a beadás esetében.

Méretvonal: 10 μ m.

A SOM festés sejteket (41. ábra) és dendriteket is jelölt. Általában elmondható, hogy kevesebb struktúrát jelölt, mint a PV festés. BA1 injektált área esetében nem jelölődött sejt, BA3a beadás esetében 13 sejtet tudtunk megfigyelni. BA3a injektált área esetén a SOM pozitív sejtek 38%-a az injektált áreaiban volt megfigyelhető. A dendritek esetében is hasonlóan kevés jelet kaptunk. BA1 beadás esetében 20 dendritet figyeltünk meg, BA3a beadás esetében 38 dendritet figyeltünk meg. A SOM pozitív dendritek több, mint háromnegyede a beadási áreaiban volt megfigyelhető (BA1ij: 85%, BA3a ij: 76%.)

5.7.4 A feltérképezett bouton szerű struktúrák jellemzői

BA1 beadás esetén (M, Mo, P) összesen 11694 bouton szerű struktúrát térképeztünk fel, BA3a beadás után (R, T) pedig 977 darabot.

5.7.4.1 Közeli kapcsolatot képző boutonok jellemzése

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.

A jelölt afferensek és GABAerg interneuronok között nagyobb arányban találunk közeli kapcsolatokat az injektált áreaiban belül (BA1 beadás: $74\pm 4\%$, BA3a beadás: $81\pm 19\%$), mint az áreaik közötti kapcsolatok esetén (BA1 beadás: $26\pm 4\%$, BA3a beadás: $19\pm 19\%$).

Megvizsgáltuk, hogy a jelölt struktúrák megjelenésének aránya eltér-e a jelölődés arányától. Az eredményeket a *12. táblázat* foglalja össze:

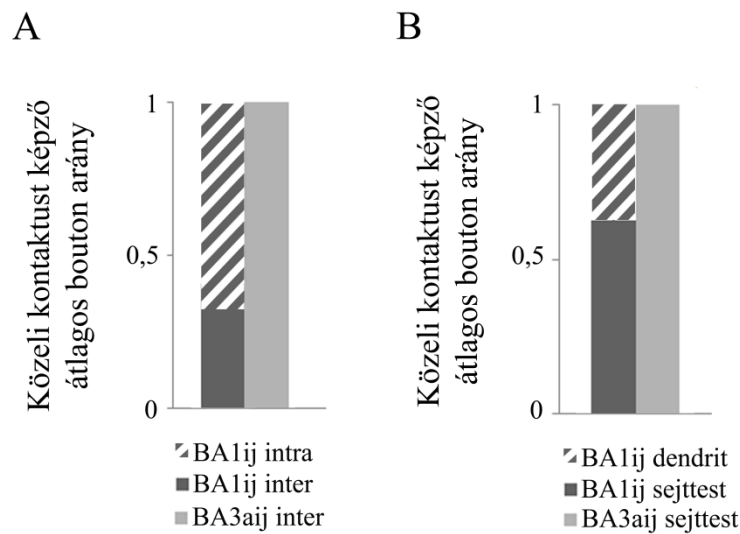
12. táblázat. A fluoreszcensen jelölt sejtek és az adott jelöléssel közeli kontaktust képző boutonok aránya a két beadás esetében (átlag±szórás).

Injektált área	Jelölődött GABAerg sejtek		GABAerg struktúrával kontaktot képező boutonok	
	PV jelölt sejtek aránya	SOM jelölt sejtek aránya	PV jelölt struktúrával kontaktot képző boutonok aránya	SOM jelölt struktúrával kontaktot képző boutonok aránya
BA1	100	0	0,91±0,14	0,09±0,14
BA3a	0,13±0,36	0,87±0,36	0,04±0,01	0,96±0,06

BA1 beadás esetén a jelölt GABAerg sejtek aránya és az ezekkel a sejtekkel képzett közeli kontaktusok aránya nem tér el. Ez jelentheti azt is, hogy a jelölődés véletlenszerű tekintettel a nagyon kis számú jelölt SOM pozitív sejtre. BA3a beadás esetén ezek az arányok eltérnek, arra utalva, hogy a jelölés specifikus lehet.

5.7.4.2 *A parvalbumin pozitív sejtek és dendritek és a BDA-jelölt axonok közötti közeli kontaktusok szelektivitása*

A PV pozitív sejtek esetén nincs szignifikáns különbség az injektált és a szomszédos áreában képzett közeli kapcsolatok megoszlása között egyik beadás esetében sem (42A ábra). 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 szignifikáns különbség.



42. ábra. Az áreán belüli és áreák közötti közeli kapcsolatot formáló boutonok aránya BA1 és BA3a beadás után parvalbumin pozitív sejtek esetén.

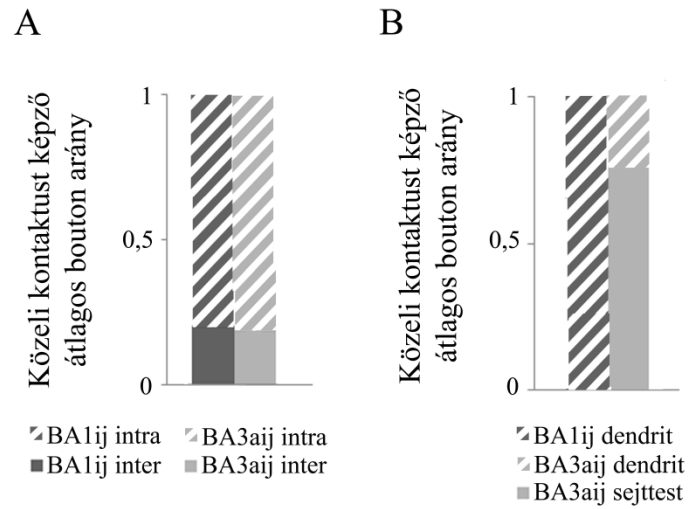
(A) Az áreán belüli és áreák közötti közeli kapcsolatot formáló boutonok aránya BA1 és BA3a beadás után. (B) Boutonok megoszlása közeli kontaktus képzési helye szerint a dendrinten és a szómán.

Megvizsgáltuk, hogy az anterográdan jelölődött rostok a PV pozitív sejtek mely részét célozzák (42B ábra). BA3a beadás után csak a sejttesten figyeltünk meg közeli kontaktusokat, BA1 beadás után az arány a dendritek felé tolódott.

5.7.4.3 A szomatosztatin pozitív sejtek és dendritek és a BDA-jelölt axonok közötti közeli kontaktusok szelektivitása

A SOM interneuronokkal létesített kapcsolatokat mindkét beadás után áreán belüli jelölt afferensek alkották szignifikánsan magasabb arányban (egyszélű, kétmintás, párosított t -teszt, $p=0,01$)(45. ábra).

Megvizsgáltuk, hogy az anterográdan jelölődött rostok a SOM pozitív sejtek mely részét célozzák (45. ábra). BA1 beadás után csak a dendriten figyeltünk meg közeli kontaktusokat, BA3a beadás után az arány a sejttestek felé tolódik el.



43. ábra. Az áréán belüli és áréák közötti közeli kapcsolatot formáló boutonok aránya BA1 és BA3a beadás után szomatostatin pozitív sejtek esetén.

(A) Az áréán belüli és áréák közötti közeli kapcsolatot formáló boutonok aránya BA1 és BA3a beadás után. (B) Boutonok megoszlása közeli kontaktus képzési helye szerint a dendrinten és a szómán.

6 Megbeszélés és következtetések

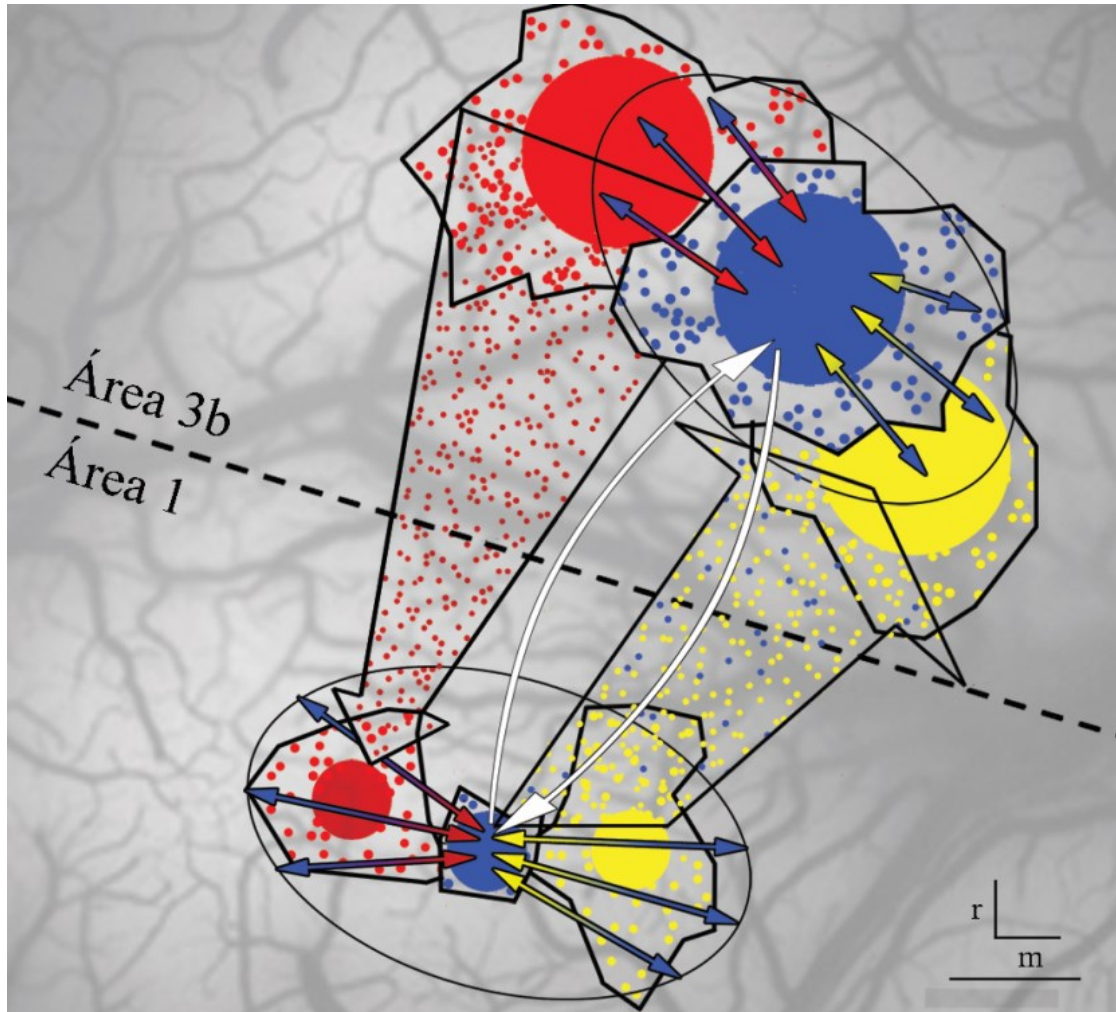
6.1 Áttekintés

A dolgozat bemutatja az áréakon belüli és azok közötti nagy általánosságban ortogonális, tehát az egymásra merőlegesen elrendezett intra- és interaréális, felépítésű kapcsolatokat BA3b és BA1-ben, az ujjbegyekből érkező információ integrálásában és a homotóp reprezentációk közötti információáramlásban betöltött szerepének vizsgálatával (44. ábra)(Pálfi és mtsai. 2018). Eredményeink nem csak azt a korábbi felfedezésünket támasztják alá, miszerint BA3b-ben a szomszédos ujjbegyek között oldalirányú anatómiai és funkcionális kapcsolat van (Wang és mtsai. 2013) hanem, hogy az áréak közötti felszálló kapcsolatok eredete (BA3b) és végződése (BA1) a homotóp régiókra szorítkozik BA3b és BA1-ben (Pálfi és mtsai, 2018). A dolgozat kvantitatív bizonyítékot szolgáltat arra, hogy mind a retrográd mind az anterográd jelölődés nagyobb áréán belüli laterális kiterjedést mutat, mint az áréak közötti jelölődés ha csak a kérgi méretet nézzük a FB terminális arborizációk esetében (Pálfi és mtsai. 2018). Megfigyeléseink összhangban vannak a vizuális kéregben tapasztaltakkal, ahol az áréán belüli kapcsolatok szintén nagyobb területen oszlanak el, mint a jobban lokalizált áréak közötti kapcsolatok (Angelucci és Bressloff 2006). Megmutattuk, hogy a lokális áréán belüli legsűrűbb jelölődés bemente BA3b és BA1-ben közel azonos méretű kérgi területről érkezik (Pálfi és mtsai. 2018). Ehhez hasonlóan nem találtunk szignifikáns különbséget a fel- (BA3b felől a BA1-be) és leszálló (BA1 felől a BA3b-ba) kapcsolatok kiindulási helyén (retrográd jelölődés) lévő kiterjedésében BA3b és BA1-ben (Pálfi és mtsai. 2018). Karakterisztikus különbség található a két área között a retrográdan jelölődött neuronok klaszteresedésében. Nevezetesen a BA3b-ben található neuronok erőteljesebb csoportosulást mutatnak, mint a BA1-ben találhatóak. Ez azt sugallja, hogy mind az intrinzik mind a felszálló kapcsolatokat alkotó neuronok jobban klaszteresednek, mint a BA1-ben jelölődött intrinzik és interaréális (FB) neuronok. (44. ábra)(Pálfi és mtsai. 2018). Összehasonlítva a retrográdan legsűrűbben jelölődött területek nagyságát és az anterográdan jelölődött terminális axon arborizációk laterális eloszlását azt találtuk, hogy BA1 efférensei (mind áréán belül és áréak közötti leszálló kapcsolatai) a retrográdan gyengébben jelölődött területeket célozzák (Pálfi és mtsai. 2018). A leszálló kapcsolatokat képező terminális arborizációk eloszlása ugyanakkora a

két áréában, az intrinzik kapcsolatokat képező terminális arborizációkra ez nem jellemző (Pálfi és mtsai. 2018).

A CMF segítségével meghatározott reprezentált bőrfelületek nagysága megmutatta, hogy BA1 nagyobb területről érkező információt integrál, mint BA3b és ez BA1 intrinzik és leszálló kapcsolatokat kialakító neuronjaira is igaz. BA3b-ben a leszálló kapcsolatokat kialakító terminális arborizációk és az intrinzik efferensek közel azonos méretű területet reprezentálnak. Ha figyelembe vesszük a leszálló kapcsolatokat esetében a vetítő neuronok által lefedett nagy méretű bőrfelületet arra következtethetünk, hogy a leszálló kapcsolatokat kialakító terminális arborizációk heterológ szomatotópiás információt közvetítenek BA3b felé (Pálfi és mtsai. 2018).

A főemlős SI kérgi gátlás alapjainak vizsgálata megmutatta, hogy a BDA jelölt axonok és GABAerg interneuronok közti kapcsolat leginkább a beadási áréában a szupragranuláris rétegek felé tolódott (Pálfi és mtsai. 2014; Pálfi és mtsai. 2016) és parvalbumin pozitív struktúrák esetében nincs preferencia a közeli kontaktus interneuronon való elhelyezkedésében, habár ez az arány nem tért el a neuronok eloszlása által sugallt eloszlástól. Szomatosztatin pozitív struktúrák esetében viszont a közeli kontaktusok az injektált áréán belül találhatóak meg magasabb számban, amely specifikus kapcsolatnak tűnik.



44. ábra. A kvantitatív eredmények összefoglalása a kérgi felszínre vetítve, amelyek alátámasztják az áreán belüli és áreák közötti kapcsolatok ortogonális szervezettségét a BA3b és BA1-en belül.

A különböző területek közötti kapcsolatokat nyilak szimbolizálják. Az áreán belüli kapcsolatok (kitöltött nyilak az ellipsziseken belül) fontos szerepet játszanak az adott és a szomszédos ujjbegyekből érkező információ integrációjában (21. ábra), míg a homotóp ujjbegy reprezentációk közötti gyors információcseréért az interaréális kapcsolatok egy része felelős (39. ábra). Az ábrán látható még a felszálló (nyíl piros pöttyökkel) és leszálló (nyíl sárga pöttyökkel) kapcsolatok relatív oldalirányú kiterjedése. Az BA3b-ből induló felszálló kapcsolatok konvergensek, amíg a BA1-ből induló leszálló kapcsolatok divergensek (30. ábra, 33. ábra). BA3b és BA1-ben egy kérgi területre vetítő neuronokat a kitöltött színes körök mutatják. A különböző színek különböző ujjbegyeket jelölnek. A színes körök a retrográdan legsűrűbben jelölődött területeket mutatják.

A pöttyök mintázata a retrográd jelölődés sűrűségét és klaszterezettségét reprezentálja (23. ábra). Az áréák közötti nyilak alapja a vetítő neuronok eloszlását, míg a nyílhegy az efferens terminális arborizációkat szimbolizálja. Az áréakon belüli kétirányú nyilak mindkét fajta jelölődést ábrázolják. A nyilakban látható színváltozás az ujjbegyek közötti információáramlást szimbolizálja. Az ábra M esetében az agyfelszínről készített fotóra lett illesztve. Az IOS mérés során aktiválódott területeket fekete kontúr jelzi. Az ábra a kapcsolatok eloszlásának relatív kérgi méretet mutatja. Az ellipszisek az anterográd jelölődés oldalirányú kiterjedését mutatják, területük meghaladja a retrográdan legsűrűbben jelölődött területek nagyságát mindkét áréában (34. ábra, 35. ábra). Az ellipszisek egyenlő nagyságúak, ez a terminális arborizációk egyforma laterális kiterjedését reprezentálja a két áréában (29. ábra). r: rostrális, m: mediális. Méretvonal: 500 μ m. (Pálfi és mtsai. nyomán, 2018)

6.2 Módszeri megfontolások

6.2.1 Esetszám

A fő probléma a statisztikai összehasonlításainkkal, hogy kis esetszámmal dolgoztunk (Négyessy és mtsai. 2013; Ashaber és mtsai 2014; Pálfi és mtsai. 2018). Ez egy általános probléma a főemlős kísérletek esetén, ahol a limitált esetszámot az adatgyűjtési módszerek növelésével lehet ellensúlyozni. A statisztikai tesztek ereje ennek megfelelően nem elég erős, habár a kvantitatív adatok összhangban vannak a kvalitatív adatokkal (Pálfi és mtsai. 2018). Példaként említve a 32. ábrán látható, hogy mindkét jelölődés esetében a jel oldalirányú kiterjedésének vizsgálatakor a szomszédos áréán belül alacsonyabb sűrűségű és kisebb kiterjedésű volt a jelölődés, mint az injektált áréában. Ez összhangban van a kvantitatív adatokkal (21. ábra, 29. ábra). Nagy szórás a nyers adatokban volt megfigyelhető, mint például a távolság és terület értékek, ez az ilyen típusú adatok mintavételezési érzékenységére hívja fel a figyelmet (Vezoli és mtsai. 2004). Az egyéni különbségek csökkentése érdekében arányokat képeztünk. Fontos megjegyezni, hogy a legsűrűbb jelölődésű területeket vizsgáltuk, a BDA által jelölt területeknek ez csak egy részét fedi le. Az elemszámbecslés megmutatta, hogy a 80%-os megbízhatóság eléréséhez az esetszámot meg kellett volna háromszoroznunk.

6.2.2 Kétirányú nyomkövetés

A kis és nagy molekulásúlyú BDA keverékének használata lehetővé teszi a kétirányú neuronális pályajelölést főemlős agykéregben (Rockland és Knutson 2000; Rockland és Knutson 2001; Li és mtsai. 2003). A módszer lehetséges hátránya, hogy a retrográd módon jelölődött neuronokból induló axonokba a festék „visszatöltődik” távol a beadási helytől. Ez tehát indirekt módon egy másodlagos célterület megjelenéséhez vezet. A mi esetünkben ez a jelenség elhanyagolhatónak tűnik (Négyessy és mtsai. 2013; Ashaber és mtsai 2014). Először is a hosszú axonok, amelyek nagy távolságban követhetők, leginkább a beadási helytől indulnak (25. ábra, 26. ábra, 39. ábra). Ez a mintázat nem figyelhető meg vagy elenyesző mértékű az elsődlegesen retrográd módon jelölődött neuroncsoportok körül. Másodszer néhány terminális arborizáció-szerű struktúrát olyan helyen figyeltünk meg, ahol a retrográd jelölődés hiányzott, és ezeket a terminális foltokat is hosszú axonok kötötték össze a beadási hellyel (25. ábra, 26. ábra). Harmadszor a feltérképezett axonok elágaznak a terminális foltok felé, azt sugallva, hogy ezek az axonok kifelé vezető irányai a beadási helytől. Legfontosabb azonban, hogy a terminális foltok a magas retrográd jelölődésű területeken vannak, amíg az axonok visszatöltődése esetén a retrográdan nem jelölődött területeken is meg kellene jelenniük (32. ábra).

Az eredményeket befolyásolhatta még a beadás utáni túlélési idő és a kísérlet során fellépő műtéti különbségek (Négyessy és mtsai. 2013; Ashaber és mtsai 2014). Az elegendő hosszúságú túlélési idő kritikus a terminális arborizációk megfelelő erősségű jelölődéséhez. A 10K molekulásúlyú BDA a 3K molekulásúlyú BDA-hoz hasonlítva szelektívebb anterográd tracer (Rockland és Knutson 2000) és lassabb a neuronális transzportja, ami megmagyarázza az anterográd jelölődés hosszabb túlélési idő igényét. Egy másik tényező a beadásokhoz használt üvegkapillárisok átmérője. Vastagabb kapilláris esetében előfordulhat, hogy több tracer jutott az agyszövetbe, amely így több retrográd és anterográd jelet, de hasonló „core” régió átmérőt eredményezett. Az elektrofiziológias térképezés során okozott bármilyen sérülés is befolyásolhatja a BDA transzportját. A jelölődés egységes mintázata ezen faktorok nagy hatását a kapott eredményekre elhanyagolhatóvá teszi.

6.2.3 Rétegeloszlás

A BDA jelölődés rétegeloszlásának vizsgálata is felvet kérdéseket. A nagyobb arányú szupragranuláris jelölődés megegyezik az irodalomban található adatokkal, habár Burton és Fabri (1995) magasabb infragranuláris arányokról számoltak be. A szupragranuláris jelölődés megléte a primer szomatoszenzoros kéreg ezen áréaiban megfelel a hierarchikus összeköttetések szerveződésnek (Barone és mtsai. 2000; Vezoli és mtsai. 2004). A metszetek mintavételezésének hátránya, hogy a tangenciális metszés és a metszetek közötti kihagyások miatt a pontos rétegi lokalizáció nem lehetséges, ez csak koronális metszeteken lenne megvalósítható.

6.2.4 Az anatómiai és funkcionális térképek illesztésének pontossága

A módszertan egy másik fontos kérdése, hogy az agyszövet épségének megőrzése érdekében nem készítettünk nagyon részletes funkcionális térképet, így az áréák és ujjbegy reprezentációk közötti határvonalak meghúzása nem precíz. Az egy csoportba tartozó esetek egymást jól támogató adatai valamint az IOS mérések eredményei miatt azonban erre nem is volt szükség (Négyessy és mtsai. 2013; Ashaber és mtsai 2014).

Az illesztés pontosságával kapcsolatban meg kell jegyeznünk, hogy nagyon sok faktor okozhatott hibát: az agyfelszíni képhez használt fotó optika és a mikroszkóp szférikus aberrációja, hisztológia, rekonstrukciós módszerek. A mikroszkóp szférikus aberrációjából eredő hibát ki tudtuk küszöbölni panorámaképek készítésével, valamint azzal, hogy a térképezést a látótér közepén végeztük. Ha a kísérletünket a V1-ben végzett hasonló kísérletekhez (pl.: Ts'o és Gilbert 1988; Malach és mtsai. 1993; Levitt és mtsai. 1994; Bosking és mtsai. 1997; Kisvárday és mtsai. 1997; Sincich és Blasdel 2001; Ts'o és mtsai. 2001; Buzás és mtsai. 2006) hasonlítjuk, akkor láthatjuk, hogy mi viszonylag nagyobb területek összeköttetéseit vizsgáltuk, ami a pontos illesztést még nehezebbé teszi. Mindenesetre az illesztési folyamat során megpróbáltunk a lehető legnagyobb fokú precizitásra törekedni, és a beadási helyek környezetét alkotó területek illesztésének pontosságában megbízunk, mivel a különböző módszerekkel nyert adatok jól alátámasztják egymást. Az illesztés során észlelt a beadási helytől távolabbi, a vizsgálatban már nem szereplő áréákban található, eltérések alapvetően nem változtatják meg megállapításainkat.

6.2.5 A terminális arborizációk azonosítása

Egyes tanulmányok leírták a terminális arborizáció-szerű jelölődés foltos megjelenését a szomatoszenzoros kéregben (Krubitzer és Kaas 1990; Lund és mtsai. 1993; Manger és mtsai. 1997) azzal a megfigyeléssel kiegészítve, hogy az anterográdj jelölődés foltos megjelenése a szomatoszenzoros kéregben kevésbé volt egyértelmű, mint a vizuális kéregben. Ebben a tanulmányban a terminális arborizációk foltos elrendeződést mutattak, habár az ezeken belüli jel denzitás változó volt, emiatt a kisebb jeldenzitású terminális arborizációk körülhatárolása nehezebb volt és a gyengébben jelölődtek pedig kimaradhattak az analízisből. A terminális arborizációk körülhatárolása konzisztensen történt (Négyessy és mtsai. 2013; Ashaber és mtsai. 2014). A terminális arborizációk mérete hasonló a már leírt adatokhoz (Lund és mtsai. 1993; Sincich és Blasdel 2001). Továbbá a terminális arborizációk hasonló méretűek (200-300 μm), mint a korábbi vizsgálatokban leírt különböző taktilis almodalitások funkciós doménjei (Chen és mtsai. 2001; Friedman és mtsai. 2004).

A feltételezett célterületek közül, csak a terminális arborizációkban találtunk magas bouton-szerű struktúra sűrűséget (Négyessy és mtsai. 2013; Ashaber és mtsai. 2014). Ez bizonyítja, hogy a terminális arborizációk a primer szomatoszenzoros kéregben a disztális ujjbegy reprezentációk specifikus célterületei.

6.2.6 A különböző típusú GABAerg interneuronok fluoreszcens jelölése

A többszörös fluoreszcens immunjelölés glutáraldehid fixált főemlős metszeteken nagy kihívást jelentett, mivel a lipofuscin pigmentek okozta autofluoreszcenciát a glutáraldehides fixálás tovább erősítette. A többszöri műtét és mérések (koponya megnyitása, elektrofiziológiai mérések, pályajelölő beadása) hatására a gliasejtek aktiválódnak (Xu és mtsai., 2007). Az életkor előrehaladtával a fiziológiásan megjelenő mikrogliaák száma nő, így azok hamarabb tudnak stimulációra aktiválódni (Sheffield és Berman, 1998). A sejtek egyik tulajdonsága a bennük található mitokondriumokra és lizoszómákra visszavezethető autofluoreszcencia. E két sejtalkotó közül a posztmitotikus sejtekben, így a neuronokban és glia sejtekben is, a lizoszómákból autofagocitózis útján keletkező lipofuscin szemcsék okozzák a nagyobb problémát. A lipofuscin szemcsék excitációs és emissziós spektruma elég széles és számuk az életkor előrehaladtával nő, így nagyban megnehezítik a fluoreszcens jelölést. Főemlős kísérleteknél a 3R szabály (replacement, reduction, refinement) figyelembe

vétele miatt fiatalabb állatok felhasználása nem alkalmazható. Schnell és mtsai. (1999) két féle módszert vizsgáltak meg a lipofuscin okozta autofluoreszcencia csökkentésére majomban: réz-szulfát vagy szudán fekete B kezelést. Mindkét módszer csökkenti a lipofuscin-szerű fluorofórok intenzitását és kompatibilisek fluoreszcens immuncitokémiai jelöléssel valamint retrográd jelöléssel, habár az immuncitokémiai jelölés intenzitását csökkentik, de a specifikus jelölés határain belül.

A másik problémát a különböző típusú GABAerg interneuronok immunjelölése jelentette, amely nem adott minden esetben összehasonlításra alkalmas eredményt. Ezért az értekezésben csak a PV és SOM jelölés elemzését mutattuk be. Az immunreaktivitás hiányának több oka lehet: az állatok kora, a metszetek nem megfelelő feltárása, az ellenanyag főemlősben nem mutat specifitást, a glia aktivitás fokozódása a többszöri műtét és elektrofiziológia miatt. A felsorolt problémák okozhatták az általunk tapasztalt kis jel/zaj arányt (Pálfi és mtsai. 2014; Pálfi és mtsai. 2016).

6.3 A populációs kapcsolatok anatómiai alapjai a kéregben

6.3.1 Kapcsolatok oldalirányú kiterjedése és a hierarchikus szerveződése

Eredményeink alátámasztják azokat a vizuális kéregben tett megfigyeléseket miszerint a leszálló kapcsolatokat létesítő neuronok és efferens terminális arborizációk nagyobb laterális kiterjedést mutatnak, így nagyobb területről érkező információt integrálnak, mint a felszálló kapcsolatok (Angelucci és Bressloff 2006; Markov és mtsai., 2014). Így tehát a BA3b-ben megfigyelt BA1-ből eredő leszálló afferens terminális arborizációk nagyobb kérgi területről vetítenek információt, mint az injektált áréában található neuronok. Ezzel ellentétben BA1-ben az intraaréálisan jelölt neuronok fednek le nagyobb kérgi területet, mint a BA3b-ből érkező felszálló terminális arborizációk, melyek erőteljes konvergenciát mutatnak (Pálfi és mtsai. 2018). Ezek az eredményeink összhangban állnak Juliano és mtsai. (1990) megfigyeléseivel, miszerint a felszálló afferensek a homológ szomatotópiás területeket kapcsolják össze, míg a leszálló afferensek a heterológ szomatotópiás reprezentációkat érik el. A heterológ szomatotópiás területekről érkező leszálló efferens terminális arborizációk részt vehetnek az ecRF tulajdonságok kialakításában a vizuális kéregben megfigyeltekhez hasonlóan (Angelucci és Bressloff 2006). Ezt alátámasztja az is, hogy a leszálló efferens terminális arborizációk nagy területen való kiterjedése retrográdan kevésbé sűrűn jelölt

területeken történt a beadási áréában. Az ecRF tulajdonságon keresztül a leszálló kapcsolatok modulálják a cRF tulajdonságokat (Angelucci és Bressloff 2006; Markov és mtsai. 2013, 2014). A BA1-nél magasabb hierarchiájú területekről a BA3b-be érkező visszacsatolás (pl.: BA5, Burton és Fabri 1995; Pearson és Powell 1978) nagyobb horizontális kiterjedést mutathat (BA3b-ben), mint a BA1-ből érkezőké. Ez még tovább fokozza a heterológ ecRF hatást a cRF-re.

A CMF segítségével kiszámolt reprezentált bőrfelület nagysága megmutatta, hogy a leszálló kapcsolatot képező terminális arborizációk heterológ szomatotopikus információt közvetítenek BA3b felé, valamint BA1-ben a kiterjedtebb oldalirányú kapcsolatok nagyobb perifériás integrációt valósítanak meg, mint a BA3b-ben találhatóak (Sathian 2016; Yau és mtsai. 2016). Mindezek a megfigyelések alátámasztják, hogy hierarchikus viszonyában BA1 magasabb rendű áréa, mint BA3b és fontos szerepet játszik az ecRF tulajdonságok kialakításában BA3b-ben (Pálfi és mtsai. 2018).

6.3.2 A kérgi populációs válasz anatómiai alapjai

A populációs aktivitást két tényező adja (Favorov és Whitsel 1988): az erős bemenettel adó intrinzik kapcsolatok sűrűn jelölt neuronokjai és az ezekkel átfedő konvergáló felszálló axonok. Az intrinzik kapcsolatokat kilakító axonok és a leszálló kapcsolatok képesek növelni a populációs aktivitás méretét.

Azt találtuk, hogy a populációs RF-hez hasonlóan az IOS mérés során aktiválódott terület mérete változott az adott áréára jellemző CMF-nek megfelelően (a vizuális kéreben a CMF inverz kapcsolatban van az excentricitással) és BA3b esetében nagyobb volt, mint BA1-ben, ahogy azt már Friedman és mtsai (2008) korábban leírták (Pálfi és mtsai. 2018). BA1-ben konzekvensen nagyobb bőrfelület reprezentálódik az afferensek és efferensek esetében is a vizuális kéreg populációs receptív mező méretéhez hasonlóan, amely nő a csökkenő CMF-fel (Harvey és Dumoulin 2011). A leszálló kapcsolatok oldalirányú kiterjedésének vizsgálata megmutatta, hogy a kérgi interakciókban résztvevő területek mérete függ az adott áréa hierarchiában elfoglalt helyétől (Pálfi és mtsai. 2018).

Tanulmányunk azt sugallja, hogy két szomszédos, egymással kapcsolatban álló terület kapcsolati felépítése populációs szinten a kérgi feldolgozáshoz egy azonos kapcsolati mintázatot használ.

6.3.3 A bemenet klaszteres szerveződése

BA3b-ben több klasztert találtunk, ami arra utal, hogy ebben az áréában a neuronok nagyobb hajlandósággal képeznek csoportokat (Pálfı és mtsai. 2018). Markov és mtsai. (2014) kettős retrográd jelöléssel kimutatták, hogy a vizuális kéregben a szupragranuláris neuronok nagyobb csoportosulást mutatnak. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a két áréában eltérő számban elıforduló neuronok okozzák a különbséget, mivel BA3b-ben nagyobb neuron sőrúséget találunk, mint BA1-ben (Sur és mtsai. 1982). Az intra- és interárealis neuron sőrúség BA3b beadás után mutat nagyobb különbséget (20. ábra), ennek az lehet az oka, hogy a granuláris réteg nagyban hozzájárul a BA3b-ben található neuronok sőrúségének emeléséhez (Sur és mtsai. 1982). A granuláris réteget adó neuronok a lokális kapcsolathálózat kialakításáért felelısek az áréában (nagyreszt felszálló kapcsolatokat képeznek). Azt találtuk, hogy az intra- és interárealis klaszterszámok között nagyobb a különbség BA3b beadás után, ami BA1-re is igaz csak kisebb mértékben (Pálfı és mtsai. 2018). Az intrinzik kapcsolatoknál várható a BA3b nagyobb klaszterezettsége, mert az interárealis neuronok klaszteresedése is nagyobb BA3b-ben, mint BA1-ben. Ez azt sugallja, hogy az eltérő klaszterszámok a két áréában nem csak az eltérő szemcsesejt sőrúség különbségekbıl adódnak. Továbbá ezek az eredményeink összhangban vannak Herculano-Houzel és mtsai. (2008) által leírtakkal, miszerint a különbözı áréák kolumnái változó mennyiségő kapcsolatot képeznek a szomszédos területekkel és egymással.

6.3.4 A szomatoszenzoros kérgi kapcsolatok anizotróp eloszlása

Azt találtuk, hogy az anizotrópia kifejezettebb a terminális arborizáció eloszlás esetében, mint a neuronoknál (Pálfı és mtsai. 2018). A felszálló kapcsolatok erısen konvergálnak, így ott nincs anizotrópia. Az áréák között fıleg a leszálló axonok mutatnak anizotrópiát. Érdekes módon azt is megállapítottuk, hogy kisebb mértékben, de az interárealis felszálló kapcsolatok is anizotropikus jellegűek, és hasonló medio-laterális eloszlást mutatnak az áreán belüli kapcsolathoz. Ez azt mutatja, hogy az ujjbegyek reprezentációi közötti integráció a BA3b és BA1 elsődleges feladata.

6.3.5 Funkcionális megfontolások

Az eredményeink másik érdekes aspektusa az almodalítások integrációja BA3b-ben egy sejt szinten. Pei és mtsai. (2009) megmutatták, hogy BA3b-ben a neuronok

jelentős hányada gyorsan és lassan adaptálódó stimulusokra is válaszol. A szerzők azt feltételezik, hogy a kevert RF válasz a különböző csatornákból érkező talamokortikális bemenet konvergenciájának köszönhető. Habár a stimulus hosszának (≥ 62 ms) és a neuron válasz késési időnek (≥ 100 ms) a stimulus és a neuronális válasz megjelenése közötti ismeretét tekintve, az eredmények magyarázhatók a BA3b és BA1 interakciójával is. Ahogy bemutattuk a BA3b és BA1 között található egy gyors információátvitelt lehetővé tevő pálya, amely az RA1 válaszokat gyorsan továbbjuttatja BA1-ből BA3b-be (Pálfi és mtsai. 2018). BA1 kevesebb SA neuron található, így a BA3b-be továbbított információ nagyobb része RA neuronból származik (Kaas 2004b). Ebben az értelemben az RA1 karakterisztikájának késői OFF válaszként való megjelenését a BA3b kevert almodalitás válasz tulajdonságú neuronjai okozzák (Pei és mtsai. 2009). Egy másik lehetséges magyarázat lehet a BA3b-ben található különböző almodalitásokkal rendelkező modulok interakciója (Sur és mtsai. 1981; Chen és mtsai. 2001). Eredményeink további alátámasztást nyújtanak az áréakon belüli integráció szerepének fontosságáról azzal, hogy megmutatja az injektált áréakon belül a terminális arborizációk nagyobb oldalirányú kiterjedést mutatnak, mint a retrográdan legsűrűbben jelölődött területek, amelyek az injektált disztális ujjbegy reprezentációs területének lokális bemeneti területei.

6.4 Kérgi gátlás

Rágcsálók esetében a primer szomatoszenzoros kéreg barreljeiben a gátló interneuronok eloszlása és szerepe jobban megértett, mint főemlősök esetében (Staiger és mtsai. 1997; Dávid és mtsai. 2007; Xu és Callaway 2009). A PV és SOM pozitív sejtek vizsgálata, mint a két legnagyobb genetikailag azonosított interneuron csoport (Markram és mtsai. 2004), azt mutatta, hogy megjelenésükre nem jellemző rétegpreferencia az elsődleges szomatoszenzoros és motoros kéregben főemlősben. Rágcsálók szomatoszenzoros kérgében mind a PV, mind a SOM pozitív sejtek homogén rétegi eloszlást mutatnak (Pohlkamp és mtsai. 2014). A PV pozitív sejtek beidegzése esetében nem találtunk terület specificitást, míg a SOM pozitív sejtek esetében elmondható, hogy a beadási áréában magasabb arányban találtunk közeli kontaktusokat. Általánosságban elmondható, hogy a jelölt afferensek nagyobb valószínűséggel végződtek PV interneuronon mindkét beadás esetében, amíg a SOM interneuronokkal létesített kapcsolatok aránya nagyon változó volt alacsony előfordulással BA1 beadás

után és magas előfordulással BA3a beadás után. Mindez a rágcálók szomatszenzoros kérgében leírt irodalmi adatokkal összevág, miszerint a PV pozitív sejtek alkotják a GABAerg sejtek legnagyobb csoportját (Markram és mtsai. 2004; Rudy és mtsai. 2011) és a PV sejtek erős serkentő bemenetet kapnak a szupragranuláris rétegekből (Xu és Callaway 2009). A SOM pozitív sejtek a GABAerg populáció 30%-át alkotják (Lee és mtsai. 2010) és jól beágyazottak a lokális neuronhálózatba, ahol leginkább a környező piamissejttekkel létesítenek szinaptikus kapcsolatot (Urban-Ciecko és mtsai. 2016).

6.4.1 Funkcionális következtetések

Az egyszerű és komplex taktilis stimulus által okozott kérgi mintázat BA3b-ben és BA1-ben különbözik. Ez idézheti elő a von Békésy tölcserillúziót (Chen és mtsai, 2003; Friedman és mtsai, 2008). Az illúzió alapja a két áréában meglévő intrinzik kapcsolat és ez a gátlással kiegészülve felerősítheti a gyenge stimulusokat (Roe és mtsai. 2017). Valamint feltehetőleg a kölcsönös gátlás eredményeképp egyidejű azonos kézen lévő ujjbegyek stimulációra válaszerősség csökkenést mutatnak (Friedman és mtsai. 2004).

Valamint a gátlásnak lehet még szerepe a plaszticitásban, mert deafferentáció esetén (ujj, kar elvesztése) „unmasking” történik. Tehát az addig gátlás alatt lévő területek kimutathatóvá válnak a megmaradt környező területek ingerlésével (Merzenich és mtsai. 1984).

7 Összefoglalás

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. Korábban az SI-ben nem vizsgált a laterális kérgi kapcsolatok anatómiai alapjainak több hierarchikusan releváns jellemzőjét írtuk le az áréán belüli, fel- és leszálló kapcsolatok horizontális eloszlásának összehasonlításával. Megvizsgáltuk még az anterográd jelölődés célsejt szelektivitását GABAerg gátló interneuronokon.

- 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 ecRF 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.
- A BA3b és BA1-ben található vetítő neuronok klaszterezettsége eltérő volt, ami a BA3b és BA1-ben található RF-k eltérő méretéből adódhat.
- 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.
- 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.
- Az SI- ben található gátló interneuronok és az ezeknek a sejteknek bemenetet adó anterográd jelölődés kapcsolatának vizsgálata megmutatta, hogy a

főemlősökben és rágcsálókban található sejteloszlás és bemeneti kapcsolatok mintázata hasonló.

8 Summary

In this study we compared the lateral spread of inputs (projection neurons) and targets (efferent axonal patches) of column size cortical sites in the distal finger pad representations of the reciprocally connected and hierarchically organized somatosensory cortical BA3b and BA1. Notably, the analysis focused on the regions with high connectional densities, low density, more diffuse connections were not studied here. Several hierarchically relevant characteristics of the anatomical basis of lateral cortical interactions were explored, which were not studied before in the SI, by comparing the spread of intrinsic, feedforward and feedback connections.

- The lateral spread of the feedforward connections are the most restricted and can form the connectional basis of RF hotspot in SI. On the contrary, the large lateral spread of the feedback and intrinsic connections suggest their role in formation of the ecRF and, more generally, in tactile integrative processing both in terms of somatotopy and submodality in SI.
- We also show, that, although, the cortical spread of intrinsic connections is not remarkably different in BA3b and BA1, the smaller CMF results in a more widespread spatial integration of the peripheral input from the skin in BA1 than in BA3b.
- A further remarkable difference between the two areas were found in the clustering of the projection neurons, which can be related to the different size of the RF-s in BA3b and BA1.
- The spread of the intra-areal feedforward and feedback connections relative to the OIS-area also reveals that these connections contribute to the cortical population response in a different extent.
- We also show that similar to the intrinsic connections feedforward and feedback are also anisotropically distributed .
- Regarding the dynamics of interactions, the results show the existent of a fast conducting inter-areal pathway, similar to what have been described in the visual cortex.
- Regarding inhibitory interneurons we found that the target specificity of the connections exhibit similar patterns to that in the rodents and primates.

9 Irodalomjegyzék

- Angelucci A, Bressloff PC. (2006). Contribution of feedforward, lateral and feedback connections to the classical receptive field center and extra-classical receptive field surround of primate V1 neurons. *Prog. Brain Res.* 154: 93–120.
- Angelucci A, Levitt JB, Lund JS. (2002). Anatomical origins of the classical receptive field and modulatory surround field of single neurons in macaque visual cortical area V1. *Prog. Brain Res.* 136:373-88.
- Ashaber M, Pálfı E, Friedman RM, Palmer C, Jáklı B, Min L, Kántor O, Roe AW, Négyessy L. (2014). 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):1769-85.
- Atallah BV, Bruns W, Carandini M, Scanziani M. (2012). Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron.* 73(1): 159–170.
- Azzopardi P, Cowey A. (1993). Preferential representation of the fovea in the primary visual cortex. *Nature.* 361(6414): 719–721.
- Bair W. (2005). Visual receptive field organization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15(4), 459–464.
- Bardy C, Huang JY, Wang C, Fitzgibbon T, Dreher B. (2009). “Top-down” influences of ipsilateral or contralateral postero-temporal visual cortices on the extra-classical receptive fields of neurons in cat’s striate cortex. *Neuroscience.* 158(2): 951–968.
- Barlow HB, Blakemore C, Pettigrew JD. (1967). The neural mechanism of binocular depth discrimination. *J. Physiol.* 193(2):327-42.
- Barone P, Batardiere A, Knoblauch K, Kennedy H. (2000). Laminar distribution of neurons in extrastriate areas projecting to visual areas V1 and V4 correlates with the hierarchical rank and indicates the operation of a distance rule. *J. Neurosci.* 20(9): 3263–81.
- Beaulieu C. (1993). Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special

reference to the GABA population. *Brain Res.* 609(1–2): 284–292.

- Bensmaia SJ, Denchev PV, Dammann JF, Craig JC, Hsiao SS. (2008). The Representation of Stimulus Orientation in the Early Stages of Somatosensory Processing. *J. Neurosci.* 28(3): 776–786.
- Bosking W H, Zhang Y, Schofield B, Fitzpatrick D. (1997). Orientation selectivity and the arrangement of horizontal connections in tree shrew striate cortex. *J. Neurosci.* 17(6): 2112–2127.
- Burton H, Fabri M. (1995). Ipsilateral intracortical connections of physiologically defined cutaneous representations in areas 3b and 1 of macaque monkeys: Projections in the vicinity of the central sulcus. *J. Comp. Neurol.* 355(4): 508–538.
- Buzás P, Kovács K, Ferecskó AS, Budd J ML, Eysel U T, Kisvárday Z F. (2006). Model-Based Analysis of Excitatory Lateral Connections in the Visual Cortex. *J. Comp. Neurol.* 881(3). 499–861.
- Catania KC, Leitch DB, Gauthier D. (2011). A star in the brainstem reveals the first step of cortical magnification. *PLoS One.* 6(7): e22406.
- Chen LM, Friedman R M, Ramsden BM, LaMotte RH, Roe AW. (2001). Fine-scale organization of SI (area 3b) in the squirrel monkey revealed with intrinsic optical imaging. *J. Neurophysiol.* 86(6): 3011–3029.
- Chen LM, Friedman RM, Roe AW. (2003). Optical imaging of a tactile illusion in area 3b of the primary somatosensory cortex. *Science.* 302(5646):881-885. Chen LM, Friedman RM, Roe AW. (2005). Optical imaging of SI topography in anesthetized and awake squirrel monkeys. *J. Neurosci.* 25(33): 7648–59.
- Chen LM, Turner G H, Friedman RM, Zhang N, Gore JC, Roe AW, Avison MJ. (2007). High-Resolution Maps of Real and Illusory Tactile Activation in Primary Somatosensory Cortex in Individual Monkeys with Functional Magnetic Resonance Imaging and Optical Imaging. *J. Neurosci.* 27(34): 9181–9191.
- Costanzo R M, Gardner EP. (1980). A quantitative analysis of responses of direction-sensitive neurons in somatosensory cortex of awake monkeys. *J. Neurophysiol.* 43(5): 1319–1341.

- Daniel PM, Whitteridge D. (1961). The representation of the visual field on the cerebral cortex in monkeys. *J. Physiol.* 159(2): 203–221.
- Dávid C, Schleicher A, Zuschratter W, Staiger JF. (2007). The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat. *J. Neurosci.* 25(8): 2329–40.
- Ester M, Kriegel HP, Sander J, Xu X. (1996). A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise. *KDD-96 Proc.* 34: 226–231.
- Favorov O, Whitsel B L. (1988). Spatial organization of the peripheral input to area 1 cell columns. I. The detection of “segregates”. *Brain Res.* 472(1): 25–42.
- Federer F, Williams D, Ichida JM, Merlin S, Angelucci A. (2013). Two projection streams from macaque V1 to the pale cytochrome oxidase stripes of V2. *J. Neurosci.*, 33(28): 11530–11539.
- Felleman DJ, Van Essen D C. (1991). Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb. Cortex.* 1(1): 1–47.
- Friedman RM, Chen LM, Roe AW. (2004). Modality maps within primate somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(34): 12724–9.
- Friedman RM, Chen LM, Roe AW. (2008). Responses of areas 3b and 1 in anesthetized squirrel monkeys to single- and dual-site stimulation of the digits. *J Neurophysiol.* 100(6): 3185–3196.
- Gentet LJ. (2012). Functional diversity of supragranular GABAergic neurons in the barrel cortex. *Front. Neural Circuits.* 6: 52.
- Gilbert CD, Wiesel TN. (1989). Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 9(7): 2432–2442.
- Gonchar Y, Burkhalter A. (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb. Cortex.* 7(4): 347–358.
- Harrison LM, Stephan KE, Rees G, Friston KJ. (2007). Extra-classical receptive field effects measured in striate cortex with fMRI. *Neuroimage:* 34(3): 1199–1208.
- Harvey BM, Dumoulin SO. (2011). The relationship between cortical magnification

- factor and population receptive field size in human visual cortex: constancies in cortical architecture. *J. Neurosci.* 31(38): 13604–13612.
- Henry CA, Joshi S, Xing D, Shapley RM, Hawken MJ. (2013). Functional characterization of the extraclassical receptive field in macaque V1: contrast, orientation, and temporal dynamics. *J. Neurosci.* 33(14): 6230–6242.
- Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH, Lent R. (2008). The basic nonuniformity of the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(34): 12593–12598.
- Hsiao S. (2008). Central mechanisms of tactile shape perception. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18(4): 418–424.
- Hyvarinen J, Poranen A. (1978). Movement-sensitive and direction and orientation-selective cutaneous receptive fields in the hand area of the post-central gyrus in monkeys. *J. Physiol.* 283: 523–537.
- Hubel DH, Wiesel TN. (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* 160:106-54.
- Iwamura Y, Tanaka M, Sakamoto M, Hikosaka O. (1983a). Functional subdivisions representing different finger regions in area 3 of the first somatosensory cortex of the conscious monkey. *Exp. Brain Res.* 51:315–326.
- Iwamura Y, Tanaka M, Sakamoto M, Hikosaka O. (1983b). Converging patterns of finger representation and complex response properties of neurons in area 1 of the first somatosensory cortex of the conscious monkey. *Exp. Brain Res.* 51:327–337.
- Iwamura Y, Tanaka M, Sakamoto M, Hikosaka O. (1993). Rostrocaudal gradients in the neuronal receptive field complexity in the finger region of the alert monkey's postcentral gyrus. *Exp. Brain Res.* 92(3): 360–368.
- Iwamura Y. (1998). Hierarchical somatosensory processing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8(4):522-8.
- Jeffs J, Ichida JM, Federer F, Angelucci A. (2009). Anatomical evidence for classical and extra-classical receptive field completion across the discontinuous horizontal meridian representation of primate area V2. *Cereb. Cortex.* 19(4): 963–981.

- Johansson RS, Flanagan JR. (2010). Tactile Sensory Control of Object Manipulation in Humans. *Senses A Compr. Ref.* 6: 67–86.
- Jones EG. (1975). Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 160:205–267.
- Jones EG, Coulter JD, Hendry SH. (1978). Intracortical connectivity of architectonic fields in the somatic sensory, motor and parietal cortex of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 181(2): 291–347.
- Juliano SL, Friedman DP, Eslin DE. (1990). Corticocortical connections predict patches of stimulus-evoked metabolic activity in monkey somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 298(1): 23–39.
- Kaas JH. (2004a). Evolution of somatosensory and motor cortex in primates. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 281(1): 1148–1156.
- Kaas JH. (2004b). Somatosensory cortex. *Reference Module in Biomedical Sciences* (főszerkesztő: Michael Caplan). Academic Press, ISBN: 978-0-12-801238-3. pp:73-77.
- Kaas JH, Nelson RJ, Sur M, Lin CS, Merzenich MM. (1979). Multiple representations of the body within the primary somatosensory cortex of primates. *Science.* 204(4392): 521–523.
- Kandel ER, Jessel TM. (1991). Touch. Part V., Chapter 26. *Principles of neural science* (szerkesztette: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM). New York, Elsevier Science Publishing Co. ISBN 0-444-01562-0. pp: 367-384.
- Kántor O, Temel Y, Holzmann C, Raber K, Nguyen HP, Cao C, Türkoglu HO, Rutten BP, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, Blokland A, Korr H, Riess O, von Hörsten S, Schmitz C. (2006). Selective striatal neuron loss and alterations in behavior correlate with impaired striatal function in Huntington's disease transgenic rats. *Neurobiol. Dis.* 22(3): 538–547.
- Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. (1987). Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res.* 416(2): 369–374.

- Kisvarday ZF, Crook JM, Buzas P, Eysel UT. (2000). Combined physiological-anatomical approaches to study lateral inhibition. *J. Neurosci. Methods*. 103(1): 91–106.
- Kisvárday ZF, Tóth É., Rausch M, Eysel UT. (1997). Orientation-specific relationship between populations of excitatory and inhibitory lateral connections in the visual cortex of the cat. *Cereb. Cortex*. 7(7): 605–618.
- Krubitzer LA, Kaas JH. (1990). Cortical connections of MT in four species of primates: areal, modular, and retinotopic patterns. *Vis. Neurosci*. 5(2): 165–204.
- Lampl I, Katz Y. (2016). Neuronal adaptation in the somatosensory system of rodents. *Neuroscience*. 343: 66–76.
- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B. (2010) The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J. Neurosci*. 30(50):16796-16808.
- Levitt JB, Yoshioka T, Lund JS. (1994). Intrinsic cortical connections in macaque visual area V2: evidence for interaction between different functional streams. *J. Comp. Neurol*. 342(4): 551–570.
- Li H, Fukuda M, Tanifuji M, Rockland KS. (2003). Intrinsic collaterals of layer 6 Meynert cells and functional columns in primate V1. *Neuroscience*. 120(4): 1061–1069.
- Lipton ML, Liszewski MC, O'Connell MN, Mills A, Smiley JF, Branch CA, Isler JR, Schroeder CE. (2010). Interactions within the hand representation in primary somatosensory cortex of primates. *J. Neurosci*. 30(47): 15895–15903.
- London BM, Jordan LR, Jackson CR, Miller LE. (2008). Electrical Stimulation of the Proprioceptive Cortex (Area 3a) Used to Instruct a Behaving Monkey. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 16(1):32-36.
- Lorente de Nó R. (1949). The structure of the cerebral cortex. *Physiology of the nervous system*. 3rd edition. New York: Oxford University Press.
- Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A. (2012). Regulation of neuronal input

- transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat. Neurosci.* 15(3): 423–30.
- Lund JS. (1984). Spiny stellate neurons. *Cellular components of the cerebral cortex* (szerkesztette: Peters A és Jones EG). New York: Plenum Press 255–308.
- Lund JS, Angelucci A, Bressloff PC. (2003). Anatomical substrates for functional columns in macaque monkey primary visual cortex. *Cereb. Cortex.* 13(1): 15–24.
- Lund JS, Yoshioka T, Levitt JB. (1993). Comparison of intrinsic connectivity in different areas of macaque monkey cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 3(2): 148–162.
- Malach R, Amir Y, Harel M, Grinvald A. (1993). Relationship between intrinsic connections and functional architecture revealed by optical imaging and in vivo targeted biocytin injections in primate striate cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(22): 10469–10473.
- Manger PR, Woods TM, Muñoz A, Jones EG. (1997). Hand/face border as a limiting boundary in the body representation in monkey somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 17(16): 6338–51.
- Markov NT, Ercsey-Ravasz M, Van Essen DC, Knoblauch K, Toroczkai Z, Kennedy H. (2013). Cortical High-Density Counterstream Architectures. *Science.* 342(6158): 10–13.
- Markov NT, Vezoli J, Chameau P, Falchier A, Quilodran R, Huissoud C, Lamy C, Misery P, Giroud P, Ullman S, Barone P, Dehay C, Knoblauch K, Kennedy H. (2014). Anatomy of hierarchy: Feedforward and feedback pathways in macaque visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 522(1): 225–259.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(10): 793–807.
- Martin JH. (1991). Coding and processing of sensory information. Part V., Chapter 23., *Principles of neural science* (szerkesztette: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM). New York, Elsevier Science Publishing Co., ISBN 0-444-01562-0, pp: 329-340.
- Martin JH, Jessell TM. (1991). Modality coding in the somatic sensory system. Part V., Chapter 24., *Principles of neural science* (szerkesztette: Kandel ER, Schwartz JH,

- Jessell TM). New York, Elsevier Science Publishing Co., ISBN 0-444-01562-0, pp: 341-352.
- .Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cyander MS, Schoppmann A, Zook JM. (1984) Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J. Comp. Neurol.* 224(4):591-605.
- Meyer HS, Schwarz D, Wimmer VC, Schmitt AC, Kerr JND, Sakmann B, Helmstaedter M. (2011). Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(40): 16807–16812.
- Mountcastle VB, Berman A, Davies P. (1955). Topographic organization and modality representation in first somatic area of cat's cerebral cortex by method of single unit analysis. *Am. J. Physiol.* 183:646.
- Mountcastle VB. (1957). Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* 20(4): 408–434.
- Mountcastle VB, Powell TP. (1959). Neural mechanisms subserving cutaneous sensibility, with special reference to the role of afferent inhibition in sensory perception and discrimination. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 105: 201–232.
- Murayama M, Perez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, Larkum ME. (2009). Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature.* 457(7233): 1137–1141.
- Negwer M, Liu YJ, Schubert D, Lyon DC. (2017). V1 connections reveal a series of elongated higher visual areas in the California ground squirrel, *Otospermophilus beecheyi*. *J. Comp. Neurol.* 525(8): 1909–1921.
- Négyessy L, Pálfi E, Ashaber M, Palmer C, Jákl B, Friedman RM, Chen LM, Roe AW. (2013). Intrinsic horizontal connections process global tactile features in the primary somatosensory cortex: Neuroanatomical evidence. *J. Comp. Neurol.* 521(12): 2798-817.
- Nelson RJ, Sur M, Felleman DJ, Kaas JH. (1980). Representations of the body surface in postcentral parietal cortex of *Macaca fascicularis*. *J. Comp. Neurol.* 192(4): 611–643.

- Neumann M, Gabel D.(2002). Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 50(3):437-9.
- Oliveira VC, Carrara RC, Simones DL, Saggiaro FP, Carlotti CG Jr, Covas DT, Leder L. (2010). Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol Histopathol.* 25(8):1017-24.
- Passingham RE, Stephan KE, Kotter R. (2002). The anatomical basis of functional localization in the cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 3(8): 606–616.
- Pálfi E, Kántor O, Ashaber M, Roe AW, Friedman RM, Dávid Cs, Nitschke R, Négyessy L. (2014). 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. (2016). Selective targeting of inhibitory interneurons by sensorimotor cortical afferents in the non-human primate *Saimiri sciureus* *IBRO Workshop 2016, Budapest, Magyarország.*
- Pálfi E , Zalányi L , Ashaber M , Palmer C , Kántor O , Roe A W , Friedman R M , Négyessy L. (2018). Connectivity of neuronal populations within and between areas of primate somatosensory cortex. *Brain Struct. Funct.* 223:(6) 2949-2971.
- Pearson RC, Powell T P. (1978). The cortico-cortical connections to area 5 of the parietal lobe from the primary somatic sensory cortex of the monkey. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 200(1138): 103–108.
- Pei YC, Denchev PV, Hsiao SS, Craig JC, Bensmaia SJ. (2009). Convergence of submodality-specific input onto neurons in primary somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* 102(3): 1843–1853.
- Pei YC, Hsiao SS, Craig JC, Bensmaia SJ. (2010). Shape invariant coding of motion direction in somatosensory cortex. *PLoS Biol.* 8(2): e1000305.
- Pohlkamp T, Dávid C, Cauli B, Gallopin T, Bouché E, Karagiannis A, May P, Herz J, Frotscher M, Staiger JF, Bock HH. (2014). Characterization and distribution of Reelin-positive interneuron subtypes in the rat barrel cortex. *Cereb. Cortex.*

24(11):3046-58.

- Pons TP, Garraghty PE, Cusick CG, Kaas JH. (1985). The somatotopic organization of area 2 in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 241(4): 445–66.
- Pons TP, Wall JT, Garraghty PE, Cusick CG, Kaas JH. (1987). Consistent features of the representation of the hand in area 3b of macaque monkeys. *Somatosens. Res.* 4(4): 309–331.
- Rao RPN, Ballard DH. (1999). Predictive coding in the visual cortex: A functional interpretation of some extra-classical receptive-field effects. *Nat. Neurosci.* 2(1): 79–87.
- Ratzlaff EH, Grinvald A. (1991). A tandem-lens epifluorescence microscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *J Neurosci methods.* 36(2-3):127-37..
- Reed JL, Pouget P, Qi HX, Zhou Z, Bernard MR, Burish MJ, Haitas J, Bonds AB, Kaas JH. (2008). Widespread spatial integration in primary somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(29): 10233–10237.
- Reed JL, Qi HX, Pouget P, Burish MJ, Bonds AB, Kaas JH (2010a). Modular processing in the hand representation of primate primary somatosensory cortex coexists with widespread activation. *J Neurophysiol.* 104(6): 3136–3145.
- Reed JL, Qi, HX, Zhou Z, Bernard MR, Burish MJ, Bonds AB, Kaas JH. (2010b). Response properties of neurons in primary somatosensory cortex of owl monkeys reflect widespread spatiotemporal integration. *J Neurophysiol.* 103(4): 2139–2157.
- Ren JQ, AikY, Heizmann CW, Kosaka T. (1992). Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp. Brain Res.* 92(1): 1–14.
- Rockland KS. (2015). About connections. *Front. Neuroanat.* 9: 61.
- Rockland KS, Knutson T. (2000). Feedback connections from area MT of the squirrel monkey to areas V1 and V2. *J. Comp. Neurol.* 425(3): 345–368.
- Rockland KS, Knutson T. (2001). Axon collaterals of Meynert cells diverge over large portions of area V1 in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 441(2): 134–147.

- Rockland KS, Lund JS. (1983). Intrinsic laminar lattice connections in primate visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 216(3): 303–318.
- Roe AW, Ts'o DY. (2015). Specificity of V1-V2 orientation networks in the primate visual cortex. *Cortex.* 72: 168–178.
- Roe AW, Winberry JE, Friedman RM. (2017) Study of single and multidigit activation in monkey somatosensory cortex using voltage-sensitive dye imaging. *Neurophotonics.* 4(3): 031219.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71(1): 45–61.
- Sathian K. (2016). Analysis of haptic information in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 116(4): 1795–1806.
- Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 47(6): 719–730.
- Sekuler R, Blake R. (2004). Észlelés. Osiris Kiadó, ISBN 963-389-411-5, pp: 414.
- Sheffield LG, Berman NEJ. (1998). Microglial Expression of MHC Class II Increases in Normal Aging of Nonhuman Primates. *Neurobiol. Aging* 19(1): 47–55.
- Shmuel A, Korman M, Sterkin A, Harel M, Ullman S, Malach R, Grinvald A. (2005). Retinotopic axis specificity and selective clustering of feedback projections from V2 to V1 in the owl monkey. *J. Neurosci.* 25(8): 2117–2131.
- Sincich LC, Blasdel GG. (2001). Oriented axon projections in primary visual cortex of the monkey. *J. Neurosci.* 21(12): 4416–4426.
- Sincich LC, Jocson CM, Horton JC. (2010). V1 interpatch projections to v2 thick stripes and pale stripes. *J. Neurosci.* 30(20): 6963–6974.
- Sinclair RJ, Burton H. (1991). Neuronal activity in the primary somatosensory cortex in monkeys (*Macaca mulatta*) during active touch of textured surface gratings: responses to groove width, applied force, and velocity of motion. *J. Neurophysiol.* 66(1): 153–169.

- Sporns O. (2015). Cerebral cartography and connectomics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370(1668): 1–12.
- Sripati AP, Yoshioka T, Denchev P, Hsiao SS, Johnson KO. (2006). Spatiotemporal receptive fields of peripheral afferents and cortical area 3b and 1 neurons in the primate somatosensory system. *J. Neurosci.* 26(7): 2101–2114.
- Staiger JF, Freund TF, Zilles K. (1997). Interneurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) are extensively innervated by parvalbumin-containing boutons in rat primary somatosensory cortex. *Eur. J. Neurosci.* 9(11): 2259–2268.
- Sur M, Garraghty PE, Bruce CJ. (1985). Somatosensory cortex in macaque monkeys: laminar differences in receptive field size in areas 3b and 1. *Brain Res.* 342(2): 391–395.
- Sur M, Merzenich MM, Kaas JH. (1980). Magnification, receptive-field area, and “hypercolumn” size in areas 3b and 1 of somatosensory cortex in owl monkeys. *J. Neurophysiol.* 44(2): 295–311.
- Sur M, Nelson RJ, Kaas JH. (1982). Representations of the body surface in cortical areas 3b and 1 of squirrel monkeys: comparisons with other primates. *J. Comp. Neurol.* 211(2): 177–192.
- Sur M, Wall JT, Kaas JH. (1981). Modular segregation of functional cell classes within the postcentral somatosensory cortex of monkeys. *Science.* 212(4498): 1059–1061.
- Szentágothai J. (1975). The ‘module-concept’ in cerebral cortex architecture. *Brain Res.* 95(2-3):475-96.
- Thakur PH, Fitzgerald PJ, Hsiao SS. (2012). Second-order receptive fields reveal multidigit interactions in area 3b of the macaque monkey. *J. Neurophysiol.* 108(1): 243–62.
- Ts’o DY, Gilbert CD. (1988). The organization of chromatic and spatial interactions in the primate striate cortex. *J. Neurosci.* 8(5): 1712–1727.
- Ts’o DY, Roe AW, Gilbert D. (2001). A hierarchy of the functional organization for color, form and disparity in primate visual area V2. *Vision Res.* 41(10–11): 1333–1349.

- Urban-Ciecko J, Barth AL.(2016). Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nat. rev. Neurosci.* 17(7):401-409.
- Vezioli J, Falchier A, Jouve B, Knoblauch K, Young M, Kennedy H. (2004). Quantitative analysis of connectivity in the visual cortex: extracting function from structure. *Neuroscientist.* 10(5): 476–482.
- Wandell BA, Winawer J. (2015). Computational neuroimaging and population receptive fields. *Trends Cogn Sci.* 19(6): 349–357.
- Wang Z, Chen LM, Négyessy L, Friedman RM, Mishra A, Gore JC, R. A. (2013). The relationship of anatomical and functional connectivity to resting-state connectivity in primate somatosensory cortex. *Neuron.* 78(6): 1116–1126.
- Weber EH. (1846). Der Tastsinn und das Gemeingefühl. In R. Wanger (ed.), *Handwörterbuch der Physiologie*, Vol. III., Abt. 2., Braunschweig: Vieweg, pp: 481-588.
- Welker E, Van der Loos H. (1986). Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. *J. Neurosci.* 6(11): 3355–73.
- Xu HT, Pan F, Yang G, Gan WB. (2007). Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nat. Neurosci.* 10(5): 549–551.
- Xu X, Callaway EM. (2009). Laminar specificity of functional input to distinct types of inhibitory cortical neurons. *J. Neurosci.* 29(1): 70–85.
- Yarch J, Federer F, Angelucci A. (2017). Local Circuits of V1 Layer 4B Neurons Projecting to V2 Thick Stripes Define Distinct Cell Classes and Avoid Cytochrome Oxidase Blobs. *J. Neurosci.* 37(2): 422–436.
- Yau JM, Kim SS, Thakur PH, Bensmaia SJ. (2016). Feeling form: the neural basis of haptic shape perception. *J. Neurophysiol.* 115(2): 631–642.

10 Saját publikációk jegyzéke

10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Pálfi E, Zalányi L , Ashaber M , Palmer C , Kántor O , Roe A W , Friedman R M , Négyessy L

Connectivity of neuronal populations within and between areas of primate somatosensory cortex

BRAIN STRUCTURE & FUNCTION 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 kézrepresentációs területén főemlősökben"

ORVOSI HETILAP 157:(33) pp. 1320-1325. (2016) IF: 0.349 (2016)

Ashaber M , Pálfi E, Friedman RM , Palmer C , Jakli B , Chen LM , Kantor 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*).

JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 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.

JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 521:(12) pp. 2798-2817. (2013) IF: 3.508 (2013)

10.2 A disszertációhoz kapcsolódó konferencia kiadványokban közölt eredmények

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.

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.

10.3 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 STRUCTURE & FUNCTION 221: pp. 2963-2984. (2016) IF: 4.698 (2016)

Fekete Z , Pálfi E, Márton G , Handbauer M , Bérces Zs , Ulbert I , Pongrácz A , Négyessy L

In Vivo Iontophoretic BDA Injection through a Buried Microfluidic Channel of a Neural Multielectrode

PROCEDIA ENGINEERING 120: pp. 464-467. (2015)

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 AND TISSUE RESEARCH 359:(2) pp. 409-421. (2015) IF: 2.948 (2015)

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Négyessy Lászlónak, hogy odaifgyelő munkájával segítette szakmai fejlődésemet, kísérte végig munkámat és segítette a dolgozat megírását. Külön köszönet jár amerikai kollaborátorainknak, Dr. Anna W. Roe-nak , Dr. Limin Chen-nek és Dr. Robert M. Friedman-nak, akik a funkcionális vizsgálatokat végezték és Dr. Cory Palmer-nek aki a Voronoi számításokat készítette el. Köszönöm Dr. Ashaber Máriának a munkáját, aki a beadásoknál, a fény- és elektronmikroszkópos munkában valamint az analízisben segített. Köszönöm Dr. Zalányi László munkáját, aki a statisztikai elemzésben és a kernel sűrűségterképek elkészítésében volt segítségemre. Külön köszönet illeti Dr. Kántor Orsolyát az immunhisztokémiai kísérletekben való részvételeiért és szakmai tanácsaiért, Dr. Roland Nitschkét, hogy lehetőséget adott a konfokális képek kiváló körülmények között való elkészítésére Köszönettel tartozom az Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstani Intézet volt igazgatóinak Dr. Csillag Andrásnak és Dr. Gerber Gábornak valamint jelenlegi igazgatójának Dr. Szél Ágostonnak, hogy lehetővé tették munkámat. Magyar Tünde és Vidra Zsuzsa asszisztenseknek köszönöm a gördülékeny labormunka lehetővé tételét, akik a labormunkában vállaltak nagy szerepet, valamint a labor munkatársainak, hogy munkánkban segítséget nyújtottak. Köszönet illeti még az Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstani Intézet összes dolgozóját a kellemes munkakörnyezetért. Végül köszönöm családomnak, hogy biztattak és támogattak munkám során.