

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2935.

KORNAI ZSUZSANNA

**Embriológia, elméleti, kísérletes és klinikai fejlődésbiológia
című program**

Programvezető: Dr. Nagy Nándor, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Dávid Csaba, egyetemi docens

Képfeldolgozó módszerek fejlesztése neuron térképezéshez állatmodellekben

Doktori értekezés

Dr. Kornai Zsuzsanna
(Leánykori név: Dr. Almási Zsuzsanna)

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dávid Csaba, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Heinzlmann Andrea, PhD, egyetemi docens
Dr. Kálmán Mihály, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kellermayer Miklós, DSc,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Horváth Eszter, PhD,
tudományos munkatárs
Dr. Herberth-Minkó Krisztina, PhD,
egyetemi adjunktus

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. Az általunk használt modellállatok bemutatása	6
1.1.1. Szomatoszenzoros rendszer vizsgálatánál használt modellállatok.....	6
1.1.2. Cukorbetegség tanulmányozására használható állatmodellek	9
1.2. A vizsgált területek anatómiája.....	11
1.2.1. Egér poszterolaterális barrelmező	11
1.2.2. A barrelmező kapcsolatai	14
1.2.3. A szomatoszenzoros kéreg gátló sejt típusai.....	16
1.2.4. Az emlős retina felépítése	17
1.3. A diabétesz okozta retinakárosodás.....	18
1.4. Sztereológiai elvek.....	19
1.4.1. A mintavételi hely kiválasztása.....	22
1.4.2. Mintavételi módok, adatok extrapolálása	23
1.4.3. A sejtszámításhoz és rekonstrukcióhoz használt programok	24
2. Célkitűzés	26
3. Módszerek	27
3.1. A ZDF patkány, valamint Shaw-versenyegerének retináján végzett vizsgálatok	27
3.1.1. Immunhisztokémia	28
3.1.2. Fotódokumentáció.....	28
3.1.3. Retina vastagság meghatározása Shaw-versenyegere és ZDF patkányok esetén.....	28
3.1.4. Izodenzitás térképek.....	29
3.1.5. Statisztikai analízis.....	37
3.2. GABAerg neuronok eloszlásának vizsgálata során használt anyag és módszer ..	37

3.2.1. Szövetek feldolgozása és immunhisztokémia	38
3.2.2. Képfeldolgozás és rekonstrukció	40
3.2.3. Sejteloszlás rekonstrukciója	40
3.2.4. Adatfeldolgozás.....	42
3.2.5. Statisztikai analízis.....	43
4. Eredmények	44
4.1. ZDF patkányokon és Shaw-versenyegerén végzett kutatás eredményei.....	44
4.2. A szomatoszenzoros kéreg GABAerg neuronjainak eloszlása génmódosított egerekben.....	47
4.2.1. PVcre/tdTomato-expresszáló GABAerg neuronok eloszlása	47
4.2.2. SST- expresszáló GABAerg neuronok eloszlása	51
4.2.3. VIP – expresszáló GABAerg neuronok	53
5. Megbeszélés.....	56
6. Következtetések.....	64
7. Összefoglalás	67
8. Summary	68
9. Irodalomjegyzék.....	69
10. Saját publikációk jegyzéke	79
10.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények.....	79
10.2. Egyéb közlemények	79
11. Köszönetnyilvánítás.....	80

Rövidítések jegyzéke

CYP1A	citokróm P450 család: 1 alcsoalád A
CYP2C	citokróm P450 család: 2 alcsoalád C
CYP2D	citokróm P450 család: 2 alcsoalád D
CYP2E	citokróm P450 család: 2 alcsoalád E
CYP3A	citokróm P450 család: 3 alcsoalád A
Cre-LoxP	A P1 bakteriofágban található DNS rekombinációt lehetővé tevő rekombinááz enzim és DNS szekvencia rövidítése
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
EPSP	excitatorikus postsynaptikus potenciál
eGFP	enhanced green fluorescent protein
GABA	gamma amino vajsav
GABAerg	azon idegsejtek, melyek GABA ingerületátvivő anyagot használják
GFAP	gliafibrilláris savas fehérje
GFP	green fluorescent protein
LI	layer I (1. réteg), hasonló módon a többi réteg elnevezése: LII/III, LIV, LV, LVa, LVb, LVI, LVIIa, LVIIb
PMBF	poszteromediális barrelmező (hátsó mediális barrelmező)
POm	nucleus posteromedialis thalami
PV	parvalbumin
RGC	retinal ganglion cell (retinális ganglionsejt)
ROI	region of interest
S1	primer szomatoszenzoros kéreg
S2	szekunder szomatoszenzoros kéreg
SST	szomatosztatin
TBST	trisz-pufferolt sóoldat tween detergenssel
VBA	Visual Basic for Applications
vGLUT2	vezikuláris glutamát transzporter 2
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid
VPM	a talamusz nucleus ventralis posteromedialis magja
ZDF	Zucker Diabetic Fatty patkánytörzs

1. Bevezetés

A természettudományos kutatások során gyakran találkozunk azzal a problémával, hogy az egyes cikkek eredményei egymással csak nehezen összevethetőek. Ennek egyrészt oka lehet, hogy egy-egy módszer a különböző fajokban csak módosításokkal használható, vagy az egyes fajokban ugyanazon területen is minden patológiás eltérés nélkül nagy különbségek lehetnek. A probléma másik forrása, hogy a módszertan se teljesen egységes. Egy betegség vagy kémiai ágens hatásának szemléltetésére a sejttípus sejt számváltozásának meghatározását gyakran használják a tudományos cikkek, viszont ugyanazon téma esetén is a mintavételezés nagyon különböző (Galindo-Romero és mtsai 2011; Lee és mtsai 2010), mai napig nincs tudományos konszenzus az egységesen használható standardokról.

Míg a 20. század elején az idegrendszert érintő vizsgálatokban a morfológiáé, a kvalitatív megfigyeléseké volt a főszerep (Edinger 1904), addig a technika fejlődésével párhuzamosan egyre nagyobb hangsúlyt kap a leíró elemzések mellett az objektív, kvantitatív jellemzés.

PhD munkámat a központi idegrendszer sejtjeinek eloszlásmintázatának térképezésével kezdtem, melyet a betegágy mellett szerzett élmények hatására szerettem volna klinikai aspektusból, patológiás állapotok között is megvizsgálni. A belgyógyászati osztályon a cukorbetegség felé fordult az érdeklődésem, s ebben az időszakban a Humánmorfológiai és Fejlődéstani Intézetben éppen diabétesz témakörében, rágcsálók retináján folytattak vizsgálatok. Dr. Lukáts Ákosnak köszönhetően így bekapcsolódhattam ennek a területnek a tanulmányozásába is. Már a kezdetekkor egyértelművé vált, hogy mindkét esetben - habár egymástól elsősre látszólag távoli témák - ugyanazon problémával állunk szemben: hogyan tudjuk a legreálisabb képet kapni a sejtek eloszlásáról, illetve számbeli változásáról? Milyen módon kapjuk a legvalósabb eredményt és hogyan minimalizálhatjuk a szubjektivitást a munka során? Kutatási témám így a biológiai megfigyelések mellett a módszertanra fókuszálódott. Jelen dolgozatban a hangsúly a módszertan, a mintavételezés és olyan egyedi, általunk kialakított elemzési/adatfeldolgozási metódus képezi, mely mellett a biológiai eredmények is ismertetésre kerülnek.

Ahogy a klinikai, úgy a tudományos munka során is szerteágazó területeket ismerhettem meg. Fontosnak tartom azonban kiemelni, hogy így a szövettani

feldolgozások elsajátítása mellett, a mintavételezés megtervezésétől, a statisztikai számításokon át a képi megjelenítésig, minden fázisában végeztem önálló munkát, illetve szereztem tapasztalatot.

A bevezetőben szeretnék rövid betekintést nyújtani a ma használt modellállatokat illetően, ismertetem továbbá a vizsgált anatómiai területeket, valamint rövid áttekintést nyújtok a mintavételezés szempontjairól.

1.1. Az általunk használt modellállatok bemutatása

1.1.1. Szomatoszenzoros rendszer vizsgálatánál használt modellállatok

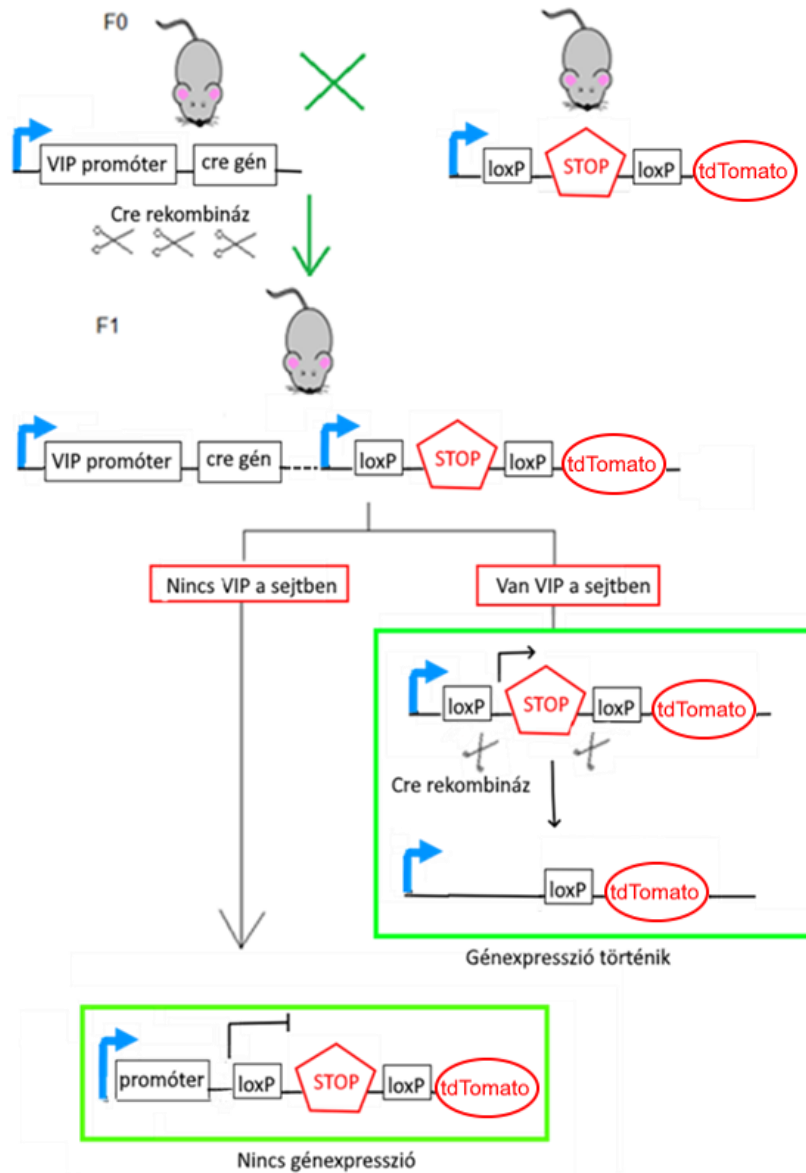
A szomatoszenzoros rendszeren végzett megfigyeléseket vazoaktív intesztinális polipeptid (*VIP*), parvalbumin (*PV*) és szomatosztatin (*SST*) -génmódosított egereken végeztük.

Chalfie és munkatársai közölték először (Chalfie és mtsai 1994), hogy az *Aequorea victoria* medúzából (magyar nevén kristály medúza) származó zölden fluoreszkáló fehérje (*green fluorescent protein, gfp*) gént egy jelölni kívánt fehérje génszakasza mellé ültetve, alkalmas az adott fehérje jelölésére. A *gfp* gént egy tetszőleges másik fehérje génjének promóterével együtt alkalmazva a fluoreszcens fehérje minden sejtben kifejeződik, ahol a másik fehérje is, de kémiai kötással nem egymáshoz kötődve. A GFP volt az első olyan *in vivo* termelhető fehérje, amelynek fluoreszcenciája stabil. Ennek köszönhetően hosszabb ideig is eltarthatóak a minták anélkül, hogy a festék elhalványulna. Az eredeti GFP fehérjét módosították, s így jött létre a még erősebb fluoreszkálást mutató „enhanced” GFP (*eGFP*). Nagy előnye mindkettőnek, hogy ezeket használva a hagyományos immunológiai festésekkel ellentétben nincs háttérfestés, így a jel/zaj arány jobb. További pozitívum, hogy mivel a szabad riboszómákon termelődik és az egész citoplazmában eloszlik, a sejt morfológiáját jobban láthatóvá teszi, mint a hagyományos immunhisztokémiai festékek, melyek esetenként felszíni, vagy szinaptikus vezikulákban lokalizált epitóphoz kötődnek (Jiang és mtsai 2008; Matz és mtsai 1999).

Esetünkben több különböző állattörzset is használtunk, amikben ezen fehérje módosított génjét különféle promóterek mögé helyezték. Az első esetben *VIP* promótere mögé, mely a GABAerg (γ -aminovajsav transzmittert kibocsátó) interneuronok egy csoportjában aktív. A *VIP-eGFP* egy olyan génmódosított egértörzs, ahol a GABAerg

interneuronokban a VIP átírásával párhuzamosan *eGFP* termelődik, mely kék/ultraviola fényrel gerjesztve zölden világít.

A másik általunk használt transzgenikus egér esetén a *Cre/loxP* gén módosított, és fluorofórként nem a GFP fehérje, hanem egy vörösen fluoreszkáló fehérje, a tdTomato termelődik. A génmódosítások eredménye, hogy festés nélkül jelölhetőek a vizsgálatunk tárgyát képező *VIP*, *PV* és *SST* tartalmú sejtek. A tdTomatot a virágállatokhoz tartozó *Discosomából* (*lapanemóna*) származó fehérje módosításával hozták létre (Shaner és mtsai 2004). A GFP-hez képest további előny, hogy a fluorofór még stabilabb, időtállóbb, így a készült metszetek még tovább vizsgálhatóak, információvesztés nélkül. Másrészt a gerjesztési és a kibocsájtási hullámhossza is más, mint a GFP-é, tehát létrehozhatóak olyan állatok, amikben mindkét fehérje kifejeződik más-más promóter alatt, így két különböző sejtpopuláció vizsgálható egyidejűleg. Amikor a fehérje átíródik, akkor a Cre rekombináz is átírásra kerül, amely kivágja a fluoreszcens protein átírását gátló STOP-kodont, mely két LoxP-egység között került elhelyezésre (*1. ábra*). A „Cre” és a „loxP-tdTomato” génmódosított egerek keresztezésének eredménye a *Cre/loxP* transzgenikus egér (Taniguchi és mtsai 2011; Madisen és mtsai 2010).



1. ábra Cre-loxP rendszer működése. F0 generáció egyik törzse a Cre rekombináz gént fejezi ki a VIP promóter mögött, míg a másik törzs a tdTomatot egy konstans átíródást biztosító promóter és két loxP szekvencia közé zárt STOP kodon mögött. A keresztezés eredményeként létrejött egértörzs (F1 generáció) a Cre rekombináz és a tdTomatot is tartalmazza. A két loxP között elhelyezkedő STOP kodon gátolja a tdTomato átírását. Ha a sejtben aktiválódik a VIP promóter, akkor nem csak a VIP íródik át, hanem a Cre rekombináz is, amely kivágja a STOP kodont, emiatt a STOP kodon kiesik és a tdTomato átíródik. (Saját ábra, Kim és mtsai 2018 nyomán)

1.1.2. Cukorbetegség tanulmányozására használható állatmodellek

A diabétesz tanulmányozása általában olyan génmódosított állatokon történik, melyekben a génmódosítás hatására, egy a glükóz-homeosztázis szempontjából fontos gént kapcsolnak ki, s ezekben az esetekben az érintett sejtekben fluorofór általában nem kerül külön beültetésre. Számtalan génmódosított állat létezik, melyen a cukorbetegség tanulmányozható, azonban jelenleg nem létezik „tökéletes” állatmodell, így az egy állattípuson végzett megfigyeléseket más állattípusban tett észrevételekkel támasztják alá. A dolgozat írásakor nem volt elérhető olyan génmódosított állat, ahol maga a betegség kifejlődik és egyidejűleg a vizsgálni kívánt sejt utófestés nélkül is látható. Ennek megfelelően mi is két különböző fajon vizsgáltuk a cukorbetegség hatásait. Ez a két faj a Shaw-versenyegere, illetve ZDF-patkányok (*Zucker Diabetic Fatty*) voltak.

Egereknél a hosszabb távú túlélés sok esetben nem megoldható, mint például az ob/ob obéz egereknél, így a patológiás állapot hosszú távú hatása nem, vagy csak nehezen vizsgálható. Másik probléma a rekombináció hatásfoka is, mely bizonyos esetekben alacsony, mint például a béta-sejt-specifikus Cre/Lox rendszerű sejtvonalnál. Itt a rekombináció hatásfoka nagy szórást mutat, akár 80-98% között változhat (da Silva Xavier és Hodson 2018).

Diabétesz vizsgálható továbbá olyan állatokban, melyekben kémiai ágens, vagy vírusfertőzés hatására fejlődik ki a betegség (például streptozotocin vagy alloxan indukálta cukorbetegség (Bansal és mtsai 1980). Előnye, hogy nagyobb méretű állatokban is használható, de hátránya, hogy a vegyszer, mint például a streptozotocin nem csak a béta-sejteket károsítja, hanem más szerveket is. Ezt jelzi, hogy az agyban, májban, vesében és nemiszervekben is megnövekszik a P450-es izoenzim szintje (King AJF 2012; Lee és mtsai 2010). A P450 izoenzimek a mérgező és testidegen anyagok lebontásában résztvevő enzimek. Számos alcsaládot különböztetünk meg. A gyógyszermetabolizmus szempontjából a legfontosabb képviselőik a cytochrome CYP1A (citokróm P450 család: 1 alcsalád A), CYP2C (citokróm P450 család: 2 alcsalád C), CYP2D (citokróm P450 család: 2 alcsalád D), CYP2E (citokróm P450 család: 2 alcsalád E), CYP3A (citokróm P450 család: 3 alcsalád A) alcsaládokba tartoznak (Porrogi 2016). Ha a sejt a testidegen anyagot el szeretné távolítani, akkor ezen enzimek mennyiségét megnöveli. Ha azonban nem képes olyan mértékű enzimtermelésre, mely az idegen anyag eltávolításához elegendő, akkor az idegen anyag (pl. alloxan) felszaporodhat a sejtben és

a sejt halálához vezethet. Így, ha enzimnövekedés nem csak a célszervben figyelhető meg, mely a betegséget létrehozza, hanem a vizsgált anatómiai területen is, ahol a betegség hatását szeretnénk vizsgálni, akkor nem különíthető el biztonsággal, hogy mely hatás a vizsgált betegség és melyik a betegség létrehozásához használt kémiai ágens eredménye. A cukorbetegségnél - figyelembe véve az emberek közötti prevalencia különbségeket, a betegség gyakoriságát - nem az 1-es, hanem a 2-es típusú cukorbetegség hatásait szeretttük volna vizsgálni. A kettő csoport a kialakulás mechanizmusa, a betegség lefolyása és a gyógyszeres kezelés tekintetében is lényeges eltéréseket mutat. Így egy olyan állatmodellt kerestünk, ahol a betegség kifejlődésének mechanizmusa jól ismert. A vírusfertőzésnél, vagy a kémiai ágensnél maga a vírus, illetve a kémiai ágens is károsíthatja a vizsgálni kívánt sejttípust, megnehezítve ezzel az eredmények értékelését. A sejtszámcsökkenés ugyanis lehet a használt kémiai ágens vagy vírus, de maga a cukorbetegség hatása is. Ennek tükrében génmódosított törzset kerestünk. Tekintve, hogy vizsgálatunk tárgyát a diabétesz egy késői komplikációja, a retinopátia képezte, így kizártuk azon típusokat, ahol a komplikációk nem, vagy csak részben fejlődnek ki. A C57BL/6 egértörzsben például a nefropátia csak későn alakul ki (Breyer és mtsai 2005), illetve streptozotocin indukálta diabétesz esetén is vannak leírások, hogy a C57BL/6J egerekben nem fejlődik ki neuropátia (Sullivan és mtsai 2007). A Semmelweis Egyetem Városmajori Szív és Érgyógyászati Klinikáján ZDF patkánytörzsön végeztek kutatásokat és kollaboráció keretében lehetőségünk adódott ezen állatokon tanulmányokat végezni. Ezen állatok a fentebb vázolt hátrányokkal nem rendelkeztek, azaz ezek alapján alkalmasnak bizonyultak a kísérleteinkhez. További előnye volt ennek a választásnak, hogy egy állat feldolgozása során nem csak egy szerv került feldolgozásra, hanem a többi munkacsoport feldolgozta az állatok egyéb szerveit, csökkentve ezzel szükségesen megöleendő kísérleti állatok számát.

A ZDF patkányokat már 1961 óta használják, ekkor a Merck M és a Sherman M vonal kereszteződésével hozták létre (Phillips mtsai 1996). Eredményként egy olyan típus jött létre, melyben a leptin gén mutálódott. A génmutáció hatására hiperinzulinémia, hiperlipidémia, magasvérnyomás és II-es típusú cukorbetegség alakul ki. A ZDF patkányoknál normál körülmények között csak a homozigóta típusban fejlődik ki cukorbetegség. A heterozigótákban ezzel szemben ugyanolyan körülmények között nem alakulnak ki a fenti változások (Srinivasan és Ramarao 2007; Shiota és Printz 2012).

Másik modellállatnak a *Meriones shawi*-t, Shaw-versenyegerét választottuk. Ennek a fajnak eddig nem teljesen ismert háttérű genetikai hajlama van a cukorbetegségre, s ezen állatokban diéta hatására metabolikus X szindróma fejlődik ki. A metabolikus X szindróma tünetei az elhízás, glükóz intolerancia, 2-es típusú cukorbetegség, diszlipidémia és hipertenzió. Az éleslátás helye a retina egy jelentős részét teszi ki (Sullivan mtsai 2007), mely egy horizontálisan elhelyezkedő sávot alkot.

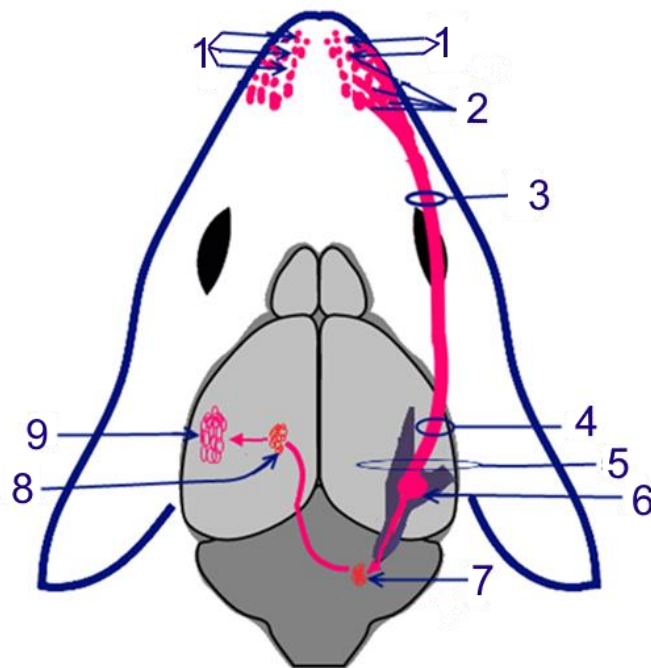
1.2. A vizsgált területek anatómiája

1.2.1. Egér poszterolaterális barrelmező

Emlősökben a neokortexet klasszikusan 6 rétegre osztjuk. Ezen rétegeket rágcsálókban nem a hagyományos anatómiai nevekkal, hanem az angolszász szakirodalomban használatos LI-LVI-al jelöljük, ahol L a layer, magyarul a réteg rövidítése, míg I-VI római számok a réteg sorszámát jelölik a felszíntől a fehérállomány irányában emelkedő sorrendben. Rágcsálóban az LII és LIII réteg nem különül el, így LII/III elnevezést használjuk, viszont az V. réteg két merőben eltérő alrétegből épül fel, amiket LVa és LVb-nek nevezünk. Újabb kutatások az LVI rétegben is megkülönböztetnek LVia és LVib alrétegeket (Watakabe és mtsai 2012).

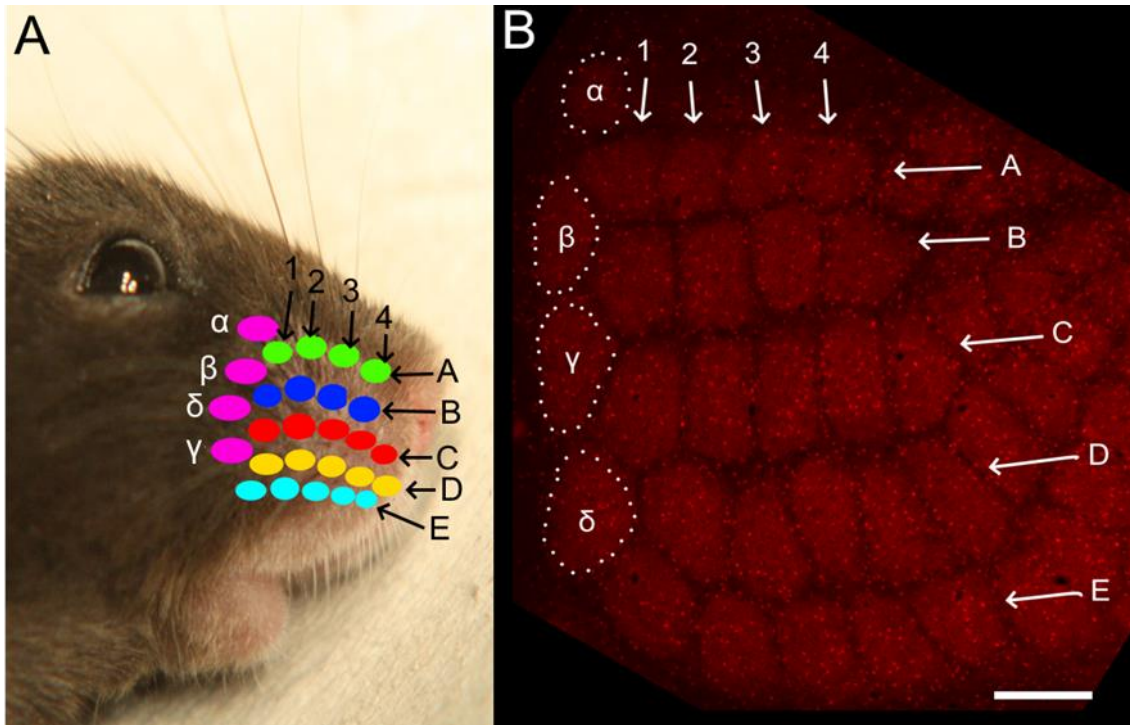
A rágcsáló primer szomatoszenzoros kérgé sok szempontból különleges, ugyanis a pofa oldalán elhelyezkedő nagy bajuszszőrök szomatotópiásan képződnek le a kortexben, ezáltal azon kevés kérgi régió egyike, ahol a funkcionális egységek tisztán morfológiai módszerekkel vizsgálhatóak. Mint az a 2. és 3. ábrán látható, a rágcsáló bajszai a pofa oldalán ugyanolyan mintában helyezkednek el, mint a szomatoszenzoros kéreg LIV-ben tömörülő talamokortikális rost csoportosulások. Ezt az elrendeződést nevezzük szomatotópiás leképződésnek. Ez azt jelenti, hogy minden bajuszszőrnek megvan a saját maga leképződési területe az agyban. Ez az egy az egynek megfeleltetés csak a nagy bajuszszőröknél látható, azonban szomatotópia megfigyelhető az elülső és hátulsó talpak, vagy genitáliák esetén is (Staiger és Petersen 2021). A bajuszpárnából induló idegvégződéses Merkel testekkel, lándzsahegy végzésekkel és szabad idegvégzésekkel vannak kapcsolatban, ahonnan lassú vagy gyors adaptációjú rostok vezetnek a ganglion trigemináléba (Gibson és Welker 1983). A környezet feltérképezésekor a rágcsálók bajuszszőreik gyors, repetitív mozgásával tapogatták le a

tárgyakat. Ez a jelenség a „whisking”. Innen az információ egy jól ismert útvonalon halad (2. *ábra*) a nervus trigeminus magjaiba, a nucleus principalis és a nucleus tractus spinalis nervi trigeminibe szállítódik. Ez utóbbi esetében mindhárom része, az oralis, interpolaris és caudalis rész is kap rostokat. A bajszok itt is szomatotópiásan képződnek le. Egy adott bajszból származó információt feldolgozó sejtek csoportját egy egységnek tekintjük, melyet „barrelettnek” nevezünk (Feldmeyer és mtsai 2013). Az agytörzsben a sejtek egy része nem egy, hanem több bajsztól is kap információt, azaz már integráló funkcióval is rendelkezik (Jacquin és Rhoades 1990). Az egyes agytörzsi magok egymással is összeköttetésben vannak, de a fentebbi szintekről például a primer vagy a szekunder szomatoszenzoros kéreg is kap kollaterálisokat (Staiger és Petersen 2021). A barreletekből az információ, eddigi ismereteink szerint, 4 útvonalon halad tovább. Két lemniszkális, egy extralemniszkális és egy paralemniszkális útvonalon. A ma ismert közel 40 talamikus magból szomatotópiásan leképződő információ főként három talamikus magcsoportba szállítódik: a nucleus ventralis posteromedialisba (VPM), a hátsó mag mediális részébe a nucleus posteromedialis talamiba (POm), valamint a centrális és paracentrális magokba. A POm-ben a bajszszőrőkből információt szállító rostok nem szomatotópiásan végződnek, ezzel szemben a VPM-ben szomatotópiásan képződnek le. A VPM-ben a bajszszőrők szomatotópiás reprezentációi a barreloidok. Innen az információ a nagyagy szomatoszenzoros kérge (S1, azaz primer szomatoszenzoros kéreg, S2, azaz szekunder szenzoros kéreg) mellett például a motoros kéregbe is vetül. A VPM barreloid hátsó keskeny részéből induló rostok, mint az extralemniszkális pálya egy része, az S1 és S2 szeptális oszlopaiban is végződnek. A szomatoszenzoros kéreg LIV rétegében a VPM-ből induló talamokortikális rostok által formált ovális struktúrák a barrelek. A barrel LI és LVI felé történő projekciója a barrel asszociálta oszlop. Az oszlopok közötti terület pedig az úgynevezett interbarrel szeptum, vagy röviden szeptum. Itt a barrelek oszlopokba és sorokba rendeződnek, kialakítva a barrelmezőt. A barrelmezőhöz tartozó kortikális területet barrelkortexnek nevezzük. Az útvonal sematikus képe a 2. *ábrán* látható.



2. ábra Bajuszpárnától a barrelmezőig vezető útvonal sematikus rajza. 1. bajuszszőrök folliculusai; 2. nervus infraorbitalis végágai; 3. nervus infraorbitalis kötege; 4. nervus maxillaris; 5. nervus trigeminus; 6. ganglion trigeminale; 7. agytörzsi érző trigeminusmagok; 8. thalamusz; 9. barrelek a szomatoszenzoros kéregben. Saját ábra.

A pofa oldalán és a posteromedial barrel field, azaz poszteromedialis barrelmező (PMBF) esetén is a fő bajuszszőrök 5 sorba és 4-5 oszlopba rendeződnek ventrodorsalis irányban. A sorokat A-E betűkkel jelöljük, míg az oszlopokat arab számokkal 1-4-ig. A sorok előtt található továbbá négy szőrszál, illetve ennek megfelelően 4 kisebb, kevésbé szabályos alakú barrel, melyet megállapodás szerint a görög ABC betűivel α - δ görög betűkkel jelölnek (3. ábra).



3. ábra Egér bajuszpárnája és annak szomatotópiás leképeződése a szomatoszenzoros kéregben. A: Bajuszszőrök folliculusai szabályos elrendeződést mutatnak a rágcsáló pofáján. B: A primer szomatoszenzoros kéreg negyedik rétegének tangenciális metszete PVcre/tdTomato egérben, a barrelek bajuszpárna mintázatának tükörképének megfelelően rendeződnek (az ábrán a szomatoszenzoros kéregről készült felvétel vertikálisan tükrözve látható a könnyebb megfeleltethetőség érdekében). A barrelek jelölése megfelel az „A” képen bemutatott bajuszfolliculusok jelölésének. Méretvonal: 500 μ m. Saját ábra.

1.2.2. A barrelmező kapcsolatai

A feldolgozás különböző szintjei egymásra hatással vannak, módosítják a továbbított információt. A barrelmező kapcsolatai intenzív kutatások tárgyát képezik, rengeteg adattal rendelkezünk a témában. Az alábbi részben a teljesség igénye nélkül a legfontosabb kapcsolatokat mutatom be. Ezeket a kapcsolat jellege szerint két csoportba oszthatjuk: serkentő, valamint gátló típusokra. Egy másik beosztás szerint a forrás alapján megkülönböztethetünk felszálló és kortiko-kortikális kapcsolatokat. Az előbbibe tartozik a szubkortikális, talamokortikális, vagy a bazális előagyi kolinerg és a locus coeruleusból eredő noradrenerg rendszer. A kortiko-kortikális összeköttetések származhatnak a primer

kortikális areák, például a primer motoros kéreg, primer hallókéreg, látókéreg felől, vagy magasabb kérgi területekről, például peririnális, szekunder motoros kéreg. Ezek a területek kapnak reciprok módon is rostokat a VPM különböző rétegeiből (Staiger és Petersen 2021).

A sejtek biocitinnel történt feltöltéséből, valamint elektrofiziológiai vizsgálatok alapján korábban úgy tűnt, hogy a szenzoros rendszerben létezik egy általános séma, mely hasonló a látó és a szomatoszenzoros kéregben is, ezt kanonikus szabályozó körnek nevezték (Douglas és Martin 1991). Mint azt az előző fejezetben részleteztem, a VPM-ből induló talamokortikális rostok főként az LIV-ben végződnek. Az egyik ismert intrakolumnáris kör innen az LII/LIII-ba küld információt, ahonnan a sejtek az LVb -n és LI-en keresztül távolabbi areák felé projiciálnak. A POm rostok ugyanakkor a barreleket elválasztó sávban, az úgynevezett szeptumban haladva érik el az LVA idegsejteket, melyekre az LIV piramis sejtek is hatnak. Az LVb és LVI-ből visszacsatolás indul a VPM és POm irányába is (Feldmeyer mtsai, 2013). Ez a kanonikus kör modell a lemniszkális útvonalra jellemző. Jelenleg nincs egy egységes modell, mely általánosan leírná a barrelmező kapcsolatait.

Az LIV barrel asszociált oszlop több egymás feletti aloszlopra tagolható (különböző kutatások 3-10 közötti egységekben írják le), melyek eltérő funkcióval rendelkeznek (Staiger és Petersen 2021).

A gátló körök, mint az aktiválók is, lehetnek intrakolumnárisak, de lehetnek transzkolumnárisak, valamint transzlaminárisak. Transzlamináris gátló kör indul az LII/LIII GABAerg sejtektől az LIV/LV neuronok, valamint az LI neuronok felé. Ezzel modulálják az oszlopba érkező és onnan induló információáramlást (Feldmeyer és mtsai 2013).

A POm rostok egy része az LV mellett az LI neuronokon végződik. Elektrofiziológiai vizsgálatok szerint ezek a rostok finomhangolják a bajuszszőrből érkező stimulusra adott válasz idejét és az S1-ben a supra- és infragranuláris oszlopban kiváltott válasz mértékét. A negyedik rétegben, azaz a granuláris rétegben elhelyezkedő barrel felfelé és lefelé történő kivetítése egy oszlopot hoz létre. A barrel feletti részt szupragranuláris, míg az alatta lévő részt infragranuláris oszlopnak nevezzük. A supra-, infra-, valamint a granuláris rétegben található rész együtt képezi a barrel asszociálta oszlopot. A POm

rostok másik csoportja az S2 felé projiciál, ahol az S1 LV rétegéből induló kortikofugalis aktivitással együtt lát el moduláló feladatokat (Castejon és mtsai 2016).

1.2.3. A szomatoszenzoros kéreg gátló sejtípusai

A neokortex idegsejtjei két alapvető típusba sorolhatóak: a serkentő glutamaterg és a gátló GABAerg sejtek (Harris és Mrsic-Flogel 2013). Míg az serkentő sejtek az összessejtszám 80-90%-át teszik ki (Harris és Shepherd 2015), addig a gátló típusúak alig 10-20%-át képezik. A PV-t, SST-t és VIP-t expresszáló neuronok alkotják a GABAerg idegsejtek többségét (~ 40%, ~ 30% és ~ 10-15%-os megoszlásban) (Pfeffer és mtsai 2013). Habár a pontos eloszlás és funkció nem teljesen ismert, feltételezhető, hogy a különböző eloszlást mutató típusok más-más funkciót töltenek be a helyi és távoli gátló/aktiváló körökben (Feldmeyer és mtsai 2013).

A fenti 3 sejtípusról alkotott képünk nagyrészt a biocitinnel feltöltött sejtek rekonstrukciójából és elektrofiziológiai vizsgálatok alapján (single cell recording) alakult ki (Feldmeyer és mtsai 2013; Jiang és mtsai 2015; Markram és mtsai 2004; Tremblay és mtsai 2016). Ezek alapján a PV+ neuronok az LI kivételével az összes rétegben fellelhetőek, s az LIV réteg mellett az LV-t preferálják (Celio 1986). A dendrit és az axonarborizáció többféle lehet, attól függően, hogy melyik rétegben helyezkedik el a sejt (Koelbl és mtsai 2015; Munoz és mtsai 2014; Wang és mtsai 2002). A gátlás nagyrészt az azonos típusú sejtek mellett kiterjed más GABAerg neuronokra, illetve piramissejtekre (David és mtsai 2007; Jiang és mtsai 2015; Pfeffer és mtsai 2013; Staiger és mtsai 2009; Tamas és mtsai 2000). Megjelenésüket tekintve lehetnek axo-axonikus vagy kandeláber sejtek (Howard és mtsai 2005), illetve PV+ kosársejtek (Wang és mtsai 2002).

Az SST+ sejtek az LI-től LVI-ig növekvő számban fordulnak elő. Ma már ezt a sejtípust sem tekinthetjük egységesnek, ugyanis elhelyezkedés és morfológia alapján több altípust, mint például az úgynevezett Martinotti sejteket sikerült azonosítani, mely lényegesen különbözik a „nem Martinotti” csoporttól (Ma és mtsai 2006; Nigro és mtsai 2018; Oliva és mtsai 2000; Urban-Ciecko és Barth 2016). Az SST+ sejtek elsősorban más interneuronokat, illetve piramissejteket gátolnak, saját sejtípusukra kevésbé vannak hatással (Caputi és mtsai 2009; Pfeffer és mtsai 2013; Xu és mtsai 2013). A sejtek ismertetője, hogy hosszú axonjaik eléri az LI-et, ahonnan távolabbi agyterületek felé is projiciálnak (Ma és mtsai 2006; Nigro és mtsai 2018).

A VIP+ sejtek a PV+ és SST+ neuronokkal ellentétben a szupragranuláris rétegben csoportosulnak (Bayraktar és mtsai 2000; Prönneke és mtsai 2015) és gyakran hatnak a piramissejtekre. Ezen kívül fontos modulátorok gátló és aktiváló szabályozó körökben (Garcia-Junco-Clemente és mtsai 2017; Kuchibhotla és mtsai 2017). A fő célpontjaik az SST+ Martinotti sejtek, mely alapján azok és az ahhoz kapcsolódó szabályozókörök működését befolyásolják. Ezt mind a barrelkortex, mind a látókéreg esetén megfigyelték (Pfeffer és mtsai 2013; Walker és mtsai 2016). Újabb kutatások szerint ez a sejtípus is heterogén, s két különböző alcsoport különíthető el: a VIP/kalretinin és a VIP/kolecisztokinin expresszáló sejtek (He és mtsai 2016).

Mint az a fenti leírásból látható, a talamokortikális projekciók és a GABAerg neuronok is rétegspecifikus eloszlást mutatnak, az irodalomban azonban nem találtunk információt a vertikális domének közötti eloszlásukról.

1.2.4. Az emlős retina felépítése

Munkánk során a retina ganglionsejtjeinek eloszlásáról készítettünk térképeket. Tekintve, hogy a biológiai eredmények nem kerülnek ismertetésre, munkám a térképek létrehozására korlátozódott, így a retina bemutatása a megértéshez szükséges minimális szinten történik.

Az emlős retina felépítéséről elmondható, hogy két, funkcionálisan jelentősen eltérő részre osztható. Az ora serrata képezte határvonal előtti terület a fényérzékelésre képtelen, míg a hátsó terület fényérzékeny.

A fényérzékeny retina tíz rétegből épül fel. Kívülről befelé haladva az első réteg a retinális pigmenthám, mely alatt a neurális retina kilenc rétege foglal helyet. A második réteg a fotoreceptorok rétege, melyben a csapok és pálcikák kültagjai találhatóak. Ezt követi a Müller féle gliasejtek nyúlványai által képzett külső határhártya. A határhártya alatt a retina különböző sejtípusainak és kapcsolatainak rétegei helyezkednek el. A külső magvas réteg, a külső plexiform réteg és a belső magvas réteg. A külső és a belső magvas réteg között a plexiform réteg egy szinaptikus tér, ahol a magvas réteg sejtjeinek nyúlványai helyezkednek el. A belső magvas réteget a belső plexiform réteg követi, mely a belső magvas réteg sejtjeinek és a ganglionsejteknek a szinapszisait, nyúlványait tartalmazza. Ezt követi a ganglionsejtek rétege. A ganglionsejtekből kilépő axonok hozzák létre az optikus rostok rétegét. Az optikus rostok rétegét az üvegtest felé a Müller

féle gliasejtek végtalpai által létrehozott barrier, a belső határhártya zárja le (Szentágothai és Réthelyi 2006).

A belső és külső magvas rétegben a neurális retina olyan interneuronjai találhatóak, mint a bipoláris sejtek, amakrin és horizontális sejtek. Az interneuronok között a klasszikus anatómia szerint továbbá kétféle gliasejt található: a mikroglia, valamint az optikus rostok és a ganglionsejtek rétegében elhelyezkedő asztrociták (Szentágothai és Réthelyi 2006; Chang és mtsai 2007). Az utóbbi évtizedekben az immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a klasszikus anatómia által leírt sejtípusok nem egységesek. Több mint 60 féle különböző sejtípust írtak le a retinában (Masland 2012)

Shaw versenyegere esetén a retina középső területén egy nagyobb sejtendenzitású sáv található, mely az emberi maculához hasonlóan erektől mentes. Ilyen megkülönböztetett terület az egerek és patkányok esetén nem ismert (Hamoum és mtsai 2017).

1.3. A diabétesz okozta retinakárosodás

Az elmúlt évtizedek statisztikáit tekintve elmondható, hogy a diabéteszes retinopátia következtében kialakult vakság az aktív korúak körében vezető helyen áll (Barber AJ 2003; Flaxman és mtsai 2017).

Kialakulása lassú folyamat. Klinikailag három stádiumra osztható a lefolyása. A diabéteszes retinopátiát megelőzi a preretinopatia. A preretinopátiát a nonproliferatív, majd a proliferatív stádium követi. A szemfenéki képen mikroaneurizmák, gyapottépes gócok, vérzések, puha és kemény exszudátumok, intraretinalis mikrovaszkuláris abnormalitások jelennek meg. A non-proliferatív érrendellenességek következtében egyes területek a keringéstől elzáródhatnak. A non-proliferatív retinopátia talaján kialakuló nagy kiterjedésű nem-perfundált területeken érújdonképződés, azaz proliferatív retinopátia indulhat (Viswanath és McGavin 2003; Süveges 2010).

Kialakulását tekintve korábban a vaszkuláris eredet volt az elterjedt (Cai és mtsai 2002). A retinopátiát napjainkban a cukorbetegség egy neurovaszkuláris komplikációjának tekintik, a neurális elváltozások megelőzik a vaszkuláris eltéréseket (Villaroel 2010; Simó és mtsai 2022). A folyamatra jellemző, hogy az idegsejtek elhalásával párhuzamosan glia aktiváció történik. A gliasejtek GFAP expressziója megnő (Simó és mtsai 2022). Klinikai evidencia szerint a ganglionsejtek száma csökken. Ez a

ganglionsejtek rétegének és a belső plexiform rétegnek az elvékonyodását okozza (DeBuc és mtsai 2013; van Dijk HW és mtsai 2010). Az állatkísérletek eredményei a ganglionsejt-változás tekintetében gyakran egymással ellentmondásosak, egyes vizsgálatok szerint a ganglionsejtek számát a diabétesz már korai stádiumban is csökkenti (Kern és Barber 2008; Kadłubowska és mtsai 2016), míg más vizsgálatok alapján kezdetben a folyamatok nem befolyásolják ezen sejtek számát (Énzsöly és mtsai 2015; Johnson és mtsai 2013).

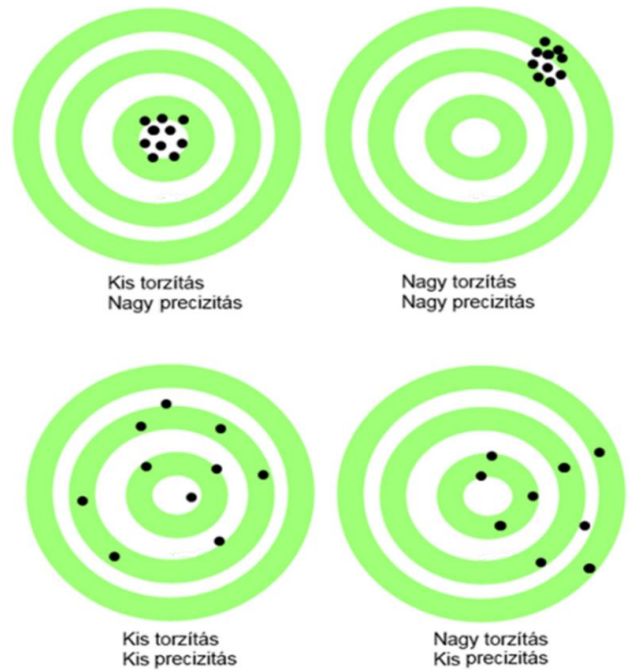
1.4. Sztereológiai elvek

Az orvos- és biológiai tudományok fejlődésével egy kicsi területről is rövid idő alatt sok új információ, eredmény jön létre. A kezdeti leírások során gyakran találkozni nem egzakt, számszerű leírással. Ezek egymással statisztikailag, s így objektíven nem összehasonlíthatóak, így idővel megjelent az azonos vizsgálatok eredményeinek az összevetésének igénye. Továbbá gyakran olyan kis eltérést észlelni a különböző vizsgálati csoportok között, mely a fotókon nem feltétlenül látszik, de statisztikailag és funkcionálisan jelentős. Ennek következtében született meg a sztereológia tudománya (Schmitz és Hof 2005).

Eleinte a sztereológia a háromdimenziós objektumok és az arról készült képekben lévő struktúrák mennyiségi elemzésének, mintavételezési módszereinek tudománya volt. Arra irányult, hogy milyen módszerekkel vonhatjuk le a legpontosabb következtetéseket, mely a háromdimenziós struktúrát jellemzik (Schmitz és Hof 2005; Weibel 1981). Napjainkban a sztereológia egy gyűjtőfogalom a különböző technikák, próbák számára, melynek céljai között szerepel, hogy a vizsgált terület geometriájától, alakjától független, különböző modellekben használható módszerek, elvek szülessenek (Schmitz és Hof, 2005).

A készült kép analízise során számos mérést végzünk, melynek célja, hogy a vizsgált objektum minél pontosabb jellemzését kapjuk és eredményeink torzításmentesek legyenek. Se a mintavételezés, se a vizsgálatot végző személy ne okozzon olyan változást, ami a valóságostól eltérő eredményeket adna. Minden kutató célja, hogy eredményeik pontosak és torzításmentesek legyenek. A pontosság (vagy precizitás), illetve a torzításmentességre törekvés két fontos sztereológiai irányelv. Azt, hogy pontosan mit is jelent, azt az úgynevezett „célábramoddellel” lehet jól szemléltetni. Az alábbi 4. ábrán négy célábra látható. A célábra középpontja a mérendő értékek valós átlagát jelenti. A torzítás azt fejezi ki, hogy a mért értékeink mennyire térnek el ettől a valós átlagtól.

Torzításmentes esetben az eredmények a középpontban helyezkednének el, de ilyen ideális eset nem létezik. Kis torzítás esetén közel találhatóak a középponthez, nagy torzítás esetén pedig távol. A precizitás pedig kifejezi, hogy a kapott értékeink mennyire szórnak, azaz a mért átlaghoz képest mennyivel térnek el (Russ és Dehoff 2000).



4. ábra *Precizitás és torzítás bemutatását szolgáló céltábla modell. Az angolszász irodalomban a fenti két jelenséget a „precision” és az „accuracy” fogalmakkal jelölik. A szótárakban mindkettő egyfajta pontosságot jelöl. A magyar nyelvben erre nincs külön kifejezés, mely jól árnyalná a különbséget, így esetünkben a precision= precizitás, míg accuracy = torzításmentesség fordításaként szerepel. Az ábra Russ és Dehoff Practical Stereology c. könyvének 2. kiadásának 130. oldalán található ábrája alapján készült (Russ és Dehoff 2000).*

Amennyiben a mérések metszeteken történnek, akkor egy másik fontos fogalom az úgynevezett „ideális metszet”. A biológiai minták esetén a vizsgált kép egy adott vastagságú metszet projekciója. Ha a metszet vastagsága kisebb, mint bármely vizsgált kiterjedésű elem, úgy a metszet „ideális metszet”. Abban az esetben viszont, ha a metszet vastagabb, akkor az analízis ennek figyelembevételével módosításokra szorul (Russ és Dehoff 2000; Boyce és mtsai 2010).

A metszés során gyakran több száz metszet készül egy-egy szervről, azonban az összes elemzése általában nem oldható meg, vagy pedig több dolgot vizsgálva a metszeteket különböző módon használjuk fel céljainknak megfelelően. Ilyenkor a metszetek csak egy részét használjuk fel. Annak eldöntésére, hogy mely metszeteket vizsgáljuk tovább, szisztematikus random mintavételezést alkalmazhatunk. A megfelelő becslést adó vizsgálathoz szükséges metszetszám nagyban függ az adott objektum komplexitásától, így nincs egy egzakt szám, melyet minden kísérlet során használhatnánk. Irodalmi adatok szerint egy megfelelő becslést adó vizsgálathoz a vizsgálattól függően változó számú metszet analízisére van szükség. Adott esetben a metszetszám 2% is elegendő lehet, de van, hogy ennél nagyobb arányban szükséges a mintavételezés (Boyce és mtsai 2010; Altunkaynak 2012). A mintavételt a metszetintervallummal lehet objektíven jellemezni, illetve az abból számított mintavételi hányadossal. Ez az arányszám megmutatja, hogy az adott objektum hányad része lett vizsgálva. Például, ha 100 metszetünk van és mi minden tizediket vizsgáljuk, akkor ez a hányados $10/100=1/10$. Ahhoz, hogy az eredményünk ne torzuljon, a metszeteknek egyenlő távolságra kell egymástól lennie. Amellett azonban, hogy egyenlő távolságra vannak egymástól, a kiválasztásnak is randomnak kell lennie, azaz az 1. vizsgált metszet helyének véletlenszerűnek kell lennie a metszetsor első 10 metszete között. Ezt a szabályt szisztematikus random mintavételezésnek hívjuk (Russ és Dehoff 2000, Boyce és mtsai 2010; Altunkaynak 2012). Szisztematikus random mintavételezést nem csak a metszetek kiválasztásánál, hanem az elemzés esetén, például sejtszám meghatározásánál is használtunk.

Ha kísérleteket nem a fentebb vázolt sztereológiai szabályoknak megfelelően végzik, hanem ösztönösen, megérzések alapján tervezik meg, akkor az eredmény elfogult lehet. Másik probléma, hogy ilyen esetben az eredmények interpretálása is egyoldalú lehet, vagy esetleg maga a kísérlet alapjaiban hibásan tervezett (Tschanz és mtsai 2014).

Ajánlások szerint a kutatás tervezési fázisába célszerű egy sztereológiában járatos szakembert bevonni. Angol nyelvterületen a sztereológus, mint a sztereológiával foglalkozó tudós egy külön egységét képezi a tudományos kutatásoknak. Magyarországon ez nem annyira elterjedt még, hiszen azon graduális képzések, melyek kifejezetten a kutatásfejlesztéssel foglalkoznak, a 2000-es évek elején indultak.

1. táblázat Leggyakrabban elkövetett sztereológiai hibák és azok hatása. (Tschanz és mtsai 2014)

Alapprobléma	Hatás	Megoldás
Nem rögzítették a szerv kiindulási méretét	Denzitás nem számolható	Utólag nem korrigálható
Kis egyedszámon végzett megfigyelés	Precizitás csökken, torzított eredmények szülehetnek	Egyedszámot célszerű növelni és inkább több egyedből kevesebb mintát venni, esetleg a készített felvételek számának növelése
Új eljárás alkalmazása	Lehet, hogy a vizsgálni kívánt struktúra nem festődik a várt módon	Kis mintán végzett előtanulmány elvégzése
Túlzásba vitt automata képanalízis alkalmazása	Az automata alkalmazások gyakran nem elfogulatlanok pontatlanok, gyakori alul/felülbecsülés	Beállítások tesztelése néhány metszeten

Mint azt a fenti *1. táblázat* is mutatja a tervezéstől kezdve bármely munkafolyamatba csúszhat hiba, mely az eredményeinket torzítja (Tschanz és mtsai 2014).

Az alábbi részben tekintünk át, hogy a szomatoszenzoros rendszer, illetve a retina leírásánál milyen módszereket szoktak használni, melyek azok előnyei és hátrányai.

1.4.1. A mintavételi hely kiválasztása

A vizsgált sejttípus gyakorisága nagyban meghatározza, hogy az adott területről mekkora, illetve mennyi felvételt készítenek. Ha a célsejt/nyúlvány sűrűn helyezkedik el, akkor háromféle megoldással találkozunk. Egyik lehetőség, hogy kevesebb, de nagyobb területről készítenek képeket (Jiao és mtsai 2020). Másik megoldás, hogy több kisebb méretű területet fotodokumentálnak, de arra is láthatunk példát, hogy a teljes vizsgált régiót befényképezik (Harman és mtsai 2003; Szabo és mtsai 2017).

Azt nem lehet egyértelműen megválaszolni, hogy melyik módszer a jobb, több kisebb területet, egy nagyobb részt, vagy esetleg az egész vizsgálni kívánt szövetet célszerű-e digitalizálni, s analizálni. A mikroszkópos képek készítésekor történő mintavételezésre példa Harman és mtsai (2003) vizsgálata, akik az életkorral történő ganglionszám változást vizsgálták a retina stratum ganglionaréjában. Ehhez a retina területét 1000x-es

nagyítás mellett, egymástól 1 milliméterre fekvő 100x100 µm-es négyzetekben fényképeztek le. A ganglionsejtek számát a mintavételi négyzetekben megszámolták, s azok eredményeit extrapolálták a teljes területre. A festés során nem használtak különböző antitesteket, hanem krezilibolya festést végeztek, mely idővel nem halványodik. Mivel csak egyféle festést használtak, illetve a feldolgozás során nem volt lényeges szövetvesztés, így esetükben a szisztematikus, random mintavételezés már digitalizálás során megvalósítható volt (Harman és mtsai 2003). Immunfluoreszcens képeken a felvétel készítésekor végezni ilyen mintavételezést nem célszerű, mivel a fluoreszcencia csökkenése miatt később nem lehet megismételni a fényképezést. Ezért immunfluoreszcens festékek alkalmazásakor nem is elterjedt ez a mintavételezési mód. Ilyenkor általában a vizsgálni kívánt terület teljes/nagy részének fotódokumentálása megtörténik, s csak egy részét elemzik. Azonban, ha a feldolgozás és már a festés kiválasztása is sztereológiai elvek mentén történik, akkor néhány metszet is elegendő lehet, hogy torzításmentes megfigyeléseket vonjunk le (Schmitz és Hof 2005).

A fotódokumentáció során is használhatóak fél vagy teljesen automata programok, amelyek sztereológiai próbák alapján végzik a feldolgozást. Ilyen például CAST (Visiopharm, Hørsholm, Denmark), StereoInvestigator (MicroBrightField, Williston, VT, USA). Ezek amellet, hogy időt takarítanak meg a feldolgozás során, csökkentik a feldolgozó személy általi szubjektivitásból adódó hibákat. Ha nem rendelkezünk az előbb említett rendszerek egyikével sem, akkor egy háromtengelyű, motorizált tárgyasztallal összekötött konfokális mikroszkóp is alkalmas térbeli információk rögzítésére, s az így rögzített adatok utólag is kinyerhetőek (Glaser és Glaser 2000).

1.4.2. Mintavételi módok, adatok extrapolálása

Amikor sejtszámváltozásra vagyunk kíváncsiak, akkor az egész szövet elemzése a méretek, illetve az esetleges nagy sejtszám miatt nem mindig megoldható. Ilyenkor is valamilyen mintavételre van szükség. A retina esetében gyakori, hogy mintavételi négyzeteken belül határozzák meg a sejtszámot, s azt terjesztik ki a környező, nem vizsgált területekre. Ilyenkor denzitásértékeket számolnak, azaz meghatározzák, hogy adott térfogaton belül mennyi vizsgálati objektum helyezkedik el. A mintavételi négyzetek száma nagy különbségeket mutat. Esetek egy részében az így elhelyezett négyzetek területe lefedi a teljes terület 6-7%-át (Mass és mtsai 2012), de van hogy 1%

körüli (Harman és mtsai 1999). A mintavételi pontokból történő extrapoláció is eltérő, mely tovább nehezíti az adatok összevetését. Lehetséges adott számú négyzetet átlagolni, s a négyzetek közötti területet annak az eredményével feltölteni (Mass és mtsai 2012), vagy az egy-egy négyzet közötti területre számos programmal lehetséges extrapolálni az eredményt (Hammoum és mtsai 2017). Az extrapolálást követően elkészült retinaterképek az úgynevezett izodenzitás térképek, ahol a kép azonos denzitásértékeket jelző pixeleit hasonlóan színezzük, vagy pedig szintvonalyszerű vonalakkal kötjük össze. Ha azonos korú, méretű szöveteket dolgozunk fel, akkor a denzitásetérés jól használható a különbségek leírására. Ha azonban a korrallal a szövet mérete változik, akkor a denzitás már félrevezető lehet, például, ha az összsejtszám nem változik, de a szövet mérete valamely oknál fogva nő. Erre példa, hogy az időskori látásromlás okaként a ganglionsejtszám csökkenését tartották felelősnek, ugyanis idős korban a sejtdenzitás csökken. Ha az összsejtszámot nézzük, akkor azonban patkányokban nem mutattak ki idős korban érdemi sejtszámcsökkenést, a retina növekedése miatt a denzitás azonban valóban csökkent (Harman és mtsai 2003).

Szomatoszenzoros rendszeren belül a gátló sejtek számolása az alacsonyabb sejtszám és sűrűség miatt nagyobb területen, akár egész metszeteken (metszeten belüli mintavétel nélkül) megvalósítható. Ezt követően pedig a metszet denzitását extrapolálják az egész kéregterületre/sejtrétegre (Prönneke és mtsai 2015).

Tekintve, hogy a denzitás egy darabszám/térfogat arányban megadott jellemző, így a térfogatra ható változások változtathatják a számolt denzitást. Ismert, hogy a különböző fixálási és beágyazási módok eltérő mértékű zsugorodást okozhatnak (Dorph-Petersen és mtsai 2001). Ha denzitást nézünk, akkor azt az értéket csak azonos feldolgozással végzett eredménnyel vethetjük össze. Amennyiben az abszolút sejtszámát határozzuk meg az anatómiai területnek, úgy arra a metszet zsugorodása nem hat ki (Schmitz és Hof 2005). A feldolgozás során cél, hogy a vizsgálni kívánt terület láthatóvá váljon. Vastag metszetek esetén a festék penetrációja, vagy a metszés során a szélek menti sérülés okozhat információvesztést (West és Slomianka 1998).

1.4.3. A sejtszámításhoz és rekonstrukcióhoz használt programok

A metszetekről készített felvételek feldolgozására, további analizisére számtalan program érhető el. Ezek egy része ingyenes, nyilvános forráskódú. Előnyük a

programcsomagokban vásárolható társaikkal szemben, hogy egyedi problémákra, specifikus helyzetekre a programnyelv és programozási alapok ismerete mellett jobban adaptálható.

Munkánk során kétféle program segítségével dolgoztuk fel a mikroszkópos képeket. Egyrészt az *ImageJ* mikroszkópos képfeldolgozásra alkalmas bővítményekkel ellátott verziójával, a *FIJI*-vel dolgoztunk. Ez egy *JAVA* alapú program, melyben előre megírt beépülő modulok mellett lehetőség van saját programot írni, mely gyorsíthatja azokat a munkafolyamatokat, melyeket sok képen kell elvégezni, ugyanazon algoritmus szerint (Schindelin és mtsai 2012). Emellett előnye, hogy jól kapcsolható más programokhoz. A programmal a képfeldolgozás és analízis különböző feladatai elvégezhetőek, mint például több felvételtől álló metszetek manuálisan vagy automatikusan illeszthetőek egy képpé, de szegmentálási feladatok (például zajszűrés, határok meghatározása), valamint struktúrák rekonstrukciójára is alkalmas.

A másik program egy kereskedelmi forgalomban elérhető, kifejezetten idegsejtrekonstrukcióra gyártott szoftver, a *NeuroLucida*. Ennek előnye, hogy nagyon könnyen kezelhető, mindenfajta programnyelv ismerete nélkül is. Hátránya, hogy csak nagyon korlátozott az elvégezhető műveletek száma. Ilyen például a neuronrekonstrukció, vagy a sejtek jelölése.

2. Célkitűzés

Munkám során arra kerestem a választ, hogy a különböző biológiai vizsgálatok esetén a sztereológiai módszereket milyen módon alkalmazhatjuk.

1. Hogyan csökkentjük a kiértékelés szubjektivitását és különböző biológiai mintákon mely elvek használhatóak?
2. Az eredmények vizualizálása hogyan lehet a legvalóságosabb, a műtermékek milyen módon távolíthatók el?
3. Hogyan korrigálhatóak a mintavételi zsugorodás okozta deformításokból adódó hibák?
4. Az adott módszer univerzálisnak tekinthető-e?

A módszerek kidolgozásának tanulságait felhasználtuk az egér szomatoszenzoros kérgében található interneuronok térbeli eloszlásának vizsgálatára. Míg a retinán végzett munkám a képanalízis és a képeken történő sejtszámítás metodikai részére korlátozódott. A kérdések, melyre a választ kerestem, hogy milyen módon lehet a meglévő forrásainkkal rétegek vastagságát meghatározni, illetve hogyan becsülhetjük meg a sejtszámot és annak változását? A szomatoszenzoros rendszerben végzett kutatásaimban részben a korábbi módszertani elveket használtam, részben pedig azt a problémát próbáltuk megoldani, hogy a különböző irányú metszések egymással hogyan válhatnak összehasonlíthatóvá?

A retinán kialakított módszereket alkalmazva a barrelkortexben az alábbi kérdésekre kerestünk választ.

1. Van-e különbség a barrel asszociált oszlop és az őket elválasztó szeptum között a gátló interneuronok tekintetében?
2. Ha van eloszlásbeli különbség, akkor az milyen funkcióbeli következményekre utalhat az irodalmi adatok alapján?

3. Módszerek

3.1. A ZDF patkány, valamint Shaw-versenyegerének retináján végzett vizsgálatok

A ZDF patkányok, valamint Shaw-versenyegerén végzett vizsgálatok során az állatok feldolgozásában és az adatgyűjtésben nem vettem részt. Munkám itt a mintavételezés és kiértékelés, illetve a készített képek összehasonlíthatóságának metodikájának kidolgozásában való részvételre korlátozódott.

Ezért az állatok feldolgozásának részletes leírására, illetve a festési eljárások bemutatására a dolgozatban nem térek ki. Ennek részletei a következő cikkekben találhatóak: Hammoum és mtsai 2017; illetve Hajdú és mtsai 2019. A következő fejezetben ezen munkafolyamatok ismertetése csak annyiban történik, mely a módszertan megértéshez feltétlenül szükséges.

A retina ganglion sejtjeinek vizsgálata ZDF patkányokon és Shaw-versenyegerén történt. Minden retinán végzett beavatkozás az „Assosiation for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)” irányelveinek megfelelően, ZDF patkányok esetén a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóságának engedélyével (engedélyszám: 22.1/1162/3/2010), míg Shaw-versenyegerén végzett kísérletek a Tunéziai Mezőgazdasági Minisztérium engedélyével történt (engedélyszám 2012–2016/2214–1693).

Kutatásunkban a leptin gén mutációját homozigóta módon öröklő hímek (n=8) alkották a vizsgálati csoportot, míg kontrollként a heterozigóta genotípusú hímek (n=8) szerepeltek. A megfigyeléseket 6 hetes kortól a 32. hétig végeztük.

Shaw-versenyegere esetén a környezeti hatások, diabéteszes komplikációk tanulmányozását 3. és 7. hónapos kor között végeztük, csoportonként 10 állattal. Ennek megfelelően az állatokat 4 csoportba osztottuk: 2 csoport magas zsírtartalmú diétát kapott, a másik 2 csoport egyedei átlagos laboratóriumi körülmények között éltek.

A feldolgozás során Shaw-versenyegere és a ZDF patkányok esetében is „*whole mount*” retinakészítmények és radiális metszetek készültek. A whole mount technika mintegy 40 éve kifejlesztett eljárás, melynek során a retinát egészben távolítják el, majd radialisan végzett széli bemetszéseket követően lapítanak. A széli bemetszések esetenként

szabálytalanul tovább szakadnak. A retinából ilyenkor nem csinálnak metszeteket, hanem egészben vizsgálják.

3.1.1. Immunhisztokémia

A ZDF patkányok és Shaw-versenyegere feldolgozása során 19 különböző festést használt a munkacsoport, részletekért lásd Hammoum és mtsai 2017, valamint Hajdú és mtsai 2019 cikkeit.

3.1.2. Fotódokumentáció

A metszetek fényképezése Zeiss Axio Imager mikroszkóphoz (Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, Germany) kapcsolt Zeiss LSM 780-as konfokális mikroszkóppal, valamint a ZEN 2012-es programmal (Carl Zeiss Meditec AG) történt.

A patkányból készült metszeteken a ganglionsejt festés és a sejtek apoptózisát jelölő TUNEL festés kvantifikálása 40x-es, míg a *stratum plexiforme internum* vastagságát és rétegződését 63x-os nagyítással vizsgáltuk. Shaw-versenyegerei esetén 40x-es objektívvel készítettük a felvételeket.

3.1.3. Retina vastagság meghatározása Shaw-versenyegere és ZDF patkányok esetén

A ZDF patkányok esetén a *stratum plexiforme internum* vastagsága a *nervus opticus*tól felfelé és lefelé 250-500 µm-es távolságban lett meghatározva, határa DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) festés alapján manuálisan rögzített. Összesen 4-4 kontroll és cukorbeteg állatot használva mind a négy retinakvadránsban, 16 célterületen (angolul region of interest, továbbiakban ROI) határoztuk meg a vastagságát és ezeket hasonlítottuk össze egymással.

Shaw-versenyegere esetén a *membrana limitans externa* és *membrana limitans interna* közötti távolságot 6 különböző helyen határoztuk meg korábban leírt metódus szerint (Enzsoly mtsai 2014) 250 µm, 500 µm; és 4000 µm távolságra a *nervus opticus*tól a felső és alsó pólusnak megfelelően, csoportonként négy állat esetében, retinánként minimum négy vimentin ellenanyaggal festett metszeten. A metodika megegyezett a patkányok tanulmányozása során használt módszerrel.

3.1.4. Izodenzitás térképek

Shaw-versenyegere esetén a retináról a felvételeket a mikroszkóp (Carl Zeiss) 10x-es objektívvel, a Zen 2012 szoftverrel készítettük. A felvétel során 5%-os átfedést engedélyezve, online stitching funkciót használtunk. Ezt követően Neurolucida (MBF Bioscience, Colchester, VT, USA) programban a retina kontúrját, a nervus opticus pozícióját bejelöltük, majd 200x200 µm-es mintavételi négyzeteket helyeztünk el szisztematikus random elrendezésben. A mintavevő négyzetek nem képezték a Neurolucida program részét, ezért azokat nekünk kellett megszerkeszteni, ezzel kiegészítve a szoftver funkcióit. A szoftver lehetővé teszi körvonalak kézi rajzolását, de semmiféle támogatást nem tartalmaz szabályos síkidomok, pl négyzetek rajzolásához, sem az oldalhossz, sem a szomszédos objektumok pontos távolságának meghatározásához, pedig ez alapvető fontosságú lenne az általunk legtöbbit használt szisztematikus random mintavételezéshez. A munkafájlokat .asc formátumban is el lehet menteni és így, szemben a natív formátumú .dat fájlokkal könnyen olvashatóak és szerkeszthetőek. Az .asc fájlok tartalma szövegszerkesztővel is módosítható. A mintavevő négyzeteket Microsoft Word VBA (Visual Basic for Application) szkriptként írtam meg. Mivel egy metszeten nagy számú mintavevő négyzetet kellett elhelyezni, ezért ezeknek a koordinátáit nem kézi módszerekkel határoztuk meg. Legtöbbször szisztematikus random mintavételezést használtunk, vagyis a mintavétel egy négyzetrács pontjai szerint történt. (5. ábra).

```

Sub mintavevo_negyzet()
' a metszetet belül annak a tartománynak a megadása, ahová négyzeteket akarunk rakni
xmin = -1014
xmax = 0
ymin = 6297
ymax = 7300
'lépésköz megadása, ilyen messze lesznek egymástól a mintavevő négyzetek mikrométerben
lk = 500
' ciklusváltozók kiválasztása, vagyis hány kört tesz meg vertikálisan (hly) és horizontálisan (hlx)
hlx = (xmax - xmin) / lk
hly = (ymax - ymin) / lk
'mintavevő négyzet mérete mikrométerben
mn = 15
'kezdő sorszám, mivel a munkafájl már eleve tartalmaz objektumokat, ez lesz az első mintavevő négyzet száma.
Ezt minden fájlhoz külön ellenőrizni kell
obj = 3
'horizontális ciklus
For xi = 0 To hlx
'vertikális ciklus
For yi = 0 To hly
'koordináták kiszámítása
x = xmin + xi * lk
y = ymin + yi * lk
'a mintavevő négyzetet kódoló parancssorok létrehozása
Selection.TypeText Text:="(" & Chr(34) & "Sampling Sq" & Chr(34) & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (Color Cyan)" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (Closed)" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (GUID " & Chr(34) & Chr(34) & ")" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (MBFObjectType 5)" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (FillDensity 0)" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (Resolution 1.493377)" & Chr(13)
'koordináták
Selection.TypeText Text:=" (" & x & " " & y & " 0.00 0.04) ; " & obj & ", 1" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (" & x + mn & " " & y & " 0.00 0.04) ; " & obj & ", 1" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (" & x + mn & " " & y + mn & " 0.00 0.04) ; " & obj & ", 1" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=" (" & x & " " & y + mn & " 0.00 0.04) ; " & obj & ", 1" & Chr(13)
Selection.TypeText Text:=") ; End of contour" & Chr(13)
obj = obj + 1
Next yi
Next xi
End Sub

```

5. ábra Mintavevő négyzet létrehozása Microsoft Word VBA szkriptben. A szkript átíratában ugyanazokat a színelemeléseket használom, amiket a szerkesztőprogram felajánl. Ez a kiemelés megkönnyíti a szkript értelmezését a zölden kiemelt magyarázatok segítségével. A kezdőpont koordinátáit nem a metszet valamilyen struktúrája alapján jelöltük ki, hanem a vizsgálandó terület egyik sarkának koordinátája közelében fekvő, véletlenszerűen kiválasztott x és y koordináták alapján. Ezért nem egész számok az $xmin$ és az $ymin$. Mint az a szkriptben is látható, meghatároztuk a területet, ahova a négyzeteket elhelyeztük. Megadtuk továbbá a négyzet méretét. A „horizontális” és „vertikális” ciklusszám pedig a sorok és oszlopok számát határozza meg. Saját ábra.

Az 5. ábrán látható szkript által létrehozott, jelölőnégyzetek rajzolását lehetővé tevő kódot bemásoltam a Neurolucida által használt .asc fájlba. Egy mintavevő négyzet kódja a 6. ábrán látható.

```

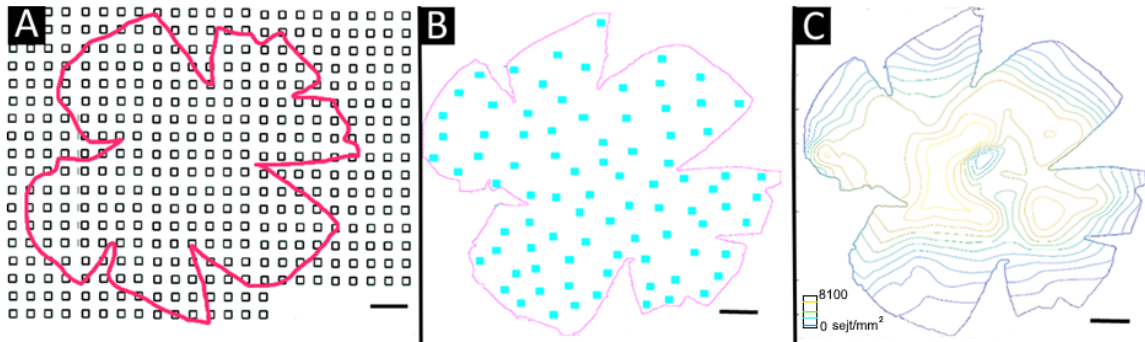
("Sampling Sq"
 (Color Cyan)
 (Closed)
 (GUID ""))
 (MBFObjectType 5)
 (FillDensity 0)
 (Resolution 1.493377)
 (-1000 6300 0.00 0.04) ; 3, 1
 (-985 6300 0.00 0.04) ; 3, 1
 (-985 6315 0.00 0.04) ; 3, 1
 (-1000 6315 0.00 0.04) ; 3, 1
 ) ; End of contour

```

6. ábra Mintavevő négyzet kódrészlete egy általunk írt szkriptből. Ez egy a Neurolucida .asc fájljába illeszthető kódrészlet, ami egy mintavevő négyzetet generál. Ez az egyszerű kódnyelv nem teszi lehetővé megjegyzések beszúrását, csak parancssorokat tartalmaz, viszont lényeges eleme a sorbehúzás mértéke, ami parancssorok hierarchiáját tükrözi. A szkriptrészlet mutatja, hogyan definiálható a négyzet színe (a példában cián), valamint a négyzet négy sarkának x-y-z koordinátái alapján a négyzet helye. Saját ábra.

A 6. ábrán látható kódblokkból annyit hoz létre az 5. ábrán látható szkript, ahány a kívánt terület lefedésére elegendő.

Az adott készítmény köré rajzolható téglalap területére helyeztük el a mintavevő négyzeteket, de értelemszerűen csak azokat használtuk, amik a készítmény körvonalán belülre estek. Így metszetenként átlagban 293 ± 38 mintavételi terület került felhasználásra. Ebben az esetben létrehoztunk egy négyzetekből álló hálót és azt helyeztük a Neurolucida programban a mikroszkópos képek fölé, majd rekonstruáltuk a körvonalat, és a négyzetekben manuálisan jelöltük a sejtek helyét. Így a 7. A ábrán látható rekonstrukció jött létre. Az ábrán az átláthatóság végett a sejtek helye nem lett jelölve.



7. ábra A mintavételezés és izodenzitás térképek készítésének fázisai.

A: Shaw-versenyegerének retinájának körvonala (piros) és az arra helyezett négyzetháló (fekete) sematikus képe. Az ábra egy retinametszet eredeti rekonstrukciója alapján készült. A négyzetekben a sejteket az átláthatóság végett nem jelöltük. A sejtek jelölése a mintákon a négyzeteken belül történt.

B: Random elhelyezett mintavevő négyzetek (türkizkék) a ZDF patkány whole mount retinakészítményén. A sejtek helyét az átláthatóság végett nem jelöltük. A sejtjelölés a négyzeteken belül történt.

C: ZDF patkány retinájának izodenzitás térkép számításának köztes fázisa. A mintavevő négyzetekben számított sejtdenzitás értékeket úgy interpoláltuk, hogy az egymáshoz hasonló értékeket szintvonalyszerűen hamisszínes görbék kötik össze.

Méretvonalak: 1000 μm . Saját ábra.

Munkánk során nem csak a szisztematikus random mintavételezést teszteltük, hanem az egyszerű random mintavételezést is. Ebben az esetben a mintavevő négyzetek koordinátáit nem szabályos négyzetháló mentén jelöltük ki, hanem véletlenszám generátor segítségével (8. ábra). A szkript minimális módosításával elérhető a kívánt eredmény, az így készült mintavételi elrendezés a 7. B ábrán látható.

```

'hány darab négyzetet kell lerakni?
db = 100
'mintavevő négyzet mérete
mn = 15
'kezdő sorszáma
obj = 3
'ciklus
For xi = 0 To db
    'véletlenszámok a koordinátáknak
    x = Int((xmax - xmin + 1) * Rnd + xmin)

    y = Int((ymax - ymin + 1) * Rnd + ymin)

```

8. ábra Véletlenszerűen elhelyezett négyzetek Microsoft Word VBA-ban. Kódrészlet, amivel mintavevő négyzeteket véletlenszerűen lehet elhelyezni a kívánt területen. A mintavevő négyzetek helyét a véletlenszám generátor jelöli ki. A scriptben emellett a darabszámot és a mintavevő négyzet méretét definiáltuk. Saját ábra.

A *nervus opticus* közepét mindkét esetben kézzel rajzoltuk be. Ezt követően a jelölő-négyzetekben manuálisan megszámoltuk a sejteket, majd kiszámítottuk a sejtdenzitás értékeket, melyeket a jelölőnégyzet bal felső sarkának x-y koordinátájához hozzárendeltük. A ZDF patkány esetén 200x200 μm -es mintavevő négyzeteket helyeztünk el, összesen 80 ± 14 db-ot, 51-58 mm^2 méretű retinán. Így összesen a retina 6-7 %-át vizsgáltuk.

Ezt követően a körvonal, a *nervus opticus* középpontja, illetve a sejtdenzitások a helyzetükkel együtt a MATLAB programba (verziószám R2013a MathWorks Inc., Natick, MA, USA) importáltuk. A MATLAB „cubic interpolation” módszer segítségével a „griddata” funkciót használva a kép összes pixelére interpoláltuk a denzitásértékeket (7. C ábra).

Ezt követően a képeket szürkeárnyalatossá alakítottuk, ezáltal olyan térkép jött létre, ahol a szürke árnyalat (0-255) megfelelt a ganglionsejt denzitásnak $1/\text{mm}^2$ -ben kifejezve. Ezeket a képeket izodenzitás térképeknek hívjuk, mivel egy adott világosságérték egy adott sejtdenzitásértéket jelöl.

Shaw-versenyegere esetén a képeket tovább nem transzformáltuk. Az így létrejött izodenzitás képeket hasonlítottuk össze. A minimum és maximum denzitás, átlagos

denzitás, és retinánként az 50 legmagasabb denzitású mintavételi négyzetből számolt átlagok kerültek összehasonlításra.

ZDF patkányok esetén tovább traszformáltuk a képeket. Erre azért volt szükség, mivel a kiterített retina feldolgozása során 4 helyen lett bevágva és a retina félgömb alakja miatt nem teríthető ki sérülés nélkül egy síkba. A vágás optimális esetben minden minta esetén azonos helyen kellene történjen, de ez a minta mérete és fizikai paraméterei miatt technikailag nehezen megvalósítható. Emellett a vágott szélek mentén a minták sérülnek, deformálódnak. Létrehoztunk egy olyan módszert, mely mellett az összeillesztés mentén keletkező üres területeket eltávolítjuk a mintából, de az adott pontok megtartják egymáshoz viszonyított helyzetüket (9. A-D ábra).

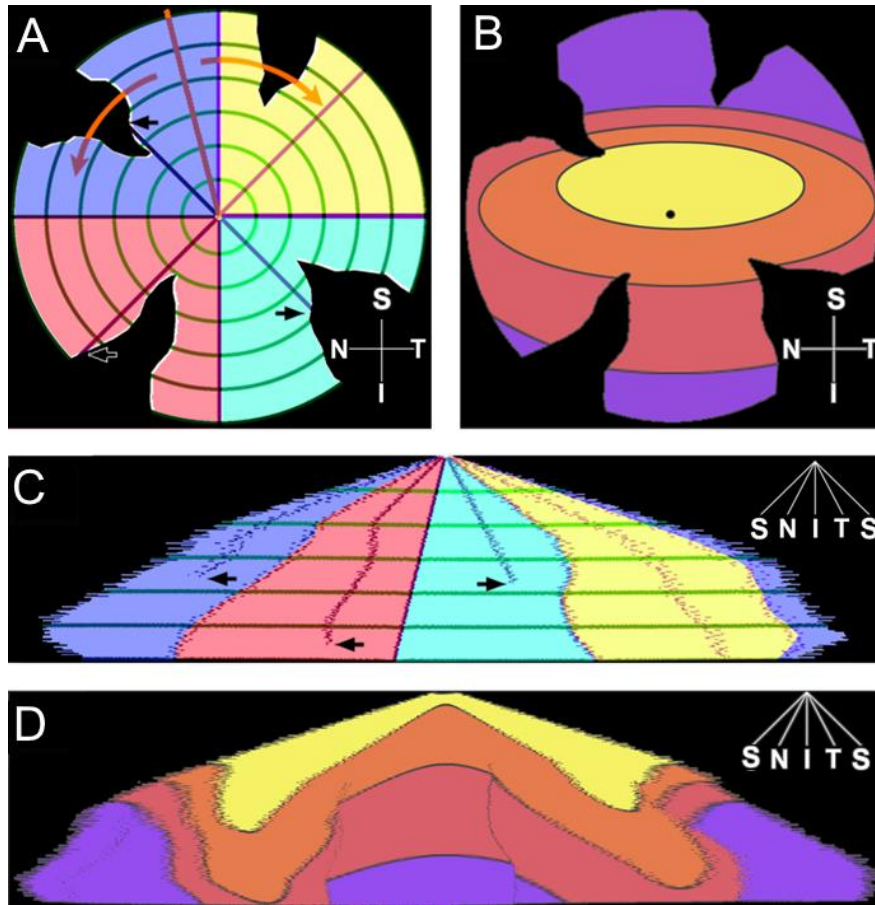
A képpontok helyzetének meghatározásához két viszonyítási pontot használtunk: a felső pólust és a látóidegfőt. A látóidegfőtől mért távolság és a felső pólushoz tartozó szög minden pixel helyét meghatározta. Egyrészt feltételeztük, hogy a lapítás nem befolyásolja az egyes képpontok helyét a középponthez viszonyítva. Másrészt, ha azokat a pixeleket nézzük, amik azonos körön helyezkednek el (aminek a középpontja a látóideg kilépése, 9. A ábra) és egy vágás választja el őket egymástól, akkor azok a pixelek szomszédoknak tekinthetők. Ezért az azonos körön elhelyezkedő pixeleket egyszerűen sorba lehet állítani egy egyenes mentén, a vágásokra eső pixeleket pedig kihagyni.

Ezt követően a pixeleket egy olyan koordinátarendszerbe traszformáltuk, ahol a középponttól való távolság az y tengelyen, a felső pólustól mért szöget pedig az x tengelyen ábrázoltuk. Fontos megjegyezni, hogy az így készült térképen az eredeti kép összes pixele szerepel, az egymáshoz viszonyított topológiai helyzetük nem változik, vagyis a létrejött képen lévő szomszéd pixelek az eredeti képen is a vágás előtt egymás mellett lévő pontok (ld. az eredetileg megszakított körkörös, traszformálva folyamatos horizontális zöld vonalak a 9. C ábrán). A pixeleken átalakítást nem végeztünk, vagyis az eredeti világosságértékek (9. B ábra) kerültek ábrázolásra a traszformált térképen (9. D ábra).

Az így létrejött képek egymással könnyen összehasonlíthatóvá váltak. A *nervus opticus* használva illesztési pontként, a FIJI programban egymás fölé helyezhetővé váltak a képek, létrehozva így egy többretegű képet. Az izodenzitás térképek *minimum intenzitás projekciója* (amely minden kép azonos helyen levő pixelei közül a legsötétebbet választja ki az egymásra vetített képek közül, így hozva létre egy új képet) kirajzolta az átfedő

területeket (10. ábra lila körvonal), míg a *maximum intenzitás projekciója* (hasonló, mint a minimum intenzitás projekció, de itt koordinátáinként a legvilágosabb pixelt veszi) megadta azt a térképet (10. ábra rózsaszín körvonal), mely ideális esetben lenne (tehát, ha nem vesztenénk anyagot a feldolgozás során). A két térkép közötti különbség megadja, hogy a feldolgozás során mekkora retinaszövet veszett kárba. Ezt követően az átfedő régiókra és a teljes retinára meghatároztuk az retina ganglion sejtjeinek (retinal ganglion cell - RGC) átlagos denzitását.

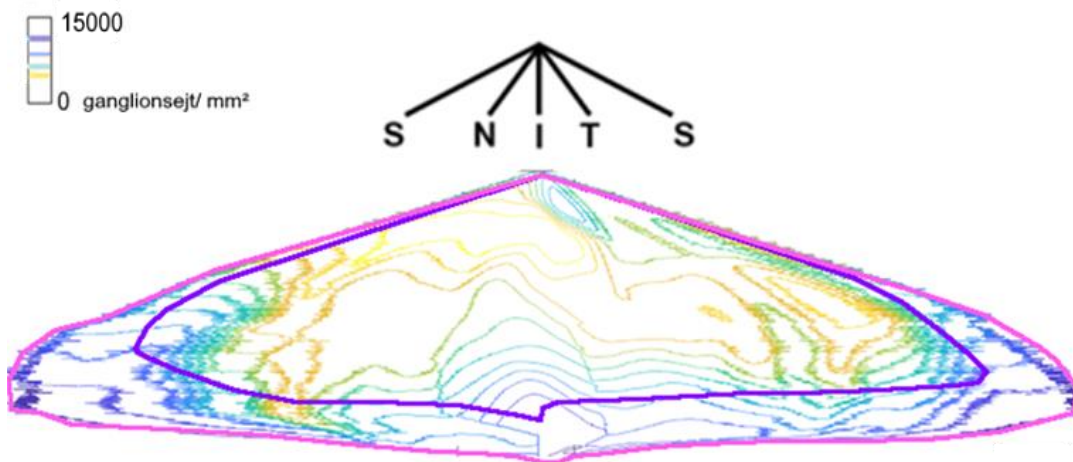
A kontroll retinák átfedő régióiból egy *átlagos intenzitás projekció* készült, melynek denzitása az „átlag kontroll denzitást” adta. Az egyes retinák denzitásértékeit kivonva (mind a kontroll, mind a cukorbeteg csoportban) az „átlag kontroll denzitás” értékekből, látható a csoportok szórása.



9. ábra Transzformált izodenzitás térkép létrehozásának lépései.

A: whole mount retina kiterített sematikus képe. A négy kvadráns eltérő színekkel jelölve. A dorsalis irányt narancssárga vonallal jelöltük. Az orientációhoz a lila és kék egyenesek radiális irányú segédvonalak, illetve a zöld koncentrikus körök szolgálnak. Minden pixel távolságát meghatároztuk a látóidegfőtől, illetve kiszámoltuk az orientációs vonallal bezárt szögüket. Ezt követően minden pixelt újrapozicionáltunk (a szöget az x tengelyre, a távolságot az y tengelyre vetítve). A retinát virtuálisan a narancssárga vonal mentén nyitottuk szét. A fekete nyilak a lila és kék segédvonalakat emelik ki. B: konvencionális retina whole mount rekonstrukció, ahol a különböző színek eltérő denzitásértékeket reprezentálnak. A fekete pont a nervus opticusot jelöli. C: az "A" ábra ismertetett transzformációja révén létrejött transzformált kép. Az eredetileg zöld koncentrikus körök zöld horizontális vonalakként, a lila és kék radiális segédvonalakat a fekete nyilak jelzik, mint látható nem érik el az alapvonalat, s ezek mentén a szakadás két szélé egymás mellé került. D: a „B” ábrán bemutatott ideális retina transzformáció utáni képe.

S: superior; I: inferior; N: nasal; T: temporal. Saját ábra.



10. ábra ZDF patkány retinájának izodenzitás térképe. A 7.C. ábrán bemutatott whole mount retina transzformálásával és a szakadások eliminálásával készült kép. A lila körvonal az úgynevezett „minimum intenzitás projekció”, ami azt a területet mutatja meg, amit az összes vizsgált retina tartalmaz. A rózsaszín körvonal a „maximum intenzitás projekció”, ami a nem átfedő retinarészeket tartalmazza. Itt az összehasonlítás eredménye korlátozottan használható. S: superior; I: inferior; N: nazális; T: temporális. Saját ábra.

3.1.5. Statisztikai analízis

Minden eredményt átlag \pm SD értékben, a denzitást $1/\text{mm}^2$ -ben fejeztük ki. A normál eloszlás vizsgálata Shapiro-Wilk módszerrel történt. Az eredményeket kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. Szignifikanciahatárként $p < 0,05$ -t használtunk.

3.2. GABAerg neuronok eloszlásának vizsgálata során használt anyag és módszer

A szomatoszenzoros rendszer vizsgálata során 3 különböző, genetikailag módosított egértípust használtunk: keresztezett PVcre/tdTomato (B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J keresztezve B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J egerekkel) ($n=6$; hím) (Oliva mtsai 2000). Ezekben az egerekben a PV sejtekben pirosan fluoreszkáló fehérje, tdTomato expresszálódik, míg az SST sejtek egy csoportjában zölden fluoreszkáló GFP termelődik. Emellett SSTcre/tdTomato egereket (Ssttm2.1 (cre)Zjh/J keresztezve B6.Cg-

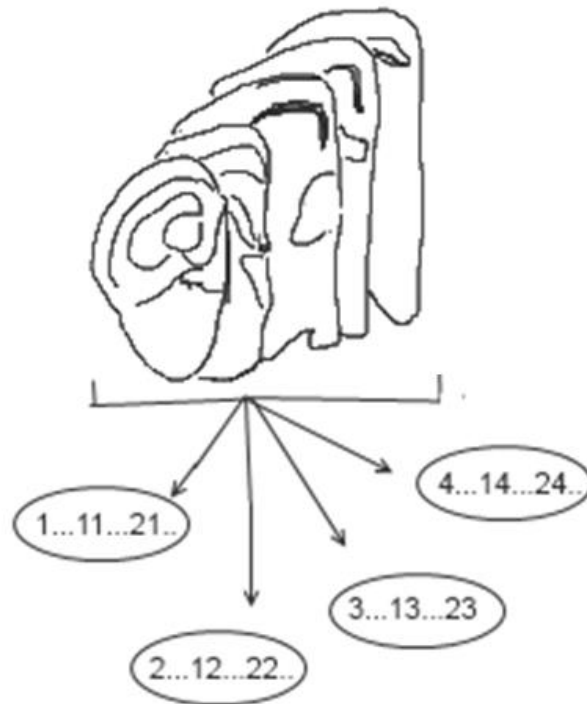
Gt (Rosa)²⁶Sortm9(CAG-tdTomato) Hze/J) (n=7; hím) használtunk az összes SST sejt vizsgálatára.

VIP tartalmú GABAerg sejtek tanulmányozása VIP^{cre}/tdTomato (VIP^{tm1(cre)}Zjh keresztezve B6.Cg-Gt(ROSA)²⁶Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/j) egereken (n=6; hím) történt. Az állatok a feldolgozás idején 6-8 hetesek voltak. Az állatok feldolgozása a Bázeli Egyezménynek megfelelően, az állatkísérleteket szabályozó németországi törvényeket betartva a LAVES (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) engedélyével történt. A munkát németországi tanulmányút során végeztem, így az állatok feldolgozása és tartása nem a magyar, hanem a Németországban előírt szabályoknak megfelelően történt.

3.2.1. Szövetek feldolgozása és immunhisztokémia

Az állatokat ketaminnal túlaltattuk, majd a vért 0,9%-os NaCl oldattal kimostuk. A kimosást 4%-os paraformaldehidet tartalmazó, 0,1 M-os foszfát puffer oldattal (pH = 7,4) történő fixálás követte. Ezután az agyat eltávolítottuk, két agyféltekére szétválasztottuk. A bal agyféltekét Welker módszere szerint lapítottuk (Welker és Woolsey, 1974) és két órán át lapítva fixáltuk. A jobb féltekék utófixálása változatlan formában történt, szintén két órán át. Mindkét féltekét 50 µm-es nominális vastagságúra metszettük egy VT1200S típusú mikrotómmal (Leica, Nussloch, Németország). A bal agyféltekékből tangenciálisan, a jobb féltekékből koronális síkban készítettük a metszeteket.

A koronális metszeteket a feldolgozás során 10 csoportba raktuk. Rekonstrukcióra azonban csak egy csoportot használtunk, így az össztérfogat 10%-át elemeztük (11. ábra).



11. ábra Frontális metszés során alkalmazott mintavétel. A sorozatmetszet 1. metszete kerül az 1. csoportba, majd 10.-ig minden metszet másik tárolóba került. A 11. metszet az 1. metszethez, a 12. metszet a 2. metszethez és ezt a rendszert addig folytatjuk, míg a vizsgált térfogatot le nem metszettük. A metszési koordinátákat az Allen Brain Atlasz alapján határoztuk meg (Allen Institute for Brain Science 2011; mouse.brain-map.org). A gyűjtés kezdetét úgy határoztuk meg, hogy az első metszetek a vizsgálni kívánt tartomány előtti régióból származnak, s az utolsó metszetek pedig a célterület mögötti régió eleje legyen. Saját ábra.

A PV+ állatok metszetei TRIS pufferben 0,3% Triton X-100-at tartalmazó /TBST; 0,1 M, pH = 7,4/, 1:2500 hígítású nyúl anti-GFP (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) 2 napig, majd 2 órán át TBST-ben 1:500-as hígítású Alexa488-al kapcsolt anti-nyúl IgG (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) oldatban inkubáltuk.

A PV+ sejtek elegendő mennyiségben expresszáltak tdTomatot, így további jelerősítésre nem volt szükség.

Az SSTcre/tdTomatot expresszáló, valamint a VIPcre/tdTomatot termelő állatok metszetei egyaránt TBST oldatban 1:10000 koncentrációban hígított tengerimalac anti-

vezikuláris glutamát transzporter 2 (vGlut2; Millipore, Németország) oldatban lett inkubálva 2 napig, majd 2 órán át TBST-ben 1:500-as hígítású Alexa488-al kapcsolt tengerimalac elleni IgG oldatban inkubáltuk a barrelek identifikálása.

A sejtmagokat 1:1000 hígítású DAPI-val (Thermo Fisher, Németország) festettük meg. A metszeteket ezt követően AquaPolymount (Polysciences, Németország) lefedőanyaggal fedtük le. A 98/79/EG guideline-nak megfelelő, szoda-mész- üveg alapú, 76x76 mm-es, 1 mm vastagságú, Superior tárgylemezt használtunk.

3.2.2. Képfeldolgozás és rekonstrukció

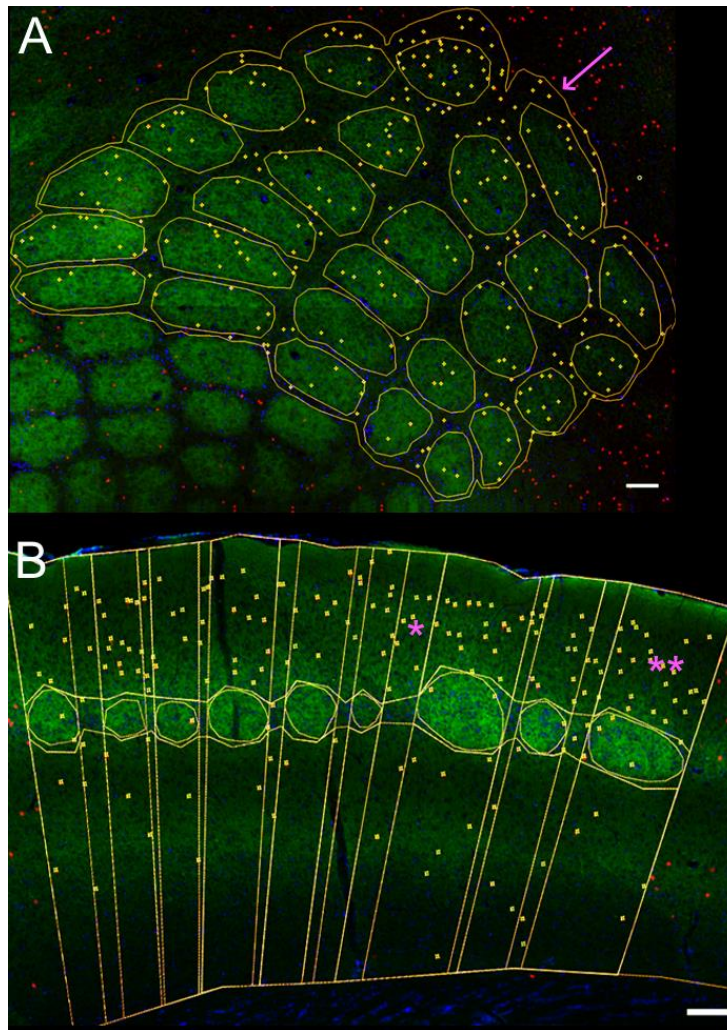
A fotódokumentáció epifluoreszcens mikroszkóppal, ApoTome feltétet használva, (Axio Imager M2; Zeiss, Jena, Germany; 5x A-Plan objektív, NA 0,12 vagy C-Plan Neofluar objektív, NA 0,3), „virtual tissue photomontages” Neurolucida szoftverrel történt (MBF Bioscience, Colchester, VT, USA).

3.2.3. Sejteloszlás rekonstrukciója

A tangenciális metszetekből készült képeket a vertikálisan futó erek alapján egymás fölé igazítottuk, így egy több optikai síkot tartalmazó kép jött létre. Neurolucida programban először az LIV területén a barrelek, valamint a barrelmező határát határoztuk meg. Ez is a DAPI, illetve a vGluT2 festés révén rajzolódott ki. Ezt követően az így létrejött körvonalakat a szupragranuláris és infragranuláris rétegbe vetítettük (12. A ábra).

Az egyenlőtlen sejteloszlás statisztikai eredményei egyes barreleket vizsgálva nem feltűnőek, ezért barrelek mikroszkópos képeinek egymásra vetítésével tettük egyértelműen láthatóvá a sejtek doménpreferenciáját. A barrelek tangenciális metszetekből származó képeit egy képfájl egymás fölötti képrétegeibe importáltuk. Az ovális alakú barrelek legnagyobb és legkisebb átmérőjét, valamint középpontjait egymáshoz igazítottuk, de a méreteiket nem változtattuk. Ezt követően, mivel sötét háttérű képekről van szó, a rétegek információtartalmát *maximum intenzitás projekcióval* transzformációval FIJI programmal egy képsíkba vetítettük. Ilyenformán az egymás fölé igazított barrelek egymás kontúrját erősítve kirajzolnak egy átlagos barret, míg a körülöttük elszórt, képsíkonként néha csak 1-2 sejt összessége már jól demonstrálja a kvantitatív eredményeket.

A koronális metszetekben az LI, LII/LIII, LVa, LVb, LVI, pia mater és fehérállomány, valamint a teljes barrelmező határát a DAPI festés alapján határoztuk meg (12. B ábra).

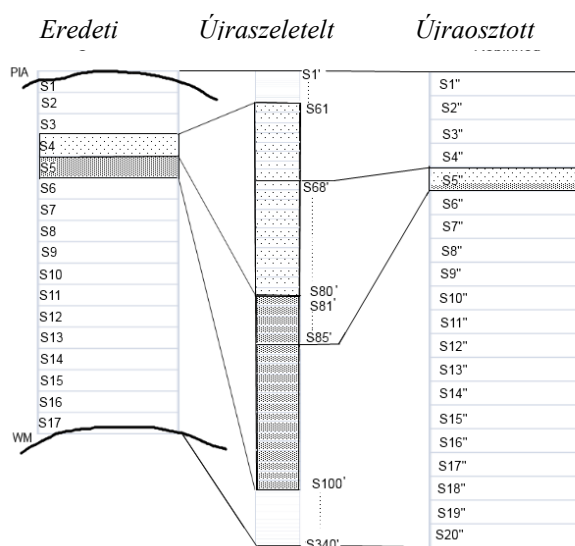


12. ábra Barrelmező tangenciális és frontális metszetén történt rekonstrukció VIP+ állatban. A: tangenciális metszet LIV magasságában. A zöld ovális képződmények az eredeti mikroszkópos képen látható barrelek, a körülöttük lévő sárga vonalak az általunk készített barrelrekonstrukciók körvonala. A rózsaszín nyíl a poszteromediális barrelmező körvonalára mutat. B: frontális metszet rekonstrukciója. A zöld ovális képződmények a frontális metszeten is a barrelek, a körülöttük lévő sárga vonalak a rekonstrukciót jelölik. A függőleges vonalak a barrel asszociált oszlopot (rózsaszín **) és szeptumot (rózsaszín *) jelenítik meg. A VIP+ sejtek helyét az A és B ábrán is sárga csillagokkal jelöltük. A barrelek zöld színét a talamokortikális rostokban halmozódó vGLUT2, a kék hátteret a DAPI festés okozza. A piros pontok a sejtek eredeti fluoreszcenciája, mely a tdTomato expresszió eredménye. Méretvonal: 100 μm ; Saját ábra.

Ezt követően a PV, SST és VIP sejteket a kortikális doménektől függetlenül, a programban manuálisan jelöltük. Az így létrejött rekonstrukciókat a NeuroLucida segédprogramjának, a NeuroLucida Explorernek (MBF Bioscience, Colchester, VT, USA) a segítségével elemeztük. A következő adatokat kaptuk ezáltal: sejtszám, a körülrajzolt mezők területe (barrel, szeptum, és az ehhez kapcsolódó kortikális domének), valamint a GABAerg sejtek koordinátái, a pia mater és fehérállományi határtól mért távolságaik. A kapott eredményeket Microsoft Excelbe (Microsoft Corporation, Albuquerque, NM, United States) importáltuk, s ott folytattuk az elemzést az alábbiak szerint.

3.2.4. Adatfeldolgozás

Miután a barreleket azonosítottuk a koronális metszeten, az egyes rétegek távolságát lemértük, és mind a medio-laterális, mind a rosztro-kaudális koordinátákat regisztráltuk. Ezeket a paramétereket használtuk a lapított metszetek térfogatának korrekciójához. Ezt követően a tangenciális metszeteket újraosztottuk 20 virtuális metszetbe, ezzel sztenderdizálva a cortex vastagságából adódó különbségeket. Az újraosztás lépései a 13. ábrán láthatók.



13. ábra A tangenciális metszetek újraosztásának lépései. S1-17 az eredeti metszetszám. A végső cél 20 metszet volt, így egy közös metszetszámmra volt szükség, mely az eredeti metszetszám és a 20 újraosztott metszet legkisebb közös többszöröse. S1'-S340' ezt a közös virtuális „darabolás” eredményeként létrejött elemszám. S1''-S20'' az újraosztott metszeteket jelöli. PIA: pia mater; WM: fehérállomány.

A koronális metszeteken a kéreg átlagos vastagsága a pia mater és a fehérállomány határa között ugyanis $1019,164 \pm 38,55 \mu\text{m}$ volt, melyet $50 \mu\text{m}$ vastag metszetekre osztva kb. 20 tangenciális metszetet kapunk. A tangenciális metszetek vágása során azonban változó metszetszámot kaptunk (15-19), mely a lapítás során alkalmazott különböző erőtől és az egyedek közti méretbeli eltérésektől, valamint az egy metszeten belül a medio-laterális helyzettől is függött, mivel a kéreg laterális irányban vastagszik.

A koronális metszeteken a réteghatárok meghatározásához vizsgált sejtek denzitásait ábrázoltuk, majd az így létrejövő görbék inflexiós pontjai mentén kirajzolódtak az egyes rétegek határai. Mivel a kortex és az egyes rétegek vastagsága rosztro-kaudalisan és medio-laterálisan változik, ezért az alapadatokat statisztikailag összehasonlítható egységekké transzformáltuk. A kortikális metszetek vastagságát is normalizáltuk, mely a réteghatárok alapján, az inflexiós pontok szerint történt (Pohlkamp és mtsai 2014).

3.2.5. Statisztikai analízis

Az eloszlás vizsgálatára Shapiro-Wilk tesztet használtunk. Az adatok nem normál eloszlást követtek, így a különbségek szignifikáns voltát Kruskal-Wallis tesztel vizsgáltuk. A denzitásokat $1/\text{mm}^3$ -ben, átlag \pm szórás formátumban adtuk meg. A tangenciális és koronális metszetek adatait ábrázoltuk, és a korrelációs koefficiens meghatároztuk. Ez alapján a tangenciális és koronális metszetek denzitásértékei egymással korreláltak, így az adott területek adatait összevonva értékeltük.

4. Eredmények

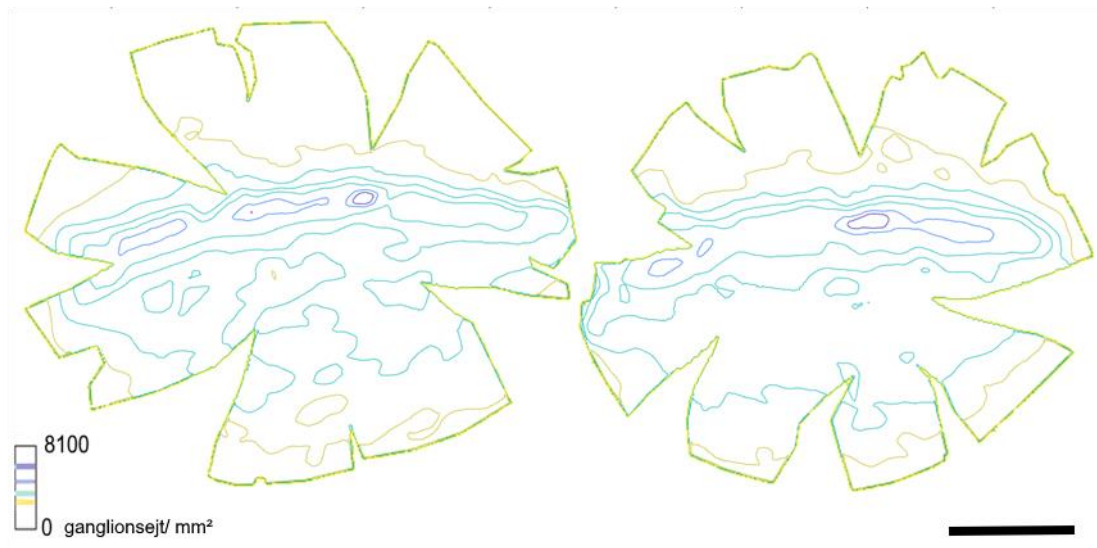
Az előző fejezetben megismert módszerekkel feldolgozott szövetekben tett megfigyeléseket az alábbiakban ismertetem. Először vázolom, hogy Shaw-versenyegerén és a ZDF patkányokon végzett kísérletek során az azonos anatómiai területek ellenére milyen képfeldolgozási különbségeket kellett alkalmazni az összehasonlíthatóság érdekében, illetve, hogy milyen sztereológiai elveket valósítottunk meg. Második részben bemutatom, hogy a szomatoszenzoros rendszerénél mennyiben térnek el a retinánál ismertett sztereológiai elvek és azok mely számszerűsített biológiai eredményekhez vezettek.

Mivel munkám a metodikára korlátozódott a retina esetén, így az eredményeink nem a kvantitatív kiértékelésre fókuszálnak, hanem maga a feldolgozás, illetve az eredmények transzformálása révén kialakult ábrázolásmód létrehozására.

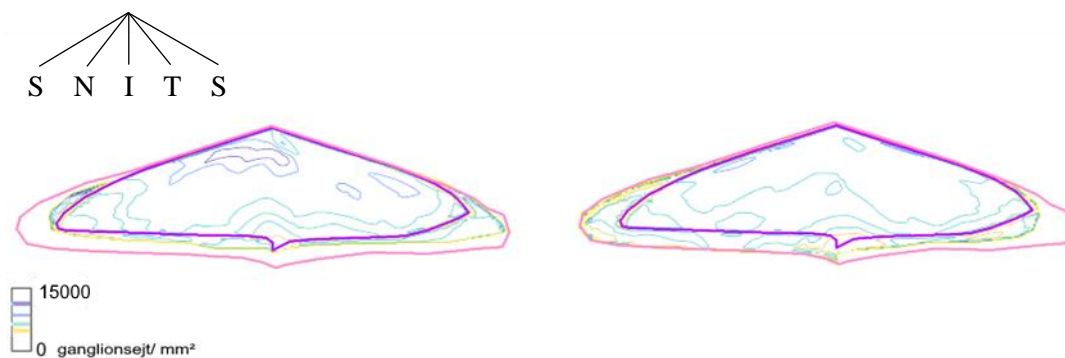
4.1. ZDF patkányokon és Shaw-versenyegerén végzett kutatás eredményei

Shaw-versenyegere esetén a whole mount rekonstrukciókat utólag nem transzformáltuk, így ott az egymásnak megfelelő területek vizuálisan nehezebben vethetőek össze. Ennek ellenére a különbség statisztikailag kiszámolható. A nagyobb különbségeket a nem transzformált ábrákon is lehet látni. Ha a *14. ábrát* megnézzük, akkor az is jól látszik, hogy a középső részen látható egy nagyobb denzitású terület, amit sötétebb kék vonalak jelölnek, mely a nem sérült részen helyezkedik el. Ez az úgynevezett visual streak. Ennek a horizontális sávnak a helyzete és alakja miatt könnyen megfelelő orientációt érthetünk el, illetve a sávokat egymásra vetítve a zónák megfelelő átfedését tapasztaltuk. A *14. ábrán* látható továbbá, hogy a sötétkék terület mind a bal, mind a jobb oldali rekonstrukción közepén helyezkedik el, a szélek mind a két izodenzitás térképen halványak. Így már az ábra alapján is tendenciaszerű változásokat ránézésre is lehet sejteni. A méretbeli, illetve az eltérő vágási helyek miatt azonban nehezebben látható elsőre, hogy a nagy denzitású, sötétkék területek, vagy az alacsony denzitású, nagyon halványárga területek mérete hogyan viszonyul egymáshoz.

A ZDF patkányokon végzett kísérlet során az izodenzitástérképeket a módszertan 3.1.4.-es fejezetben ismertetett módon tovább transzformáltuk. Az így létrejött ábrákon az állatok retinájának méretbeli szórása, valamint az átlag retinaméret is látható (*15. ábra*).

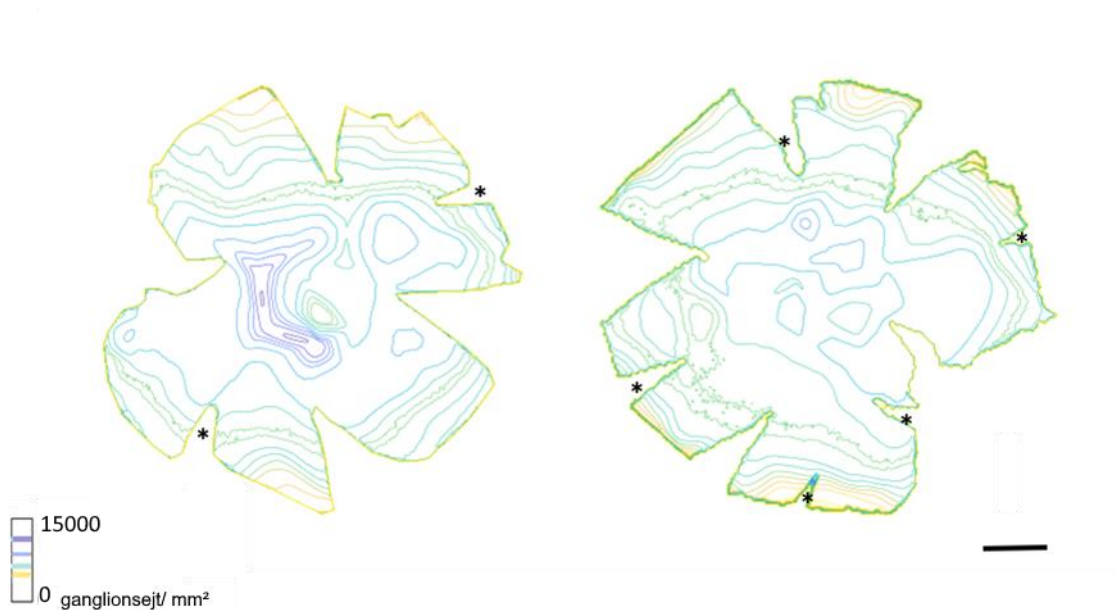


14. ábra Shaw-versenyegere feldolgozása során 2 csoportból készített izodenzitás térkép. Munkánk közbülső folyamatából származó kép, ami további transzformációk után előálló végső formájában a következő cikkben szerepel: Hammoum és mtsai 2017. A képen a sötét színek a nagyobb denzitású, míg a világos színek a kisebb denzitású területeket jelölik. Méretvonal: 1000 μm . Saját ábra.



15. ábra ZDF patkány transzformált izodenzitás térképek. A transzformáció eredményeként látható, hogy a szakadások eltűntek. A színes kép az adott retina, a belső lila körvonal az átfedő területet, míg a külső rózsaszín körvonal az ideális retinaméretet mutatja két különböző egyed retináján ábrázolva. A rózsaszín és a lila körvonal közötti terület mutatja azt a retinarégiót, ami a sérülések miatt nem vizsgálható a preparátumok egy részében. S: superior; I: inferior; N: nazalis; T: temporalis. Saját ábra, Hajdú és mtsai 2019 képeinek módosított változata.

A 15. ábrán megfigyelhető transzformált izodenzitás térképek 16. ábrán látható nem transzformált változatai ezzel szemben nem mutatják, hogy az adott egyed retinája milyen módon viszonyul az átlaghoz. Míg Shaw- versenyegerén a „visual streak” segítségével a központi részek megfelelő átfedése elérhető volt, addig a ZDF patkányokon a korong alakú sárgafolt kevésbé jó átfedést biztosít.



16. ábra ZDF patkányok retinájából készült izodenzitás térképek transzformáció nélkül. Két egyed retinájának izodenzitás térképe transzformáció nélkül. A művi négy bevágás mellett több apró csillaggal jelölt beszakadás látható, mely az egymásra vetítést lehetetlenné teszi. Méretvonal: 1000 μm . Saját ábra.

4.2. A szomatoszenzoros kéreg GABAerg neuronjainak eloszlása génmódosított egerekben

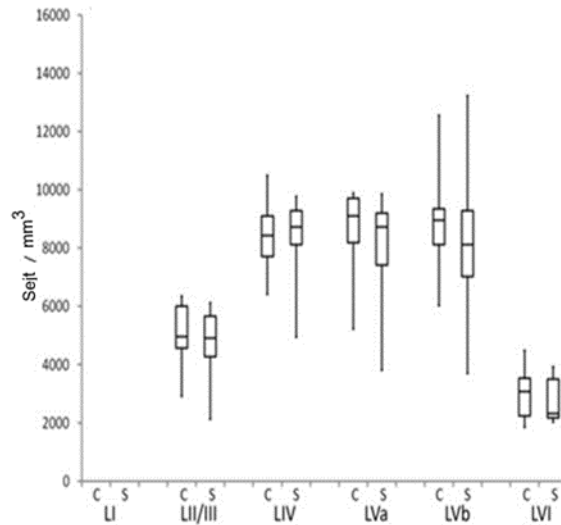
A módszertannál részletezett sztenderdizálási módszer segítségével a 3.2.4. fejezetben korábban említett, a feldolgozásból adódó méretkülönbségeket kiküszöbölve a tangenciális és koronális metszetek értékei összevethetővé váltak. Tekintve, hogy az identikus területek sejtszám és eloszlás tekintetében minden sejttípus esetén erősen korreláltak, így a további analízishez a kétféle metszés mintáit egy csoportnak tekintettük. Korrelációs koefficiensek PV+ GABAerg sejtek esetén $n=6$; $r^2=0,925$, SST+ GABAerg neuronok esetén $n=7$; $r^2=0,940$, míg VIP pozitív neuronoknál $n=6$; $r^2=0,973$. Az eloszlások különbségeit minden sejttípus esetén Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk. Az alábbiakban sejttípusonként kerül bemutatásra, hogy a vázolt elvek milyen számszerű eredményekhez vezettek (17-22. ábra).

4.2.1. PVcre/tdTomato-expresszálo GABAerg neuronok eloszlása

A sejtdenzitások elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a PVcre/tdTomato expresszálo GABAerg sejtek az LIV és LV/LVI zónákat preferálják. A sejtek $26,17 \pm 2,73\%$ -a az LIV, $14,84 \pm 1,94\%$ -a az LVa és $27,15 \pm 1,49\%$ -a az LVb-ben helyezkedik el. Az LI, LII/LIII és LVI rétegekben mindössze a neuronok $31,83 \pm 1,99\%$ -át találtuk. A sejtek rétegenkénti százalékos megoszlása jól látható a 18. ábrán.

A lamináris eloszlást tekintve elmondható, hogy az LI réteget a sejtek elkerülik, illetve az LII/III rétegben és az LVI rétegben is jóval kisebb számban helyezkednek el, mint az LIV, LVa és LVb és b rétegében. Ugyanakkor az LIV és LV területén egyenletesen oszlanak meg (17. ábra, 19. ábra A, B). Az egyes rétegek sejtdenzitás adatai a 2. táblázatban, míg a sejtrétegek közötti eltérésekhez tartozó szignifikancia szintek a 3. táblázatban láthatóak.

A szeptum és barrel asszociált oszlop eloszlását vizsgálva az LII-től a LVI réteig a sejtek egyenletesen helyezkednek el a kompartmentekben. Az LIV esetén a barrelekben valamivel több sejtet találtunk, mint a szeptumban, de a különbség itt sem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,885$; 22. ábra A, D, G, J)



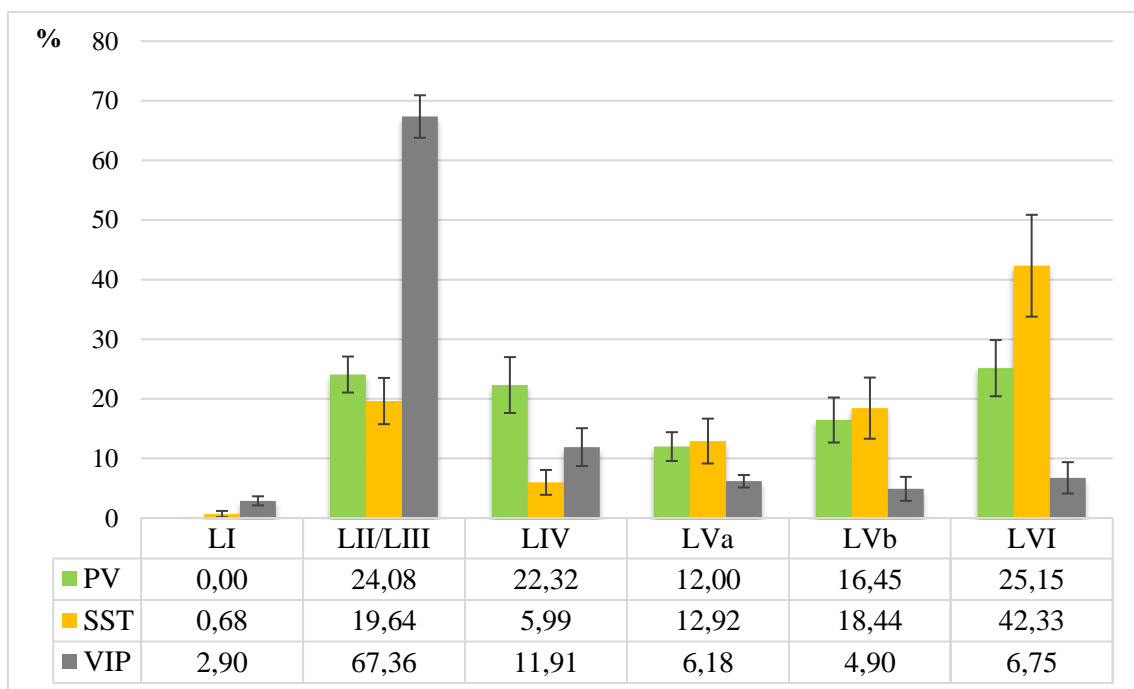
17. ábra PV+ sejtek eloszlása a barrel asszociált oszlop (column, C) és szeptum (S) között. Az eredmények 6 agyfélteke feldolgozásából származnak. A lamináris eloszlások közötti szignifikáns különbségeket nem jelöltük az ábra átláthatósága érdekében. Az ábrán jól látható, hogy a sejtek az LIV és LV-ben egyenletes eloszlást mutatnak. Saját ábra.

2. táblázat. PV+ sejtek denzitásértékei az egyes kortikális rétegek kompartmentjeiben. Az oszlop a LIV-ben található barrel és vertikálisan alá, vagy fölé eső szupra- és infragranuláris kéregrészeket jelöli, míg a szeptum a LIV-ben található interbarrel szeptumok hasonló kiterjesztését a pia és a fehérállomány irányába.

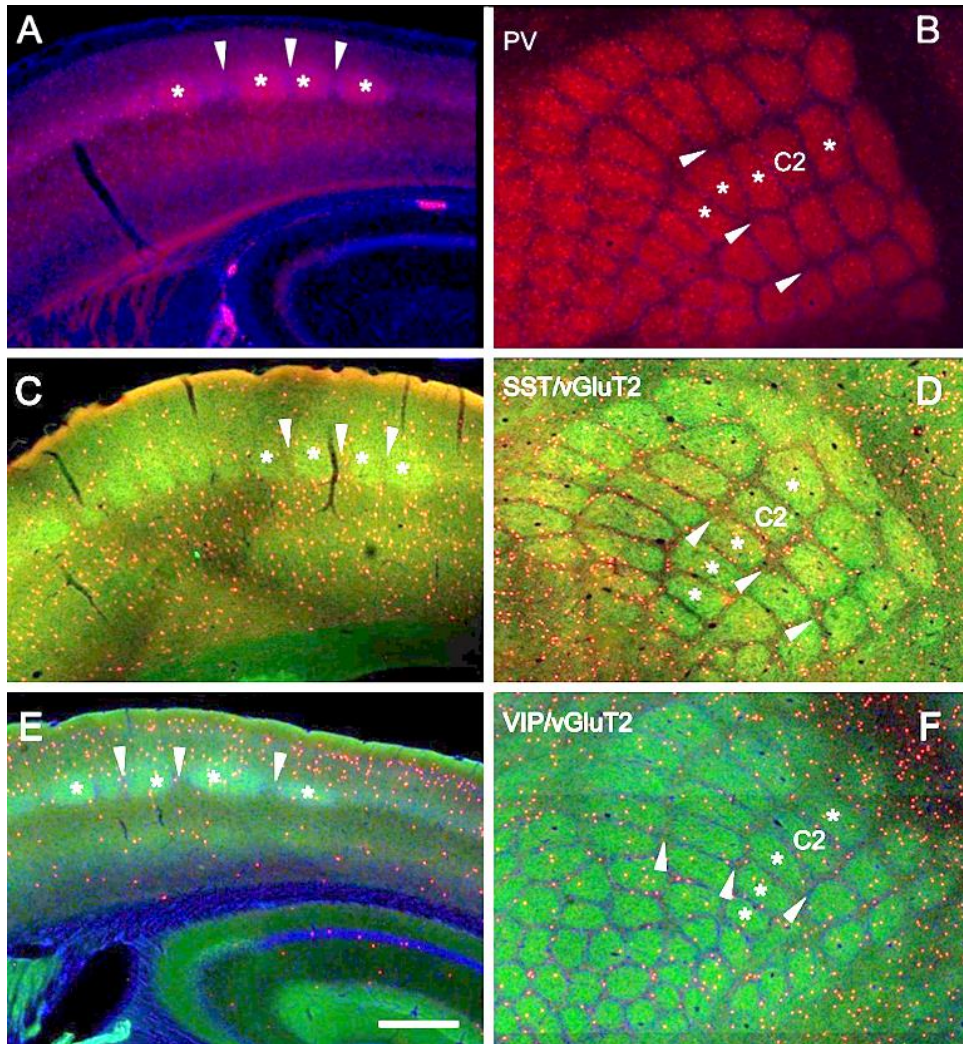
	sejtdenzitás az oszlopban ± szórás (1/mm ³)	sejtdenzitás a szeptumban ± szórás (1/mm ³)
LI	0 ± 0	0 ± 0
LII/III	4995,65 ± 1278,58	5050,46 ± 2012,55
LIV	8426,59 ± 1405,35	8252,19 ± 1751,12
LVa	8510,96 ± 1766,67	7904,56 ± 2217,68
LVb	8964,038 ± 2143,11	8244,73 ± 3170,58
LVI	3017,66 ± 1003,13	2766,40 ± 877,38

3. táblázat PV+ sejtek rétegek közötti megoszlásához tartozó szignifikancia szintek. A narancssárga kiemelés a szignifikánsnak bizonyuló szignifikanciaszinteket jelöli. A fehér háttérű négyzetek a nem szignifikáns szinteket mutatják.

	LI	LII/III	LIV	LVa	LVb	LVI	
LI							
LII/III			0,01	0,025	0,016	0,025	
LIV				0,631	0,873	0,004	
LVa					0,522	0,004	
LVb						0,004	
LVI							



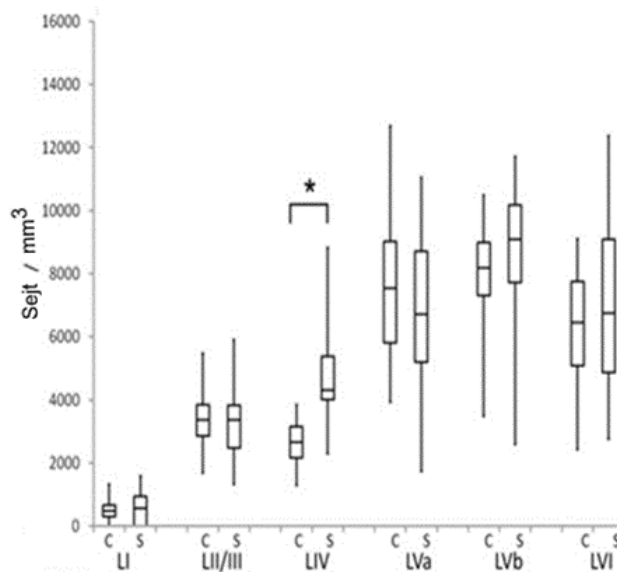
18. ábra GABAerg neuronok százalékos megoszlása a rétegek között. A zöld oszlopok a PV+, a sárga a SST+, míg a szürke oszlopok a VIP+ sejtek rétegenkénti százalékos megoszlását mutatja. Jól látható, hogy a PV+ sejtek LII/III és LIV rétegben hasonló mértékben helyezkednek el. Az SST+ neuronok az infragranuláris területet preferálják, míg a VIP+ sejtek a szupragranuláris rétegben helyezkednek el nagyobb számban.



19. ábra GABAerg sejtek eloszlása frontális és tangenciális metszeteiken. PV+ sejtek koronális (A) és tangenciális (B) metszetein úgy tűnik, hogy a PV+ sejtek (piros pontok) nagyobb számban a barrelben helyezkednek el. A kvantitív analízis ugyanakkor egyenletes eloszlást mutat. A barreleket csillagokkal és a szeptumokat nyílhegygel jelöltük. SST+ sejtek (piros pontok) az infragranuláris réteget preferálják (D). A koronális (C) és tangenciális (D) metszeteiken LIV-ben valamivel több sejt helyezkedik el az interbarrel szeptumban. VGluT2 (zöld) egyértelműen kirajzolja a lemniszkális talamikus útvonalnak megfelelő barreleket az LIV-ben (E, F). VIP+ sejtek (piros pontok) frontális síkú metszeteien (E) látható, hogy a szupragranularis rétegeket preferálják. LIV magasságában készített tangenciális metszeten (F) az interbarrel szeptumban több sejtet láthatunk, mint a barrelben. A C2-es barrel jelölése a tájékozódást segíti. Méretvonal: 500 μm . Saját ábra.

4.2.2. SST- expresszáló GABAerg neuronok eloszlása

Az SST+ sejtek a többi sejttípussal ellentétben az infragranuláris réteget preferálják. A sejttestek $73,69 \pm 5,37\%$ -át találtuk az LV és LVI rétegekben (18. ábra). A rétegeket egymással összehasonlítva elmondható, hogy az LVa, LVb és LVI sejtrétegekben egyenletesen oszlanak el a sejtek, és szignifikánsan több neuront találtunk, mint az LI, LII/III, illetve LIV-ben (5. táblázat). Az egyes rétegek sejtdenzitásai a 4. táblázatban láthatók. A rétegeken belüli eloszlást tekintve elmondhatjuk, hogy a sejtek az LIV kivételével homogéneusan oszlanak el a rétegeken belül (22. ábra B, E, H, K; 20. ábra). LIV-ben viszont szignifikánsan több sejtet találtunk a szeptumban, mint a barrelben ($p < 0,0001$; 20. ábra; 19. C, D ábra; 22. H, K ábra).



20. ábra SST+ sejtek eloszlása rétegenként a barrel asszociált oszlop (column, C) és szeptum (S) között ($n=7$). A lamináris eloszlások közötti szignifikáns különbségeket nem, de az LIV rétegen belüli szignifikáns különbséget csillaggal jelöltük ($p < 0,0001$). Saját ábra.

4. táblázat SST+ sejtek denzitásértékei az egyes kortikális rétegek kompartmentjeiben. Az oszlop a LIV-ben található barrel és vertikálisan alá, vagy fölé eső supra- és infragranuláris kéregrészeket jelöli, míg a szeptum a LIV-ben található interbarrel szeptumok hasonló kiterjesztését a pia és a fehérállomány irányába.

	sejtdenzitás az oszlopban ± szórás (1/mm ³)	sejtdenzitás a szeptumban ± szórás (1/mm ³)
LI	512,67 ± 356,23	566,29 ± 558,33
LII/III	3353,63 ± 903,46	3318,67 ± 1159,57
LIV	2661,42 ± 697,03	4772,67 ± 1535,58
LVa	7594,97 ± 2459,81	6752,20 ± 2268,18
LVb	8064,99 ± 1587,00	8675,49 ± 2425,20
LVI	6344,08 ± 1985,93	6856,9 ± 2454,67

5. táblázat SST+ sejtek rétegek közötti megoszlásához tartozó szignifikancia szintek. A narancssárga kiemelés a szignifikánsnak bizonyuló szignifikanciaszinteket jelöli. A fehér háttérű négyzetek a nem szignifikáns szintek.

	LI	LII/III	LIV	LVa	LVb	LVI
LI		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
LII/III			0,361	0,0001	0,0001	0,0001
LIV				0,0001	0,0001	0,0001
Lva					0,008	0,311
LVb						0,0001
LVI						

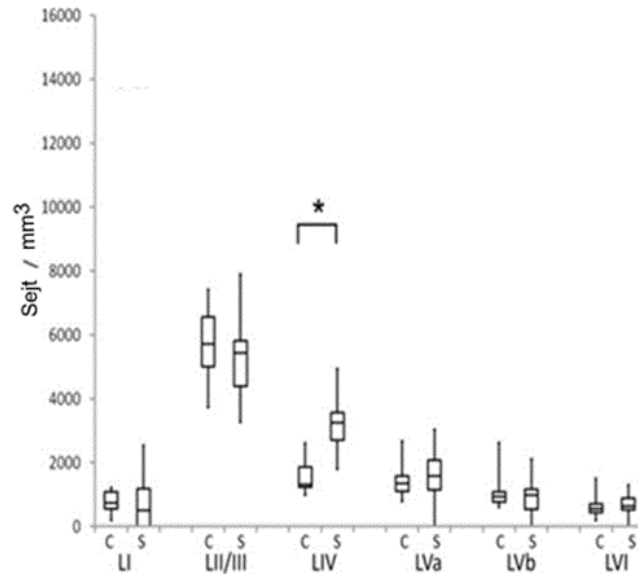
4.2.3. VIP – expresszázó GABAerg neuronok

A VIP+ sejtek az SST+ sejtekhez viszonyítva a rétegek között szinte komplementer eloszlást mutatnak. A neuronok 70,24 %-a helyezkedett el az LII/LIII, míg 29,76 %-a helyezkedett el a többi rétegben (18. ábra; 6. táblázat). A rétegek közül az LII/III-ban szignifikánsan több sejtet találtunk, mint a többi rétegben. LIV-től LVI-ig csökkenő sejtdenzitásokat mértünk, s az egyes rétegek között a különbségek jelentősnek bizonyultak (7. táblázat). Az LI-ben minden réteghez képest kevesebb VIP+ neuron található, kivéve LVI, amellyel összevetve a különbség nem szignifikáns.

Ha a kolumnáris és szeptális részterületeket hasonlítjuk össze, akkor a szupra- és az infragranuláris rétegekben nem találtunk érdemi különbséget a neuroneloszlás tekintetében. LIV-ben azonban a szeptumban közel kétszer több sejtet találni, mint a barrelben ($p < 0,0001$; 21. ábra; 19. E, F ábra; 22. I. L ábra).

6. táblázat VIP+ sejtek denzitásértékei az egyes kortikális rétegek kompartmentjeiben. Az oszlop a LIV-ben található barrel és vertikálisan alá, vagy fölé eső szupra- és infragranuláris kéregrészeket jelöli, míg a szeptum a LIV-ben található interbarrel szeptumok hasonló kiterjesztését a pia és a fehérállomány irányába.

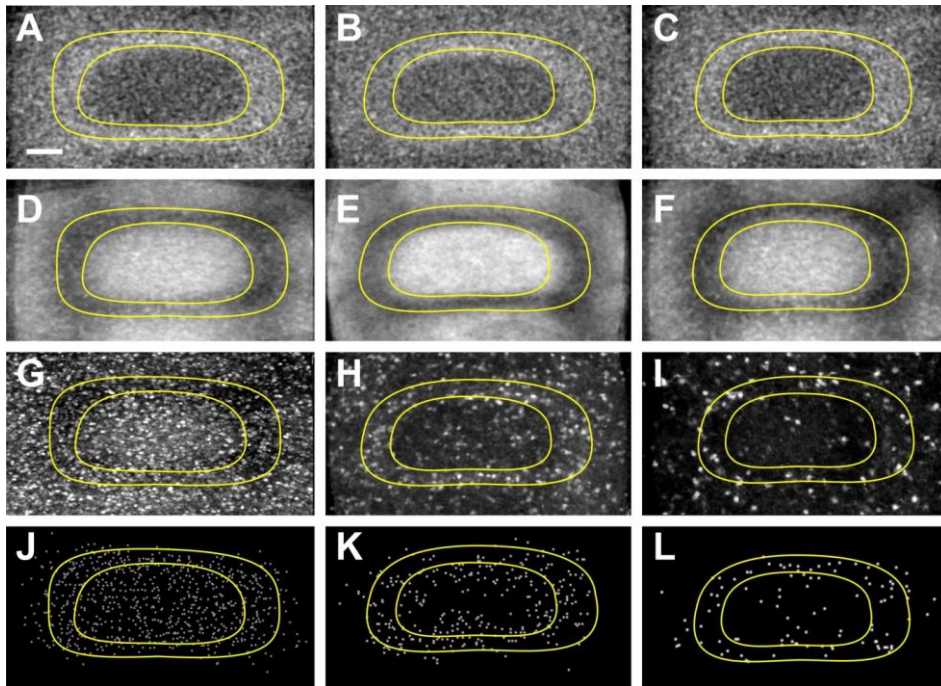
	Sejtdenzitás oszlopban ± szórás (1/mm ³)	Sejtdenzitás szeptumban ± szórás (1/mm ³)
LI	788,87 ± 335,88	571,67 ± 536,68
LII/III	5596,69 ± 968,70	5150,93 ± 1090,85
LIV	1574,74 ± 481,32	3204,72 ± 908,99
LVa	1448,33 ± 492,38	1594,11 ± 709,10
LVb	1007,70 ± 454,04	852,38 ± 596,40
LVI	630,11 ± 285,53	672,18 ± 313,03



21. ábra VIP sejtek eloszlása rétegenként a barrel asszociált oszlop (column, C) és szeptum (S) között ($n=6$). A lamináris eloszlások közötti szignifikáns különbségeket nem jelöltük, az LIV rétegen belüli szignifikáns különbséget csillaggal jelöltük ($p < 0,0001$). Saját ábra.

7. táblázat VIP+ sejtek rétegek közötti megoszlásához tartozó szignifikancia szintek. A narancssárga kiemelés a szignifikánsnak bizonyuló szignifikanciaszinteket jelöli. A fehér háttérű négyzetek a nem szignifikáns szintek.

	LI	LII/III	LIV	LVa	LVb	LVI
LI		0,0001	0,0001	0,0001	0,106	0,569
LII/III			0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
LIV				0,0001	0,0001	0,0001
LVa					0,0001	0,0001
LVb						0,001
LVI						



22. ábra Interneuronok eloszlása a IV. réteg magasságában leképezett tangenciális metszeteken. PV+ (A, D, G, J), SST+ (B, E, H, K) és VIP+ (C, F, I, L) interneuron sejtestestjeinek ábrázolása. DAPI festés (A–C) vagy a vGluT2 immunfestés (D–F) alapján határoztuk meg a határokat. A mikroszkópos képek PV+ (G), SST+ (H) és VIP+ (I) sejtesteloszlása és neuropil határai összhangban vannak a sejtesteket jelölő Neurolucida rekonstrukciókkal (J–L). A PV+ sejtek homogén eloszlást mutatnak, míg az SST+ és a VIP+ sejtek szeptális eloszlást preferálnak. Mivel az SST és VIP neuronok denzitásai alacsonyabbak és kifejezetten kisebb denzitások láthatóak a granuláris rétegben, ezért számos barrelt vetítettünk egymásra a sejtek egyenetlen eloszlásának vizualizálása céljából. A sárga vonalak a szeptumok belső és küldő határait jelölik. Méretvonal: 50 μm . Saját ábra.

5. Megbeszélés

Shaw-versenyegerén a whole mount készítmények mintavételezése megfelelt a szakirodalomban leírtaknak, s az abból készített izodenzitás térképek is hasonlóan készültek (Mass és mtsai 1992; Garza-Gisholt és mtsai 2014). Azaz a retinák sejtdenzitásának átlagából készült egy „átlagot” felvázoló térkép. Ennek az előnye, hogy ez a térkép a korábbi irodalmi adatokkal jól összevethető. Hátránya, hogy a bevágás esetlegessége miatt még a tapasztalt megfigyelőnek is okozhat nehézséget az egyes retinák pontos összehasonlítása. A ZDF patkányok retinái esetén a bevágások a 3.1.4. fejezetben bemutatott transzformációnak köszönhetően eltűntek, így a különbségek szemmel is jobban láthatóak, illetve a méretbeli eltérések is jól kirajzolódtak (15. ábra). Ez az ábrázolásmód a munkacsoportunk által a világon első ízben használt megjelenítési módszer.

Mind a diabéteszes, mind a kontroll retinákról készült ábrákon a középponthez közel is láthatók kisebb denzitású részek (14. és 15. ábra). Ennek oka, hogy a nervus opticusnál olyan 20-50 μ m-es sávok helyezkedtek el, ahol egyáltalán nem voltak sejtek, míg utána igen kis területen tömörültek össze. Ha a mintavevő négyzet erre a sávra, vagy ennek a sávnak egy részét érintve helyezkedett el, akkor az ebből a négyzetből vonatkoztatott denzitás kisebbnek bizonyult. Ezt a jelenséget mind a kontroll, mind a ZDF homozigóta egyedeknél megfigyeltük. A jelenség okát a whole mountok vizsgálata megmagyarázza. Whole mountokon ugyanis jól látszik, hogy a ganglionsejtek axonjai széles kötegekké szedődnek össze a nervus opticus kilépésénél, illetve a nagy erek is radiális lefutást mutatnak. A ganglionsejtek ezáltal mintegy beszorulnak a kötegek közé.

Továbbá megállapítható, hogy két különböző faj esetén a diabétesz hatására tendenciózusan hasonló eredményeket észleltünk, a középső területeken nagyobb, míg a periférián kisebb a ganglionsejtek denzitása. Ennek oka lehet, hogy munkánk során érvényesült az a fontos sztereológiai alapelv, mely szerint a megfigyelés eredményének összevetése csak azonos módon feldolgozott mintákon lehetséges. Tekintettel arra, hogy munkánk során bár méretében kicsi, de nagy számú mintavevő négyzetet használtunk, a mintavételezéssel sikerült elkerülni a véletlenszerűen az üres területekre eső mintavevő négyzetek okozta hibát, ami kisebb számú mintavétel esetén erősen torzította volna az eredményeket. Így általunk is bebizonyosodott, hogy nem csak egy fajon belüli egyedek

között, hanem különböző fajok esetén is összevethető eredményeket kapunk, ha a sztereológiai elveket használjuk.

A ganglionsejt denzitás mellett a retina vastagságának meghatározásánál is használtuk ezeket az elveket. A vastagság meghatározását radiális metszésű mintákon végeztük. Mivel a teljes retina metszésekor több száz metszetet kapnánk, ezek szövettani feldolgozása, digitalizálása túlzottan nagy idő- és munkaerőfordítást igényelne. Így ennél a kérdésnél, hogy „a szövet vastagsága változik-e cukorbetegségben?”, nem reális, hogy egy egész szervet digitalizáljunk. Ebben az esetben már a metszésnél mintavételezést végeztünk. A retina középpontjától meghatározott távolságban jelöltünk ki metszési pontokat, mely így egy objektív, vizsgálotól független mintavételi hely volt és minden retina régiót reprezentált. A vizsgálotól független azt jelenti, hogy nem szubjektív szempontok alapján választottuk a helyet (mint például vastagabbnak tűnik vagy vékonyabbnak), hanem a metszetek előzetes megtekintése nélkül jelöltünk ki koordinátákat.

A szövettani feldolgozás során immunfluoreszcens festékeket használtunk, amelyek idővel kifakulnak, így nem használhatóak a metszetek. A whole mountok esetén a teljes retina befényképezését választottuk a fényképezés alatti mintavételi módszerrel szemben. Ezt követően a felvételeken, a sejtszámlálásnál alkalmaztunk szisztematikus, random mintavételezést.

A retina esetén a csapok és pálcikák, de még az idegsejtek is annyira nagy számban vannak jelen, hogy egy retina ember általi megszámlálása is beláthatatlanul hosszú idő lenne. Automatikus sejtszámláló programokat pedig a sejtek gyakori átfedései miatt nem tudtunk alkalmazni. Így a metszeteken belül ZDF patkányok esetén a módszertannál ismertetett random, illetve Shaw-versenyénél szisztematikus random mintavételezést alkalmaztunk. Különbség volt továbbá a használt szoftver tekintetében is. Míg a versenyegénél a módszertannál említett neuronrekonstrukciós szoftvert, a NeuroLucidat, addig a ZDF patkányoknál FIJI programot használtuk. Tapasztalatunk, hogy időben és kezelhetőségben nem volt különbség, mindkét program alkalmasnak bizonyult a feladatra. A FIJI előnye, hogy nem voltunk adott számítógéphez kötve, mint a NeuroLucida esetén, hiszen sokkal kisebb kapacitású számítógép is elegendő a szoftver futtatásához.

Amennyiben a retinánál megvalósult sztereológiai elvek szempontjából vizsgáljuk a szomatoszenzoros kérget, akkor a már vázolt elvek itt is megvalósultak. Itt ugyan egy fajon végeztünk megfigyeléseket, azonban különböző metszési síkokat használtunk. A tangenciális és a frontális metszetek készítésekor ugyanazt a mikrotómot használtuk, azonos fixálási és festési metódust alkalmaztunk, melynek eredményeként a két különböző metszés szövettani mintái között ezáltal nem tapasztaltunk különbséget. A feldolgozásból adódó módosulás (pl. zsugorodás) mind a két metszést érintette. A feldolgozás során a két agyfélteke között különbség volt, hogy a tangenciális metszetekhez használt agyakat lapítottuk. A lapítás során különböző nyomások hatottak az agyakra, illetve az egyes állatok kissé eltérő méretű aggyal rendelkeztek, így a lapítás nem lett teljesen egységes. Ennek eredménye, hogy a metszés során 15-19 szelet között változott a metszetszám. A retinán végzett munkáink következtetéseit a szomatoszenzoros rendszernél is felhasználtuk. A retinaminták összehasonlíthatóságát nagyban megkönnyítette, hogy azonos koordináta-rendszerbe transzformáltuk őket. A szomatoszenzoros rendszernél a koronális és a tangenciális metszetek esetén is egy közös koordináta-rendszerbe transzformáltuk az adatokat. A bemutatott virtuális újrametszés ugyanis felfogható egy x-y koordináta-rendszerként, ahol az 1000 µm vastagság az y tengely, míg a sejtszám nem egy igazi tengelyen, hanem az újraosztott egységekben került megadásra.

Elmondható, hogy a két agyfélteke mintavételezése között is volt különbség. A szomatoszenzoros kéreg frontális metszetein ugyanis nem az egész célterület összes metszetén, hanem csak kiválasztott metszeteken történt analízis. Míg a retinák vastagságmérésénél fix koordinátákat kijelölve végeztünk metszést, addig a szomatoszenzoros kéreg frontális metszeteit úgy választottuk ki, hogy a teljes szomatoszenzoros kérget lemetszettük, s metszés közben csoportokba gyűjtöttük azokat, majd egy-egy csoport metszeteit analizáltuk tovább a módszertannál ismertetett módon. Ezzel szemben a tangenciális metszeteken egyáltalán nem kellett mintavételezést végezni, hiszen a *pia matertől* a fehérállományig a teljes VIP/SST/PV állomány meghatározásra került a barrelmezőn belül.

A retinával ellentétben a *szomatoszenzoros* kéregben a különböző módon metszett szövettani minták eredményei kerültek összevetésre. A két metszéstípus (koronális és tangenciális), vagyis a két oldal eredményei egymással azonosnak bizonyultak. A

szakirodalmat áttekintve a miénk az első olyan munka, ahol a tangenciális és koronális metszeteken egy időben végeztek megfigyeléseket. Mivel a különböző metszés ellenére az eredmények jól korreláltak, ezért a végső analízis során egy mintának tekinthettük a két metszési módszerrel készített preparátumok denzitásértékeit. A frontális metszés előnye, hogy a lapszerinti rétegződés jól látható, ugyanakkor a barrelmező szomatotópiája nem látszik, hiszen egy metszetbe az összes barrel nem eshet bele, így nem rajzolják ki a tangenciális metszeteken egyértelműen látható, a bajusszőröknek megfelelő mintázatot. A tangenciális metszés során ezzel szemben az LIV-ben a teljes barrelmező kirajzolódik, ugyanakkor a lamináris rétegződés nem látható, hiszen az adott 50 mikrométeres metszetbe feltételezhetően az egész barrelmezőnek ugyanaz a rétege esik. Mivel a kérget az előkészítés során lapítani kell, aminek során a lateral felé egyre vastagodó agyállomány egyforma vastagságúra lapul, így a sejtek pia matertől mért távolságát a fentebb leírtak szerint kellett korrigálni a tangenciális metszetek esetén. A munka további újdonsága, hogy lehetővé teszi a tangenciális metszeteken a vGlut2 festett talamokortikális rostok által kirajzolt barrel és a DAPI festés szerinti sejtdenzitás alapján a barrel határának jó közelítéssel való meghatározását. Ezáltal a tangenciális és a frontális metszések eredményei egymással nem csak összevethetőek, hanem a két módszer egymás kontrolljává válik.

Mivel a fluoreszcens sejtjelölés nem 100 % biztonságú, így fontos megemlíteni, hogy a sejtszámolások a tdTomato-expresszázó sejtek sejttestjeinek számításán alapulnak, és specifikus festés (PV, SST, VIP ellenanyaggal) jelen vizsgálatunkban nem történt. A jelölés azért nem tekinthető 100%-nak, mivel az adott állatban nem minden olyan sejtben kapcsol be a fluoreszcensz fehérje génje, ahol PV termelődik. Ugyanakkor korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a fluoreszcenciát mutató sejtek és az utólagos immunhisztokémiai festés által jelölt sejtek jelentős átfedést mutatnak (Taniguchi és mtsai 2011; Pfeiffer és mtsai 2013). Ezen vizsgálatok során mind a specificitás, mind a szenzitivitás igen magasnak bizonyult (Taniguchi és mtsai 2011; Pfeiffer és mtsai 2013; Prönneke és mtsai 2015).

Az irodalmi adatokat áttekintve a publikálás idejében nem találtunk olyan munkát, mely az egér szomatoszenzoros barrelkortexének GABAerg neuronjainak számát, illetve annak szeptális és oszlopokbeli megoszlását ismertetné. Bár GABAerg neuronok denzitását

immunhisztokémiai tanulmányokban leírták, de a szeptum és barrel viszonylatát nem tárgyalták (Xu és mtsai 2010).

A PV+ GABAerg sejtek esetén a szomatoszenzoros kéreg II.-V. rétegben találtuk a legtöbb sejttestet, a szeptum és a barrel között nem volt különbség. Ez azért érdekes, hisz a PV elleni festést, illetve a PV+ jelölést használják a barrel identifikálására. Ez úgy lehetséges, hogy a barrelt valójában a PV+ sejtek axonjai és a talamokortikális rostok axonjai rajzolják ki, amelyek olyan sűrűn fonják át ezt a területet, hogy jóval intenzívebb jelet adnak, mint a sejttestek (Shigematsu és mtsai 2019; Shine 2021). Ez a sűrű axonfelhő a barrelben a sejtek szómájától nehezen megkülönböztethető a számítógépes elemzés során. A belépő talamikus rostok a serkentő sejtek mellett a barrel belsejében nagy számban található PV+ sejteket célozzák meg, miáltal az úgynevezett feed-forward és feed-back gátlást is lehetővé tesznek (Staiger mtsai 2009). A VPM-ből érkező rostok az LIV-ben a legnagyobb denzitásúak (Lu és Lin 1993). Emellett az LII/III és LV-ben is nagyobb számban fellelhetőek, ugyanakkor kis mennyiségben az összes réteget innerválják (Cruikshank és mtsai 2007; Wimmer és mtsai 2010). A POm ingerlése során is a barrelmezőben a PV+ sejtekben váltódott ki válasz (Mease és mtsai 2016). Eredményeink alapján a lemniszkális VPM által beidegzett barrelek és a paralemniszkális POm rostok által beidegzett interbarrel szeptumok esetén nem mutatható ki oszloppreferencia a PV+ sejtek esetében, vagyis hasonló sűrűségű sejtpopuláció fogadja a felszálló rostokat. Ez nem csak a negyedik rétegre igaz, hanem az LII/III és LVa rétegek és azok barrel asszociált oszlopa és szeptuma PV+ sejteloszlására is (17. ábra).

A SST+ sejtek esetén az infragranuláris rétegekben találtunk nagyobb sejtszámot (20. ábra). Elsőként írtuk le, hogy a IV. rétegben a szeptumban nagyobb a sejt denzitás, mint a barrelben és ezek az SST+ sejtek a barreleket elkerülik (20. ábra). A receptív terület a szeptális neuronok esetében nagyobb méretű, mint a barrelben lévő társaik esetén (Brecht és Sakmann 2002). Ez az anatómiai helyzet ideális jelöltté tehetné az SST+ sejteket a barrel asszociált oszlopok magasabb rétegeibe feljutó információ szomszéd oszlopoktól való elektrofiziológiai mérésekből ismert izolálására (Katz és mtsai 2006). SST+ neuronok, szemben a VIP+ idegsejtekkel, hatékonyan gátolják a piramissejtek működését (Neske és Connors 2016). Ébrenlétben a SST+ sejtek általános gátló hatása a piramissejtek disztális dendritszakaszaira a bajuszszőrökkel végzett letapogató mozgás idejére megszűnik, ami lehetővé teszi az aktív tapintási ingerek barrel asszociált

oszlopban történő feldolgozását (Gentet és mtsai 2012). Azonban a VPM projekciós neuronjai által a GABAerg gátló SST+ sejtekhez küldött rostok száma lényegesen kisebb, mint a PV+ sejtekhez küldött (Cruikshank és mtsai 2007), tehát a talamikus hatás kisebb jelentőségűnek tűnik.

A VIP+ sejtek esetén új felismerés, hogy az LIV-ben a sejttetek eloszlása nem homogén. A szeptumban több sejt található, mint a barrelben. Irodalmi adatok szerint a felszínhez közelebbi rétegekben található VIP+ neuronok dendritjei leginkább az LI-LIII-ban fekszenek, míg az axonjaik minden sejtrétegben megtalálhatóak az adott kortikális oszlopon belül (Prönneke és mtsai 2015). Ugyanakkor az LIV-VI területén lévő sejtek dendritjei a barrel asszociált oszlop összes rétegét eléri, de az axonok infragranulárisan maradnak (Kuchibhotla és mtsai 2017; Lee és mtsai 2013; Pi és mtsai 2013, Prönneke és mtsai 2015). A barrel központi részén a perifériához képest kevesebb VIP+ bouton található (Zilles és mtsai 1993), a II/III és IV. réteg VIP+ neuronjainak axonjai radiális lefutásúak (Prönneke és mtsai 2015; Xu és mtsai 2010). Ezen kutatásokkal megegyeznek eredményeink, miszerint az LIV-ben a barrel területén kevesebb sejtet találtunk, mint a szeptális részen (*21. ábra*). Helyzetük alapján elsősorban közvetlenül, vagy közvetve paralemniszkális bemenetet kaphatnak. A VIP+ sejtek főleg más interneuronokat, elsősorban SST+ interneuronokat céloznak meg (Caputi és mtsai 2009; Pfeffer és mtsai 2013; Karnani és mtsai 2016). Ez lehetővé teszi az SST+ sejtek által gátolt piramis sejtek diszinhibícióját, például az aktív tapintás idejére (Gentet és mtsai 2012). A VIP+ sejtek szeptális lokalizációja utalhat a barrel asszociált oszlopok közti információfeldolgozás integrálására is, bár ennek eldöntése további vizsgálatokat igényel. Ha az SST+ sejtek fő, barrelmezőn belüli targetjei a piramis sejtek, s az SST+ sejtekre a PV+ és VIP+ sejtek is hatnak (Walker és mtsai 2016), akkor adódik a kérdés, hogy vajon milyen eltérést eredményezhet a PV - SST - piramis sejt, illetve a VIP -SST - piramis sejt útvonal során létrejövő piramis sejt diszinhibíció. A PV+ sejtek több rétegről feltételezik, hogy a POM felől érkező feed-forward köröket szabályozzák (Staiger és Petersen 2021) azáltal, hogy mind aktiváló, mind pedig gátló sejteken végződnek (Sermet és mtsai 2019; Staiger és Petersen 2021). A VIP+ sejtek felelősek a whisking során létrejövő LVa SST+ sejtek gátlásáért. Így azon sejtek, mint például a piramis sejt is, melyeket a Martinotti típusú SST+ sejtek gátolnak, felszabadulnak a gátlás alól whisking során (Munoz és mtsai 2017; Staiger és Petersen 2021).

A VIP+ sejtekről kimutatták, hogy a piramissejteket direkt módon gátolják és indirekt módon, diszinhibíció révén, aktiválják (Garcia-Junco-Clemente és mtsai 2017), ezáltal egy nagyon finoman szabályozható módon képesek a piramissejtek aktivitási szintjét beállítani. Ezen VIP+ sejtek másik feltételezett funkciója, hogy hathatnak a kortikális területek vérátáramlására (Cauli és mtsai 2004). A VIP+ sejtek metabolikus hatása révén vazodilatáció, míg az SST+ sejtek ingerlésével vazokonstriktió váltható ki (Cauli és mtsai 2004). Mi az erek mentén való elhelyezkedésüket nem vizsgáltuk, ugyanakkor a rétegpreferenciák és a barrel assziciált oszlop vs. szeptum preferencia a kérgi aktiváció során megnőtt oxigénigény, és ezáltal a szükséges vérátáramlás-fokozódással összefügghet (Harrison és mtsai 2002; Iadecola 2002).

A hasonló méretű barreleket egymásra vetítve a 22. ábrán is látható, hogy az LIV-ben milyen a PV, SST, VIP sejtek szómájának helyzete. Képfeldolgozás tekintetében ez az ábra is egyfajta újdonságnak tekinthető, hiszen a kiindulási képek továbbalakításával egy jobban átlátható képet kaptunk, mely a számszerű eredményeket is jobban tükrözi. Az eredeti immunfluoreszcens képeken az alacsony sejtszám miatt a sejtek eloszlása többé-kevésbé véletlenszerűnek látszik (19. ábra A-F), azonban az egyes sejtípusok LIV kompartmentpreferenciáját, tehát egyenlőtlen eloszlását a szeptumokban és a barrelekben a szeptumok javára a kvantitatív analízis egyértelműen kimutatta (20-21. ábra). A barrelek képeinek egymásra vetített ábrázolásmódja (22. ábra A-F) egyértelműen megmutatja VIP és SST sejtek ritkább előfordulását a barrelekben, a szeptumokkal szemben (22. ábra G-L). Ha a barrelek mérete azonos lenne, akkor ez az egymásra vetítésen alapuló ábrázolásmód egy rekonstrukció nélküli analízis kiindulópontja lehetne. Barrel esetén ez sajnos nem így van, de olyan esetekben, ahol azonos méretűek a struktúrák, ott a képfeldolgozás és rekonstrukció új módjának a kiindulópontja lehet a jövőben. A szomszéd barrelek körvonalai a méret és iránykülönbségek miatt sosem esnek egymásra, ezért nem látunk a kép középpontjában ábrázolt barrel körül hasonló mintázatot, mert ott a szomszéd barrelek és szeptumok egymással is átfednek. Hasonló barreleket egymásravitítő ábrázolásmód létezik, azonban csak arra találtunk példát, hogy a kész rekonstrukciót vetítik egymásra. Shigematsu (2019) kutatócsoportja a PV+ sejtek kapcsolataik alapján történő beosztását vizsgálták, mely során a barrelben vagy a szeptumban történő lokalizáció is szempont volt. Ábrájukat úgy hozták létre, hogy három 40 µm vastag metszetet digitalizáltak. A barreleket bejelölték, illetve a PV+ sejtek

rekonstrukcióját is elvégezték. A barrelkörvonalakat és a PV+ sejt rekonstrukciókat pedig egy rétegbe vetítették. A mi képünk ezzel szemben úgy készült, hogy mikroszkópos képeket vetítettük egymásra. Az így létrejött kép ezáltal nem egy rekonstrukció és így a rekonstruáló általi torzításoktól mentes.

A talamokortikális terminálisok célpontjai majdnem mindig tüskés dendritek, amik piramis sejtek, vagy tüskés csillagsejtek, tehát serkentő sejtek nyúlványai, azonban a szomatoszenzoros kéregben a boutonok mintegy 9%-a végződik tüske nélküli (Bopp és mtsai 2017), vélhetően interneuronokhoz tartozó proximális dendriteken. Optogenetikai vizsgálatok szerint a VPM és POM ingerlése során a serkentő sejtekben és az LIV valamint LVa PV+ sejtjeiben nagy excitátoros posztzinaptikus potenciál váltódik ki, viszont az SST+ sejtekben szinte egyáltalán nem. Ugyanakkor a VIP+ sejtekben közepes aktivitás váltható ki (Sermet és mtsai 2019). Ez összecseng azzal az eredményünkkel, hogy a PV+ sejtek nem mutatnak szeptális vs. barrel asszociált oszlop preferenciát, és a VPM és POM felől is rendelkezhetnek bemenettel. Az SST+ és VIP+ sejtek a primer szomatoszenzoros kéreg negyedik rétegében megfigyelhető inhomogén eloszlása olyan funkcionális különbségekre utal, amik felderítésére további kísérletek szükségesek.

6. Következtetések

Munkám során rámutattam arra, hogy a mintavételi zsugorodás okozta deformitásokból adódó hibák korrekciójára nincsen egy univerzális, minden mintatípusnál használható módszer. Fontos megjegyezni, hogy a korrekciónak helyzetspecifikusnak kell lennie. A retinák esetén a zsugorodás és a feldolgozás során létrejött hézagok okozták a problémát és azt kellett eltávolítani. A szomatoszenzoros kéreg esetében a tangenciális metszetek lapítása és metszése során kialakult torzítást kellett kiküszöbölni. Ebből adódóan két különböző megoldást vázoltunk: (1) a retina esetén a képek transzformációja, míg (2) a barrelmező esetén pedig a metszetek virtuális újrametszése küszöbölte ki a problémát.

A mintavételi szám meghatározása és ezáltal a tényleges elemszám becslése is esetfüggő. A metszetek között történő mintavételezéssel időt takaríthatunk meg, illetve költségkímélőbb megoldás is, mivel a metszést követően még a festési eljárás, illetve a fotódokumentáció hosszadalmas folyamatok lehetnek. Hátránya, hogy a nem megfelelően megválasztott metszetszám torzíthatja az eredményeket. A fotódokumentálást követően történő mintavételezés előnye, hogy a készült felvételeken utólag is lehet sűríteni a mintavételi helyeket, ha az első mintavételezés elégtelennek bizonyult volna.

Az adott módszer univerzitásának kérdése, miszerint „használható vajon különböző területeken azonos módszer?” elmondható, hogy a helyzetnek megfelelően valamennyire alakítani kellett, de alapjait tekintve azonosak voltak.

Az ideális metszetszám kérdését vizsgálva kijelenthető, hogy a mintául vett terület a retinák és a szomatoszenzoros kéreg esetén nagyságrendileg azonos volt, az összterületnek 10%-a, vagyis a szomatoszenzoros kéreg esetén a frontális metszetek során analizált metszetszám az összes metszet legfeljebb 1/10-e. Ennek a területnek az elemzése azonos eredményt adott, mint a tangenciális metszeteken végzett teljes terület analízise, amely során a teljes poszteromediális barrelmezőt feldolgoztuk. Irodalmi adatok szerint a retinánál is a területek nagyjából 10%-át vizsgálták (Harman és mtsai 2000), legtöbbször sztereológiai, statisztikai megfontolásokat vagy előzetes hatékonysági tanulmányokat mellőzve. Eredményeink alapján a teljes térfogat 10%-ának használata a mintavételezéshez nem rontja a teljes elemszám becslésének hatékonyságát. A fenti módszerek tesztelésével sikerült kiválasztanunk a további céljainknak legmegfelelőbb

eljárást a szomatoszenzoros rendszer vizsgálatához. Egy olyan terület sejteloszlásának elemzéséhez, ahol nagyon finom különbségeket mutattunk ki egymáshoz közel eső, és egymástól csak különleges figyelemmel elválasztható területeken. A két, általunk használt metszési sík közül a frontális síkban készült metszetek mintavételezésénél használtuk fel a retinán végzett vizsgálatok következtetéseit, amikor minden tizedik metszetet festettük csak meg. A tangenciális metszeteknél minden metszetet analizáltunk. A tangenciális metszetekben a réteghatárok detektálhatatlansága miatt a sejtek rétegbeli hovatartozását csak a felszíntől való távolság alapján határozhattuk meg. Az eredményeket a frontális metszetek eredményeivel validáltuk. Az egyes sejtípusok eloszlásáról elmondható, hogy nem homogén, a legmarkánsabb különbségek a VIP+ és SST+ sejtek esetén találtuk a barrel és a szeptum viszonylatában (19.- 22. ábra). Irodalmi adatok szerint a IV, Va és Vb rétegek a lemniszkális és paralemniszkális bemenet helyei (Wimmer és mtsai 2010). Így az itt csoportosuló sejtek az itt beáramló információt fogadhatják és dolgozhatják fel.

Az SST+ és VIP+ sejtek esetén a szeptumban találtunk több sejtet a LIV rétegben. A VIP+ sejtek egyrészt a SST+ sejtek gátlása, másrészt a vérátáramlás növelése révén képes a kortikális aktivitást növelni (Cauli és mtsai 2004). Ez a hatás a sejtek axonfelhőjének radiális lefutása miatt az egymással szomszédos és eltérő bemenetet kapó oszlopok és szeptumok differenciált aktiválását teszi lehetővé, aminek hatására a lemniszkális és paralemniszkális információ a felsőbb rétegekben is egymástól elkülönülve kerülhet feldolgozásra (Brecht és mtsai 2003).

A retinán és a szomatoszenzoros rendszeren végzett kutatások alapproblémája hasonló volt, azaz meg kellett találni azt a módszert, mellyel a feldolgozás során deformálódott struktúrák a legkisebb torzítással összevethetővé válnak. A retina esetén a szakadások, a barrelmezőnél a különböző metszés során az eltérő irányú lapítás hatását kellett kiküszöbölni. Kiemelendő, hogy a retinánál alkalmazott projiciálás, azaz a transzformált izodenzitás térképek egymásra vetítése, kiindulási pontul szolgált a barrelmezőben bemutatott vetítéssel létrehozott ábrának a megalkotásában (22. ábra), mely később további elemzések alapját képezheti.

Munkám során bemutattam a mintavételezés fontosságát neurobiológiai kutatásokban, külön felhívva a figyelmet a hagyományostól eltérő esetek sajátosságainak figyelembevételére, amikor új mintavételi vagy analitikai eljárás kidolgozása vezetett

célra. Reményeim szerint ezzel inspirálom a jövő kutatás irányába elköteleződő hallgatóit új utak keresésére olyan helyzetekben is, amikor a meglévő eszközök limitációjából adódó kihívásokat kell legyőzni.

7. Összefoglalás

Tanulmányom során háromféle állatmodellben (génmódosított egerek, Shaw-versenyegere, ZDF-patkányok) végeztem vizsgálatokat, mely során a mintavételezés, a mintákról készült fotódokumentáció és a nyers adatok sztereológiai elvek szerinti további átalakítását vizsgáltam.

A ZDF patkányok és Shaw-versenyegere esetén cukorbeteg és kontroll állatok whole mount technikával feldolgozott és radiális metszésű retináin végeztünk megfigyeléseket. A Shaw-versenyegere esetén az irodalomban elterjedt izodenzitás térképeket hoztunk létre a sejtváltozások ábrázolására, ugyanakkor a ZDF patkányoknál egy új ábrázolási módot alkalmaztunk, mely a feldolgozás során létrejött műtermékeket (szakadások) nem tartalmazta és a denzitásértékek mellett az átlagos retinaméreteket és a méretbeli szórásokat is megjelenítette. Ezen állatok elemzése során bemutattuk a fotódokumentálást követő mintavételezést, illetve, hogy a képi megjelenítés az esztétikai szerepe mellett, a korábbi gyakorlattal ellentétben több információt jeleníthet meg, mivel az izodenzitás térképeken a méretbeli különbségek nem láthatóak.

A deformálódások utólagos korrekciójának lehetőségét vizsgáltuk továbbá az egér szomatoszenzoros kérgében is. Először végeztünk egyszerre megfigyeléseket az irodalomban elterjedt kétféle metszési mód eredményeire vonatkozóan. Utólagos rekonstrukció és a retinák feldolgozásából származó tapasztalatokon alapuló korrekció segítségével a kétféle metszés összehasonlíthatóvá vált. Ezáltal megállíthatjuk, hogy a PV+, SST+ és VIP+ sejtek eltérő eloszlásmintázattal rendelkeznek. A PV+ sejtek a VPM és P_{Om} talamikus bemenetnek megfelelően lokalizálódnak és nem mutatnak eloszlásbeli eltérést a barrel asszociált oszlopok és a szeptumok között, ami ellentétben áll a szubjektív benyomásokkal. Elsőként írtuk le, hogy az SST+ sejtek és a VIP+ sejtek a IV. rétegben szignifikánsan nagyobb számban helyezkednek el a szeptumban, azaz a VPM bemenetét elkerülik. Irodalmi adatokkal egyezik azon megfigyelésünk, hogy a pia mater felől a fehérállományig a VIP+ sejtek denzitása és az SST+ sejtek denzitása ellentétes.

A retinákon és a szomatoszenzoros rendszeren végzett megfigyelések a bemutatott képfeldolgozási módszerek és a sztereológiai elvek mentén történő átalakítása révén jöhettek létre és mindkét esetben helyzetspecifikus ábrázolásmódot hoztunk létre.

8. Summary

In the course of my study I made observations at three types of animals, genetically modified mice, Meriones shawi and zucker diabetic fatty rat (ZDF), optimizing possible modifications of the different sampling and stereological approaches.

I compared whole mount and radially sectioned retinas of Meriones shawi and ZDF-rats among healthy versus diabetic individuals. Compared to the regular ones, our novel modified isodensity maps eliminated the rupture artefacts effectively. The average and maximal retinal sizes are both indicated on the modified maps, thus the standard deviation of such dimensions can also be displayed.

The second part of my thesis features virtual reslicing of the microscopic slices as an other type of subsequent data modification technique, based on our previous experience. We performed this data processing at microscopic images of the posteromedial barrel field, and presented results from two different types of sectioning i.e. coronal and tangential at the same time, unprecedented in the literature. After virtual reslicing we were able to pool the data of the different sectioning. Merging the corrected image planes highlighted the spatial preference of the PV+, SST+ and VIP+ interneuron subtypes in the Layer IV barrel field only, is another novelty.

In the third part, we presented a set of stereological approaches, which lead to biological results in the examination of the somatosensory system. We found that PV+, SST+ and VIP+ cells differ at their distribution patterns. The PV+ cells do not prefer areas regarding the thalamic afferentation from VPM or POm. These cells distribute uniformly among septal vs. barrel associated areas, which contradicts the first visual impression. Novelty of our work is, that we described the non-homogenous spatial distribution of SST+ and VIP+ cells in Layer IV. These cells prefer the septum in the LIV, so they avoid the areas, where the fibers arrive from VPM. The different role of these cells can derive from the dissimilar laminar distribution. From pia mater to white matter we observed reverse distribution patterns of VIP+ and SST+ cells.

The observations on retinas and the somatosensory system were obtained by applying the image processing methods and transforming them along the stereological principles presented, and in both cases we have generated a site-specific representation.

9. Irodalomjegyzék

- Allen Institute for Brain Science (2011). Allen Reference Atlas – Mouse Brain [brain atlas].
Elérhető: atlas.brain-map.org
- Altunkaynak B Z. (2012) A Brief Introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology. *NeuroQuantology*, 10: 31-43
- Bansal R, Ahmad N, Kidwai JR. (1980) Alloxan-glucose interaction: effect on incorporation of ¹⁴C-leucine into pancreatic islets of rat. *Acta Diabetol Lat*, 17: 135-143.
- Barber AJ. (2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(2):283-90.
- Bayraktar T, Welker E, Freund TF, Zilles K, Staiger JF. (2000) Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J Comp Neurol*, 420: 291-304.
- Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJ. (2010) Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol*, 38(7):1011-25.
- Brecht M, Roth A, Sakmann B. (2003) Dynamic receptive fields of reconstructed pyramidal cells in layers 3 and 2 of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol*, 553(Pt 1):243-65.
- Brecht M, Sakmann B. (2002) Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. *J Physiol*, 543: 49-70.
- Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, Coffman TM., Fogo A, Harris RC, Heilig CW, Sharma K. (2005) Diabetic nephropathy: of mice and men. *Adv Chronic Kidney Dis*, 12: 128-145.
- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KA, Schuhknecht GF. (2017) An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *J Neurosci*, 37(9):2435-2448.
- Cai J, Boulton M. (2002) The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)*, 16: 242-60.

- Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. (2004) Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *Neurosci*, 24(41): 8940-9.
- Caputi A, Rozov A, Blatow M, Monyer H. (2009) Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cereb Cortex*, 19: 1345-1359.
- Castejon C, Barros-Zulaica N, Nuñez A. Control of Somatosensory Cortical Processing by Thalamic Posterior Medial Nucleus: A New Role of Thalamus in Cortical Function. *PLoS One*. 2016 Jan 28;11(1): e0148169.
- Celio MR. (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*, 231: 995-997.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802-805.
- Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY. (2007) Reactive changes of retinal astrocytes and Muller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J. Anat*, 210:54–65.
- Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW. (2007) Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci*, 10; 462-468.
- Da Silva Xavier G, Hodson DJ. (2018). Mouse models of peripheral metabolic disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 32: 299-315.
- David 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. *Eur J Neurosci*, 25: 2329-2340.
- DeBuc, Tatrai ED, Laurik L, Varga BE, Olvedy V, Somogyi A, Smiddy WE, Somfai GM. (2013) Identifying Local Structural and Optical Derangement in the Neural Retina of Individuals with Type 1 Diabetes. *J. Clin. Exp. Ophthalmol*, 4:289
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. (2001) Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc*, 204: 232-246.
- Douglas RJ, Martin KAC. (1991) A functional microcircuit for cat visual cortex. *Journal of Physiology*, 44: 735–769
- Edinger L. (1904) Vorlesungen Über den Bau der nervösen Zentralorgane des Menschen und der Tiere. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 31: 559.

- Enzsoly A, Szabo A, Kantor O, David C, Szalay P, Szabo K, Szel A, Nemeth J, Lukats A. (2014) Pathologic alterations of the outer retina in streptozotocin-induced diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55: 3686-3699.
- Énzsöly A, Szabó A, Szabó K, Szél Á, Németh J, Lukáts Á. (2015) Novel features of neurodegeneration in the inner retina of early diabetic rats. *Histol Histopathol*. 30 (8): 971-85.
- Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, Keeffe J, Kempen JH, Leasher J, Limburg H, Naidoo K, Pesudovs K, Silvester A, Stevens GA, Tahhan N, Wong TY, Taylor HR. (2017) Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 5(12):e1221-e1234.
- Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CC, Poulet JF, Staiger JF, Luhmann, HJ, Schwarz C. (2013) Barrel cortex function. *Prog Neurobiol*, 103: 3-27.
- Galindo-Romero C, Aviles-Trigueros M, Jimenez-Lopez M., Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolas F, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. (2011) Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res*, 92: 377-387.
- Garcia-Junco-Clemente P, Ikrar T, Tring E, Xu X, Ringach DL, Trachtenberg JT. (2017) An inhibitory pull-push circuit in frontal cortex. *Nat Neurosci*, 20: 389-392.
- Garza-Gisholt E, Hemmi JM, Hart NS, Collin SP. (2014) A comparison of spatial analysis methods for the construction of topographic maps of retinal cell density. *PLoS One*, 9(4): e93485.
- Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen CC. (2012) Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci*, 15: 607-612.
- Gibson JM, Welker WI. (1983) Quantitative studies of stimulus coding in first-order vibrissa afferents of rats. 2. Adaptation and coding of stimulus parameters. *Somatosens Res*, 1: 95-117.
- Glaser JR, Glaser EM. (2000) Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem Neuroanat*, 20: 115-126.

- Hajdú RI, Laurik LK, Szabó K, Dékány B, Almási Z, Énzsöly A, Szabó A, Radovits T, Mátyás C, Oláh A, Szél Á, Somfai GM, Dávid C, Lukáts Á. (2019) Detailed Evaluation of Possible Ganglion Cell Loss in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. *Sci Rep*, 9(1): 10463.
- Hammoum I, Benlarbi M, Dellaa A, Szabo K, Dekany B, Csaba D, Almasi Z, Hajdu RI, Azaiz R, Charfeddine R, Lukáts Á, Ben Chaouacha-Chekir R. (2017) Study of retinal neurodegeneration and maculopathy in diabetic *Meriones shawi*: A particular animal model with human-like macula. *J Comp Neurol*, 525: 2890-2914.
- Hammoum I, Mbarek S, Dellaa A, Dubus E, Baccouche B, Azaiz R, Charfeddine R, Picaud S, Ben Chaouacha-Chekir R. (2017) Study of retinal alterations in a high fat diet-induced type ii diabetes rodent: *Meriones shawi*. *Acta Histochem*, 119(1):1-9.
- Harman AM, Moore S. (1999) Number of neurons in the retinal ganglion cell layer of the quokka wallaby do not change throughout life. *Anat Rec*, 256(1):78-83.
- Harman AM, MacDonald A, Meyer P, Ahmat A. (2003) Numbers of neurons in the retinal ganglion cell layer of the rat do not change throughout life. *Gerontology*, 49: 350-355.
- Harman A, Abrahams B, Moore S, Hoskins R. (2000) Neuronal density in the human retinal ganglion cell layer from 16-77 years. *Anat Rec*, 260(2): 124-31.
- Harris KD, Mrsic-Flogel TD. (2013) Cortical connectivity and sensory coding. *Nature*, 503: 51-58.
- Harris KD, Shepherd GM. (2015) The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci*, 18: 170-181.
- Harrison RV, Harel N, Panesar J, Mount RJ (2002) Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 12: 225–233
- He M, Tucciarone J, Lee S, Nigro MJ, Kim Y, Levine JM, Kelly SM, Krugikov I, Wu P, Chen Y, Gong L, Hou Y, Osten P, Rudy B, Huang ZJ (2016) Strategies and Tools for Combinatorial Targeting of GABAergic Neurons in Mouse Cerebral Cortex. *Neuron*, 91; 1228-1243.
- Howard A, Tamas G, Soltesz I. (2005) Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends Neurosci*, 28: 310-316.

- Iadecola C (2002) Intrinsic signals and functional brain mapping: caution, blood vessels at work. *Cereb Cortex*, 12: 223–224.
- Jacquin MF, Rhoades RW. (1990) Cell structure and response properties in the trigeminal subnucleus oralis. *Somatosens Mot Res*, 7: 265-288.
- Jiang T, Xing B, Rao J. (2008) Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 25: 41-75.
- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS. (2015) Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science*, 350: 9462.
- Jiao H, Lim AS, Fazio Coles TE, McQuade RM, Furness JB, and Chinnery HR. (2020) The effect of high-fat diet-induced metabolic disturbance on corneal neuroimmune features. *Exp Eye Res*, 201: 108298.
- Johnson LE, Larsen M, Perez MT. (2013) Retinal Adaptation to Changing Glycemic Levels in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *PLoS One*, 8, e55456
- Kadłubowska J, Malaguarnera L, Wąż P, Zorena K. (2016) Neurodegeneration and Neuroinflammation in Diabetic Retinopathy: Potential Approaches to Delay Neuronal Loss. *Curr Neuropharmacol*, 14(8):831-839.
- Karnani MM, Jackson J, Ayzenshtat I, Hamzehei Sichani A, Manoocheri K, Kim S, Yuste R. (2016) Opening Holes in the Blanket of Inhibition: Localized Lateral Disinhibition by VIP Interneurons. *J Neurosci*, 36(12):3471-80.
- Katz Y, Heiss JE, Lampl I. (2006) Cross-whisker adaptation of neurons in the rat barrel cortex. *J Neurosci*, 26: 13363-13372.
- Kern TS, Barber AJ. (2008) Retinal ganglion cells in diabetes. *J. Physiol*, 586, 4401–4408.
- Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. (2018) Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34(4):147-159.
- King AJF. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*, 166(3): 877-894.
- Koelbl C, Helmstaedter M, Lubke J, Feldmeyer D. (2015) A barrel-related interneuron in layer 4 of rat somatosensory cortex with a high intrabarrel connectivity. *Cereb Cortex*, 25: 713-725.

- Kuchibhotla KV, Gill JV, Lindsay GW, Papadoyannis ES, Field RE, Sten TA, Miller KD, Froemke RC. (2017) Parallel processing by cortical inhibition enables context-dependent behavior. *Nat Neurosci*, 20: 62-71.
- Lee JH, Yang SH, Oh JM, Lee MG. (2010) Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. *J Pharm Pharmacol*, 62: 1-23.
- Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B. (2013). A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci*, 16: 1662-1670.
- Lu SM, Lin RC. (1993) Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res*. 10:1-16.
- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A. (2006) Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci*, 26: 5069-5082.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR., Lein ES, Zeng H. (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13: 133-140.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*, 5: 793-807.
- Masland RH. (2012) The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 18;76(2):266-80.
- Mass A, Supin AZ. (1992) Peak Density, Size and Regional Distribution of Ganglion Cells in the Retina of the Fur Seal *Callorhinus ursinus*. *Brain, Behavior and Evolution*, 39: 69-76.
- Mass AM, Ketten DR, Odell DK, Supin AY. (2012). Ganglion cell distribution and retinal resolution in the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *Anat Rec (Hoboken)*, 295: 177-186.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 17: 969-973.
- Mease RA, Sumser A, Sakmann B, Groh A. (2016) Cortical Dependence of Whisker Responses in Posterior Medial Thalamus In Vivo. *Cereb Cortex*, 26: 3534-3543.

- Munoz W, Tremblay R, Levenstein D, Rudy B. (2017) Layer-specific modulation of neocortical dendritic inhibition during active wakefulness. *Science*, 355: 954-959.
- Munoz W, Tremblay R, Rudy B. (2014) Channelrhodopsin-assisted patching: in vivo recording of genetically and morphologically identified neurons throughout the brain. *Cell Rep*, 9: 2304-2316.
- Neske GT, Connors BW. (2016) Distinct Roles of SOM and VIP Interneurons during Cortical Up States. *Front Neural Circuits*, 10: 52.
- Nigro MJ, Hashikawa-Yamasaki Y, Rudy B. (2018) Diversity and Connectivity of Layer 5 Somatostatin-Expressing Interneurons in the Mouse Barrel Cortex. *J Neurosci*, 38: 1622-1633.
- Oliva AA Jr, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW. (2000) Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci*, 20: 3354-3368.
- Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M. (2013) Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci*, 16: 1068-1076.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF. (1996) Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*, 13: 18-19.
- Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A. (2013) Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*, 503: 521-524.
- Pohlkamp T, David C, Cauli B, Gallopin T, Bouche 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: 3046-3058.
- Porrogi P. (2016) Izoenzim specifikus citokróm p450 aktivitás és indukció gátlás vizsgálatok, Doktori értekezés tézisei. MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest
- Prönneke A, Scheuer B, Wagener RJ, Mock M, Witte M, Staiger JF. (2015) Characterizing VIP Neurons in the Barrel Cortex of VIPcre/tdTomato Mice Reveals Layer-Specific Differences. *Cereb Cortex*, 25: 4854-4868.
- Russ JC, Dehoff RT. *Practical Stereology*. Springer , New York, 2000: 130, 276-288

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7): 676-82.
- Schmitz C, Hof PR. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- Sermet BS, Truschow P, Feyerabend M, Mayrhofer JM, Oram TB, Yizhar O, Staiger JF, Petersen CC. (2019) Pathway-, layer- and cell-type-specific thalamic input to mouse barrel cortex. *eLife*, 8: e52665.
- Shaner N, Campbell R, Steinbach P. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22: 1567–1572.
- Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T. (2019) Gap Junctions Interconnect Different Subtypes of Parvalbumin-Positive Interneurons in Barrels and Septa with Connectivity Unique to Each Subtype. *Cereb Cortex*, 29: 1414-1429.
- Shine JM. (2021) The thalamus integrates the macrosystems of the brain to facilitate complex, adaptive brain network dynamics. *Prog Neurobiol*, 199: 101951.
- Shiota M, Printz RL. (2012) Diabetes in Zucker diabetic fatty rat. *Methods Mol Biol*, 933:103-23.
- Simó R, Simó-Servat O, Bogdanov P, Hernández C. (2022) Diabetic Retinopathy: Role of Neurodegeneration and Therapeutic Perspectives. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 11(2):160-167.
- Srinivasan K, Ramarao P. (2007) Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*, 125: 451-472.
- Staiger JF, Petersen CCH. (2021) Neuronal Circuits in Barrel Cortex for Whisker Sensory Perception. *Physiol Rev*, 101: 353-415.
- Staiger JF, Zuschratter W, Luhmann HJ, Schubert D. (2009) Local circuits targeting parvalbumin-containing interneurons in layer IV of rat barrel cortex. *Brain Struct Funct*, 214: 1-13.
- Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su OS., Lentz SI, Brosius F, Feldman EL. (2007) Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis*, 28: 276-285.
- Süveges I. Szemészet. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2006: 264-270

- Szabo K, Enzsoly A, Dekany B, Szabo A, Hajdu RI, Radovits T, Matyas C, Olah A, Laurik, LK, Somfai GM, Merkely B, Szél Á, Lukáts Á. (2017) Histological Evaluation of Diabetic Neurodegeneration in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. *Sci Rep*, 7: 8891.
- Szentágothai J, Réthelyi M. *Funkcionális anatómia III*. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2006: 1694-1700.
- Tamas G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P. (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci*, 3: 366-371.
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ. (2011) A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*, 71: 995-1013.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B. (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, 91: 260-292.
- Tschanz S, Schneider JP, Knudsen L. (2014) Design-based stereology: Planning, volumetry and sampling are crucial steps for a successful study. *Ann Anat*, 196: 3-11.
- Urban-Ciecko J, Barth AL (2016) Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nat Rev Neurosci*, 17: 401-409.
- van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, Garvin MK, Sonka M, Lee K, Devries JH, Michels RP, van Velthoven ME, Schlingemann RO, Abramoff MD. (2010) Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(7):3660-5.
- Villarreal M, Ciudad A, Hernández C, Simó R. (2010) Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes*, 1: 57-64.
- Viswanath K, McGavin DD. (2003) Diabetic retinopathy: clinical findings and management. *Community Eye Health*, 16: 21-4.
- Walker F, Mock M, Feyerabend M, Guy J, Wagener RJ, Schubert D, Staiger JF, Witte M. (2016) Parvalbumin- and vasoactive intestinal polypeptide-expressing neocortical interneurons impose differential inhibition on Martinotti cells. *Nat Commun*, 7: 13664.

- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. (2002) Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex*, 12: 395-410.
- Watakabe A, Hirokawa J, Ichinohe N, Ohsawa S, Kaneko T, Rockland KS, Yamamori T. (2012) Area-specific substratification of deep layer neurons in the rat cortex. *J Comp Neurol*, 520: 3553-3573.
- Weibel ER. (1981) Stereological methods in cell biology: where are we-where are we going? *J Histochem Cytochem*, 29: 1043-1052.
- Welker C, Woolsey TA. (1974) Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol*, 158: 437-453.
- West MJ, Slomianka L. (1998) Total number of neurons in the layers of the human entorhinal cortex. *Hippocampus*, 8: 69-82.
- Wimmer VC, Broser PJ, Kuner T, Bruno RM. (2010) Experience-induced plasticity of thalamocortical axons in both juveniles and adults. *J Comp Neurol*, 518: 4629-4648.
- Xu H, Jeong HY, Tremblay R, Rudy B. (2013) Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron*, 77: 155-167.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM. (2010) Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol*, 518: 389-404.
- Zilles K, Hajós F, Csillag A, Kalman M, Sotonyi P, Schleicher A. (1993) Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive structures in the mouse barrel field. *Brain Res*, 618: 149–154.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Hammoum I, Benlarbi M, Dellaa A, Szabó K, Dékány B, Dávid Cs, **Almási Zs**, Hajdú RI, Azaiz R, Charfeddine R, Lukáts Á, Ben Chaouacha-Chekir R. (2017) Study of retinal neurodegeneration and maculopathy in diabetic Meriones shawi: A particular animal model with human-like macula. *J Comp Neurol*, 525(13): 2890- 2914.

IF: 3,4

Hajdú R I., Laurik Lenke K., Szabó K, Dékány B, **Almási Zs**, Énzöly A, Szabó A, radovits T, Mátyás Cs, Oláh A, Szél Á, Somfai G. M, Dávid Cs, Lukáts Á. (2019) Detailed Evaluation of Possible Ganglion Cell Loss in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. *Scientific Reports*, (1):10463.

IF: 3,998

Almási Zs, Dávid Cs, Witte M, Staiger JF. (2019) Distribution Patterns of Three Molecularly Defined Classes of GABAergic Neurons Across Columnar Compartments in Mouse. *Barrel Cortex; Frontiers in Neuroanatomy*.

IF: 3,292

10.2. Egyéb közlemények

Rosta E, **Almási Zs**; Karácsony I, Konkoly Thege B, Hegedűs K. (2012) Orvostanhallgatók egészség-magatartása. Mentálhigiénés készségfejlesztés a hazai orvostudományban. *Orvosi Hetilap*, 153: 1153-1157.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Dávid Csabának, hogy vállalta a doktori munkám irányítását. Szemléletével, határtalan segítőkészségével és tudásával mindvégig segítette a munkámat. Nagyon köszönöm Dr. Papp Rege Sugárkának a házivédésre beadott dolgozatom legapróbb részletekbe menő, alapos bírálatát, ami nagyban segítette a disszertáció végleges formába öntését.

Köszönettel tartozom Prof. Szél Ágoston korábbi rektor és intézetigazgató úrnak, és Dr. L. Kiss Anna intézetigazgató helyettes asszonynak, hogy engedélyezte és támogatta munkámat a kezdetben Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, majd pedig az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet keretei között.

Köszönöm Dr. Alpár Alán intézetvezető úrnak, hogy munkám későbbi fázisában is lehetővé tette, hogy PhD munkámat az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetben befejezhessem.

Köszönöm Prof. Jochen F. Staiger úrnak, a Göttingeni Egyetem Anatómiai Intézetének vezetőjének, hogy laboratóriumában végezhettem munkám egy részét, s aki a cikkírás során végig szakmai segítséget nyújtott.

Köszönöm a volt Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet minden dolgozójának, hogy bármilyen szakmai vagy technikai problémával fordulhattam hozzájuk. Különösképpen köszönöm Dr. Lukáts Ákosnak az önzetlen baráti segítséget és biztatást a PhD tanulmányaim alatt.

Szeretnék köszönetet mondani Férjemnek, Családomnak és Barátaimnak, akik mindvégig támogattak.