

XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

2013

**Az ujjbegy reprezentációk reciprok kapcsolatai a főemlős
szomatoszenzoros kéregben**

Pálfi Emese

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia- Pázmány Péter Katolikus Egyetem- Semmelweis Egyetem

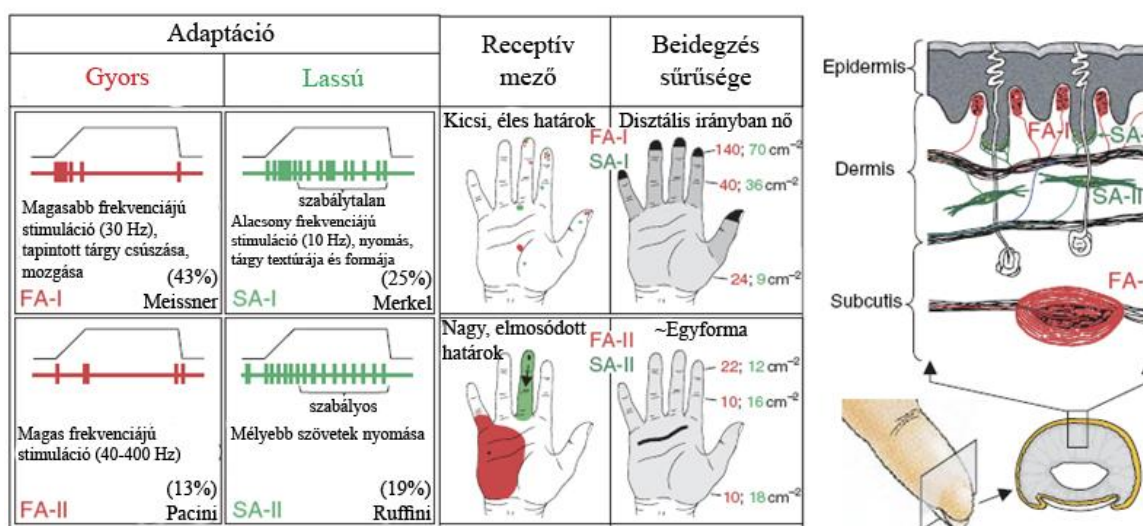
Infobionika és Neurobiológiai Plaszticitás Kutatócsoport

Tartalom

Bevezetés	3
Célkitűzések	6
Anyagok és módszerek.....	7
Állatok és tartási körülményeik	7
Műtét	7
Hisztológia	7
Adatelemzés	8
BDA jelölés térképezése.....	8
SLN és SLP értékek meghatározása	9
Agykérgi nagyítási faktor (CMF) meghatározása	10
Illesztés a funkcionális térképekkel	10
Eredmények	11
Kimenet-bemenet specificitás.....	11
Az anterográd és retrográd jel réteges eloszlása	13
Agykérgi nagyítási faktor (CMF)	18
Funkcionális megfontolások.....	19
Kétirányú nyomkövetés- módszerei megfontolások.....	20
Diskusszió	21
Összefoglalás	22
Köszönetnyilvánítás	23
Irodalomjegyzék.....	24

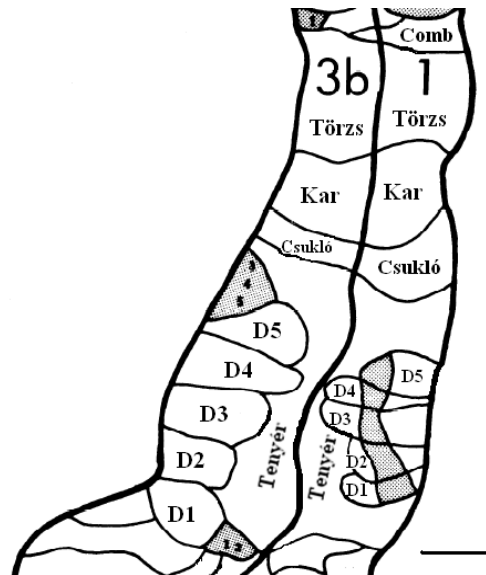
Bevezetés

A tapintás leképeződése az elsődleges szomatoszenzoros kéregben a lemniscus medialison keresztül valósul meg szomatotópiás térképek formájában. A kéz, különösen az ujjbegyek reprezentációja az agykéreg felszínén aránytalanul nagy területet foglal el, mivel ezek a test legnagyobb receptordenzitással rendelkező területei közé tartoznak (Martin és Jessel, 1991). Az ujjbegyek a szó szoros értelmében vett tapintás szerveinek tekinthetők. Receptoraiból két lassan és két gyorsan adaptálódó pálya indul: a lassan adaptálódó Merkel (SAI) és Ruffini (SAII), és a gyorsan adaptálódó Meissner (RA) és Pacini (PC) (1. ábra). Ezek közül a Merkel és a Meissner receptorok az epidermis és a dermis határán helyezkednek el, míg a RA és PC mélyreceptorok, a dermis és a subcutis kötőszövetes állományába ágyazódnak. A Merkel testek az alacsony frekvenciájú stimulációra (10 Hz), nyomásra szenzitívek, meghatározó szerepük van a tárgy textúra és forma kódolásában. A Meissner testek magasabb frekvenciájú stimulációra (30 Hz), a tapintott, megfogott tárgy csúszására és mozgására aktiválódnak a legkisebb küszöbvel, fontosak az időben folyamatosan változó ingerek érzékelésében. A felszíni receptorok primer afferenseinek receptív mezője kicsi (durván 1 mm^2), négy-tíz az ujjbegyen és a tenyéren található bőrbarázdát fognak át (Martin és Jessel 1991).



1. ábra
A tapintásban szerepet játszó bőr receptorok.
(Johansson és Flanagan nyomán, 2008)

A tapintás megértéséhez ismernünk kell az ujjbegyekből a fent említett négy csatornán érkező szenzoros információ integrációját, melyben az agykéreg kiterjedt intrinsic, laterális (áreán belüli), és áreák közötti asszociációs kapcsolatrendszer révén meghatározó szerepet játszik. A tapintással kapcsolatos idegi funkciók elsődleges szomatoszenzoros kérgi leképeződése négy funkcionális területre osztható, ezek az área 3a, 3b, 1 és 2 (Martin és Jessel, 1991). Ezek közül kitüntetett szerepet kap az área 3b és 1, a szomatoszenzoros kéreg azon része, amely az alapvető tapintási folyamatoknak ad helyet. Az área 3b és 1 a talamuszon keresztül főleg (nem kizárólag! ld. PC) a Merkel és Meissner bőrfelszíni, kis receptív mezejű mechanoreceptorokból kapnak bemenetet, amelyeket gyorsan (RA) és lassan adaptálódó (SA I) rostok idegeznek be (Kandel és Jessel, 1991).



2. ábra
Az elsődleges szomatoszenzoros kéreg kezecskéjének reprezentáló területének sematikus felépítése.
(méretarány: 1 mm)
(Sur és mtsai nyomán, 1980)

A két áreában egymással tükörszimmetrikus szomatotópiás térképek találhatók (2. ábra, 3. ábra): a kéz esetében az ujjbegyek reprezentációs területe az área 3b rostrális határán és az área 1 kaudális határán található, míg a tenyér alapjának reprezentációs területe az área 3b és 1 közös határán húzódik. A kéz és az ujjak reprezentációs területe erről a határvonalról tükröződik az área 3b-ben és 1-ben. Az elsődleges szomatoszenzoros kéregben, különösen az área 3b-ben és 1-ben, a funkcionális térképek szomatotópiásan rendezett, almodalitás specifikus formában (nyomás, flutter, rezgés) jelennek meg, hasonlóan az elsődleges látókéreg orientációs kolumnáihoz (Sur és mtsai., 1980, Friedman és mtsai. 2008). A funkcionális térképek alapján úgy tűnik az área 3b és 1 duplikációval jött létre, ellentétben pl. a látókéreggel, ahol az elsődleges és másodlagos áreák funkcionális reprezentációi eltérő elvek alapján szerveződnek (V1 adott irányú vonalakra érzékeny, V2 komplexebb ábrákra érzékeny).

Area 11 3b \ 3a

tip
base

mp: middle phalanx
h: hairy skin

Forearm

Wrist

Deep thenar

Deep palm

D5t

D345h

D23t

D34t

D4t

D3t

D12t

D123h

D1t

Thenar

Thenar

D5mp

D45t

D4t

D23t

D3t

D2t

D1t

D1b

D45

D234b

D234mp

D4mp

D34t

M

P

A

L

Célkitűzések

Mókusmajom (*Saimiri sciureus*) elsődleges szomatoszenzoros kérgében az ujjak reprezentációjának elektrofiziológiai és „intrinsic signal optical imaging” módszerek segítségével történő feltérképezését követően pályajelölő anyagokat injektáltunk a mutatóujj ujjbegyének reprezentációs területére az área 3b-ben (J, Mc, V) és az área 1-ben (M, Mo, PB). A szomatoszenzoros kéregben, különösképpen az área 3b és 1-ben megvizsgáltuk, hogy a lokális kapcsolatok kiterjedése hogyan viszonyul a reprezentált bőrfelület nagyságához (CMF). További célunk volt a tapintásban két legfontosabb área közötti kapcsolatok rétegi eloszlásának vizsgálata és annak megállapítása, hogy ezek a kapcsolatok megfelelnek-e a látókéregben megfigyelt hierarchikus elrendeződésnek (Felleman és vanEssen, 1991).

Anyagok és módszerek

Állatok és tartási körülményeik

A kísérletben hat mókusmajom (*Saimiri sciureus*), 3 nőstény (J, M és V) és 3 hím (Mc, Mo és PB) vett részt. Az elektrofiziológiai mérések és a pályajelölő anyagok injektálása kollaborációban, részvételünkkel történtek a Vanderbilt Egyetem Pszichológia Tanszékén (USA, Nashville, TN). A tartási és műtéti eljárások megfeleltek az IACUC-nak (Institutional Animal Care and Use Committee) valamint a NIH (National Institutes of Health) előírásainak.

Műtét

Biotinilált-dextrán-amint (BDA, Invitrogen) (10% 0.05M foszfát pufferben (PB), pH 7.4) iontophoretikus úton injektáltunk az área 3b funkcionálisan azonosított területére. Két különböző molekulásúlyú BDA, 10K és 3K 1:1 arányú keverékét 20 percen át 3 μ A árammal, 7 másodperces on/off ciklussal a kéreg felszín alatt 400 μ m-re adtuk be. A beadást a 2-es ujjbegy (d2t) reprezentációjának helyén végeztük, amely SAI szelektivitással rendelkezett. Mo esetében a 4-es ujj ujjbegy (d4t) reprezentációjának helyén végeztük a beadást, mert a 2-es ujj ujjbegyének reprezentációs területe túlságosan érzett volt.

10-20 napos túlélés (J:10 nap, Mc:14 nap, V:20 nap, M: 14 nap, Mo: 16, PB: 10 nap) után transzkardiális perfúziót végeztünk. Fiziológias sóoldattal (0,9 %-os NaCl desztillált vízben) kimostuk a vért, ezután 40 percig, 4 %-os paraformaldehidet, 0,1%-os glutáraldehidet és 0,2%-os pikrinsavat tartalmazó (0,1 M PB-ben, pH 7,3) fixálót áramoltattunk. A vizsgálni kívánt régiókat, área 3b, 1, 2 és 3a, kivágtuk a kéregből és 0,1 M PB-ben (pH 7,3) oldott 4%-os paraformaldehidben egy éjszakán át utófixáltuk.

Hisztológia

50 μ m vastag metszetek sorozatát vizsgáltuk, amelyeket az agyfelszínhez képest tangenciálisan metszettünk le. Az agyfelszíntől számított 2 x 100 μ m vastag metszetek után következtek a vizsgált sorozat metszetei. A blokk tetejéről levágott 100 μ m vastag metszetek az arachnoideális (1. és 2. metszet) és részben a neurális szövet tetejéről (3. metszet) származnak. Ezekben a metszetekben a vérerek párhuzamosak az agyfelszínnel. A kéregfelszín alatt az idegszövetben az erek már függőleges irányba futnak, a nagyobbak követhetők a sorozatmetszeten, ami a későbbiekben segített a funkcionális és anatómiai térképek összeillesztésekor (ld alább).

A BDA jelölés láthatóvá tételére standard ABC protokollt (Avidin és Biotinilált peroxidáz komplex, Vector) használtunk nikkel-intenzifikált diaminobenzidin (NiDAB) kromogén segítségével. A metszeteket egy éjszakán át 4 °C-on ABC-ben inkubáltuk (1:200 PB-ben, 0,1 M, pH 7,4), miután krioprotektáns anyaggal (30%-os cukor PB-ben) kezelt metszeteket fagyasztásos-olvasztásos technikával kezeltük a jobb penetráció érdekében. Borohidrid oldatát (1 % NaBH₄ PB-ben, 30 percig) használtuk a szabad aldehid csoportok, és 1% H₂O₂ oldatot (PB-ben) az endogén peroxidáz aktivitás blokkolására. A NiDAB reakció elvégzése után a metszeteket ozmiummal kezeltük (1% OsO₄ és 5% szacharóz PB-ben) és műgyantába (Durcupan, Sigma) ágyaztuk. A beágyazásra a metszetek torzulásának minimalizálása miatt volt szükség, a jobb illeszthetőség miatt.

Adatelemzés

BDA jelölés térképezése

A BDA jelölés feltérképezését Neurolucida programmal végeztük (MBF Bioscience), Olympus mikroszkóppal, amelyhez motorizált tárgyasztal tartozik. A BDA jelölés egyféle retrográd és kétféle anterográd jelet adott. A retrográd jel a neuronokat jelenti, amelyek az axonjuk által felvett jelölőanyagot a sejttestbe transzportálták. Az egyik anterográd jelet a hosszan követhető, csupasz vagy mielinizált rostok adják, a másikat a foltokat alkotó terminális arborizáció szerű célterületek, ahol az axonok finom ágakra bomlanak és sok bontott képeznek. A terminális arborizáció-szerű képletek foltos elhelyezkedése már régebbi szomatoszenzoros kéreg jelölés vizsgálatok óta ismert (Kubitser és Kaas, 1990; Lund és mtsai., 1993; Manger és mtsai., 1997). Lund és munkatársai (1993) megállapították, hogy az anterográd jelölődött terminális arborizációk a szomatoszenzoros kéregben kevésbé szembetűnők, mint a látókéregben. Ezek ellenére a terminális arborizációk térképezése kis nagyításon is elvégezhető nagy denzitásuk miatt és a mi esetünkben a körülhatárolásukat kézzel végeztük. A retrográd térképezést 10x és 20x, az anterográd térképezést 10x, 20x és 40x objektív nagyításon végeztük. A Neurolucidával készített térképeket Neurolucida Explorer programmal (MBF Bioscience) szerkesztettük.

A retrográd jelölés denzitását Voronoi diagram segítségével határoztuk meg a sorozatmetszetek kétdimenziós térképein. Ennek során a metszeteket erek, az elektródák szúrt csatornájának és a metszet vágott széleinek segítségével, a metszetek közti távolságot figyelmen kívül hagyva összeillesztettük (ld. alább). A Voronoi áréak fordítottan arányosak a BDA jelölt neuronok denzitásával. A Voronoi cellák méretét a sorozatban kapott legnagyobb értékkel osztva normalizáltuk, majd kiszámoltuk az átlagot és a szórást. A denzitás

megjelenítésére a szórás ill. az eredeti Voronoi cellák méretének logaritmusát szürke skálán kódoltuk. A beadási hely körül lévő 250-300 µm-es területet („uptake zone”) kihagytuk az analízisből, mivel itt a jelölőanyag beadása miatt keletkezett sérülések helyén a neuronok direkt módon is felvehették a jelölőanyagot.

A digitális mikroszkópos képeket Photoshoppal illesztettük össze a Neurolucida térképekkel.

SLN és SLP értékek meghatározása

A retrográd és anterográd térképek alapján a Neuroexplorer program segítségével kiimportáltuk a térképezés adatait. A retrográd térképezéssel számszerűsítettük a jelölődött neuronokat, míg az anterográd térképezéssel a terminális arborizációkat.

Az összekötött területek anatómiai kapcsolatának leírására bevezettünk egy paramétert, amely a szupragranuláris rétegekben jelölődött neuronok és terminális arborizációk arányát adja meg (Barone és mtsai., 2000). Az SLN és SLP értékeket a metszetek agyfelszíntől becsült távolságának ismeretében a következő módon számítottuk ki:

$$SLN = \frac{I - IV. \text{réteg neuronjainak száma}}{\text{összes neuron}}$$

$$SLP = \frac{I - IV. \text{réteg terminális arborizációinak száma}}{\text{összes terminális arborizáció}}$$

Az értékek számolásánál a szupragranuláris rétegek (I.-III. réteg) és a IV. réteg jelölődött struktúráit használtuk fel. A szupra- és infragranuláris rétegek elválasztását a különböző méretű piramissejtek megoszlása és a laterális kapcsolatok (retrográd, anterográd jelölődés) eloszlása alapján végeztük fénymikroszkópos vizsgálattal. Az I-III. rétegben kisebb méretű, az V. rétegben nagyméretű piramissejtek találhatók. A II-III. rétegben a retrográd és anterográd jelölődés sűrűsége magas, itt található a laterális kapcsolatok nagy része, míg a IV. rétegben kevés a laterális kapcsolat. Módszertani limitációnak tekinthető, hogy a metszeten a szupra- és infragranuláris rétegek elválasztása pontosan nem lehetséges a tangenciális metszés miatt. Az áréak összehasonlításához körül kellett határolnunk az área 3b és 1-et, amelyet az elektrofiziológiai mérések adatai alapján végeztünk, mivel erre a célra nincs megfelelő hisztológiai módszer.

Agykérgi nagyítási faktor (CMF) meghatározása

Az agykérgi nagyítási faktort a következőképpen számíthatjuk ki:

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

Esetünkben a testfelszín területe az ujjbegy ingerelt területét, az agykérgi terület az ujjbegy ingerelt területének reprezentációs területét jelenti.

Vizsgálatunkban az área 3b és área 1 beadásokat hasonlítottuk össze. Megkerestük az área 3b-ben és 1-ben retrográd módon legsűrűbben jelölődött területeket, majd az ezekhez tartozó bőrfelületet már publikált agykérgi nagyítási faktor érték alapján számoltuk ki (Friedman és mtsai., 2008):

- ingerlő átmérője $d = 3 \text{ mm}$
- ingerelt bőrfelület nagysága $T = r^2 \pi = 3,14 \times (1,5 \text{ mm})^2 = 7,1 \text{ mm}^2$
- aktív kérgi terület mérete az área 3b-ben = 1,12 mm
- aktív kérgi terület mérete az área 1-ben = 0,45 mm
- $CMF (\text{área 3b}) = 1,12 / 7,1 = 0,16$
- $CMF (\text{área 1}) = 0,45 / 7,1 = 0,06$

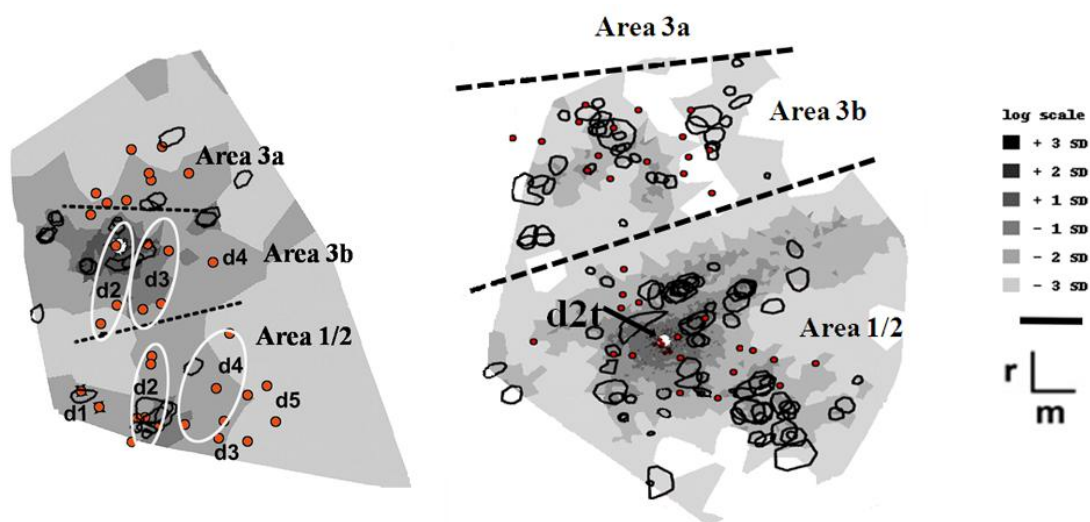
Illesztés a funkcionális térképekkel

A BDA-jelölt struktúrák feltérképezését a Neurolucida sorozatmetszet rekonstruáló funkciójával végeztük, amely egy illesztett digitális rekonstrukció sorozatot eredményez. A két legfelső metszet horizontális érmintázatát összeillesztettük az optical imaging és az elektrofiziológiás mérések alatt az ép agyfelszínről készült digitális fényképekkel. Az egymást követő metszetek összeillesztésénél a beadási hely körüli érmintázatot és a metszetek vágott sarkait valamint az elektródák szúrt csatornáit használtuk.

Eredmények

Kimenet-bemenet specificitás

A kísérlet során a mutatóujj ujjbegyének reprezentációs területére injektáltuk be a kétirányú jelölőanyagot (BDA 10K és 3K keveréke), majd feltérképeztük a retrográdan jelölődött idegsejteket és az anterográdan jelölődött rostokat és terminális arborizációkat. Ha a retrográd jelölődés sűrűség térképek formájában vizsgáljuk és összeillesztjük a terminális arborizációkkal és funkcionális térképekkel, megfigyelhetjük a kapcsolatok reciprok felépítését. A 4. ábrán erre láthatunk 1-1 példát, az área 3b beadásról (bal oldal) és az área 1 beadásról (jobb oldal). A szaggatott vonalak az área határokat jelzik, a piros pontok az elektródák helyeit mutatják, a fekete vastag körvonalak a terminális arborizációkat jelölik. Az área 3b beadás ábráján a fehér körvonalak az elektrofiziológias méréssel meghatározott ujj reprezentációs területét jelölik (d2= 2-es ujj, stb.).



4. ábra

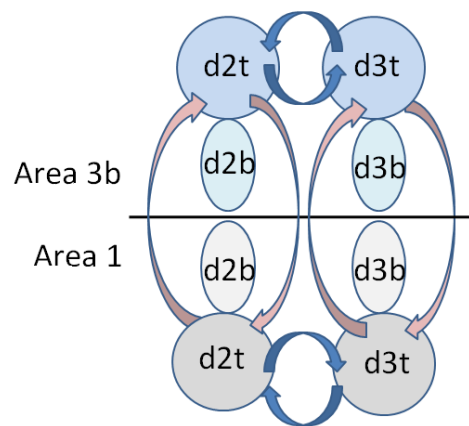
A funkcionális, retrográd sűrűség és anterográd jelölődés illesztett térképe área 3b (Mc) és área 1 (PB) beadás esetén.

r: rostrális, m: mediális, szaggatott vonal: áreas feltételezett határai, a szürkeárnyalatos skála a szórás illetve az eredeti Voronoi cellák méretének logaritmusát mutatja, méretarány: 1 mm

Az área 1 beadás esetén a d2t a kettes ujj ujjbegyének reprezentációs területét jelöli. A retrográd jelölődés denzitás térképén látható, hogy az áreaán belüli retrográd jelölődés mediolaterális, míg az áreaán kívül rostromkaudális kiterjedésű, rostrálisan az área 3b és 3a-ban, kaudálisan az área 1-ben lokalizálódik. A retrográd jelölődés legnagyobb sűrűségű területei jó egybeesést mutatnak az elektrofiziológias térképpel, így megállapítható, hogy a beadási hely bemeneti preferenciája a másik área d2t homotóp reprezentációs területe.

Az anterográd jelölődés irányultsága a retrográd jelölődéshez hasonló. A rostok mediolaterális és rosztrokaudális irányban futnak, a terminális arborizációk pedig a hosszú rostok elvégződéseire felé találhatók. Az elektrofiziológiai térképpel való illesztés megmutatta, hogy a terminális axon arborizációk az injektált ujjbegy homotóp régiójában lokalizáltak.

Az 5. ábrán látható, hogy az ujjbegyek reprezentációs területei az area 3b és 1-ben hasonló kapcsolati felépítést mutatnak az elsődleges szomatoszenzoros kéregben. Az ábrán belüli kapcsolatok a szomszédos ujjbegy reprezentációs területeivel tartanak kapcsolatot, amíg a hosszú, áréak közötti kapcsolatok a homológ területek között valósulnak meg.

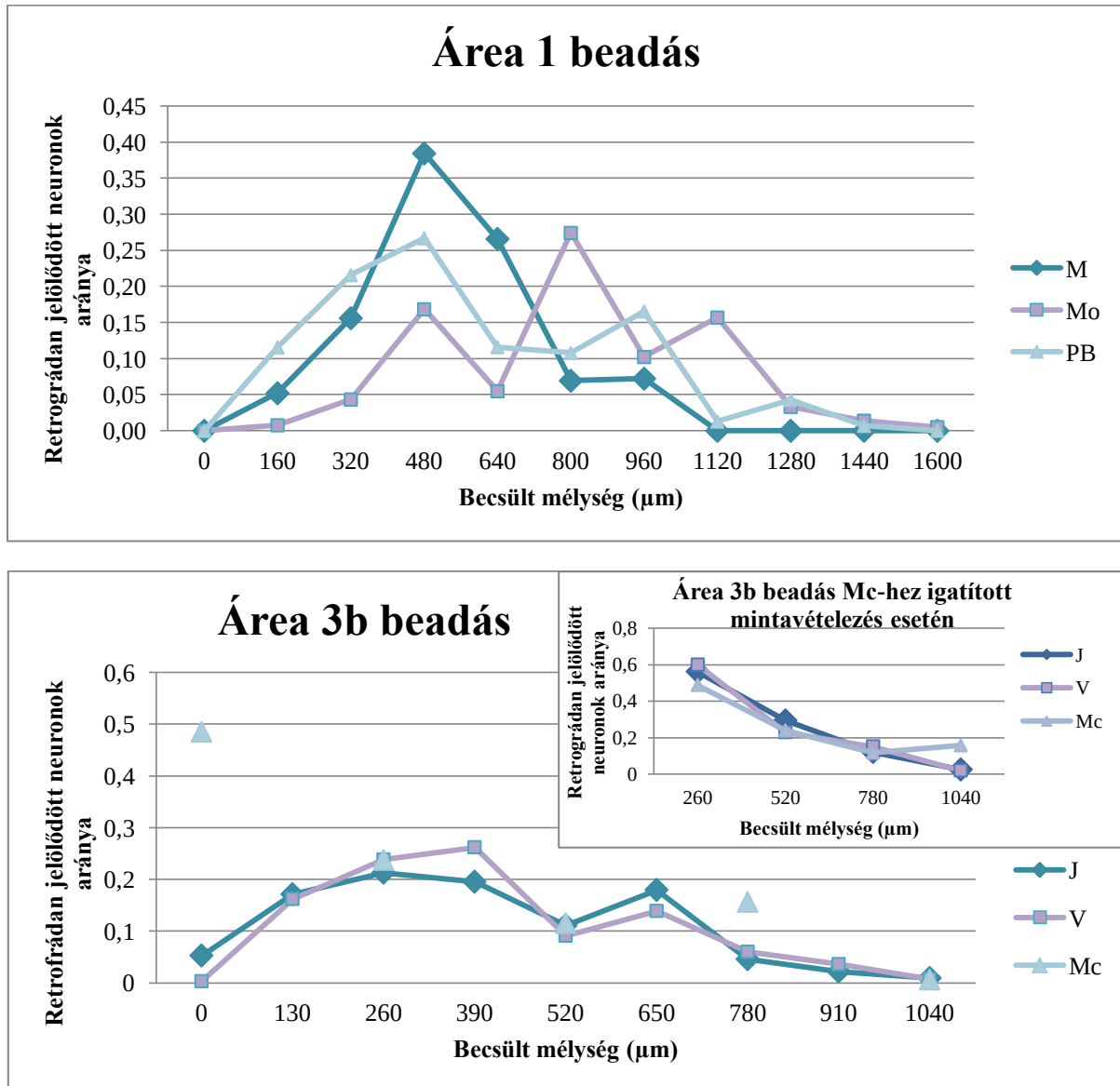


5. ábra

**Az ujjbegy reprezentációk azonos kapcsolati felépítése az area 3b és 1-ben.
d2/3t= 2/3-es ujj ujjbegyének reprezentációs területe, d2/3b= 2/3-es ujj alapjának reprezentációs területe.**

Az anterográd és retrográd jel réteges eloszlása

A következő diagrammokon a jelölődött neuronok relatív aránya (6. ábra) és terminális arborizációk aránya (6. ábra) látható a becsült mélység függvényében. A mélységet a kérgi felszíntől viszonyítva számoltuk a metszési távolságok ismeretében, a vonalak az egyes eseteket jelölik.



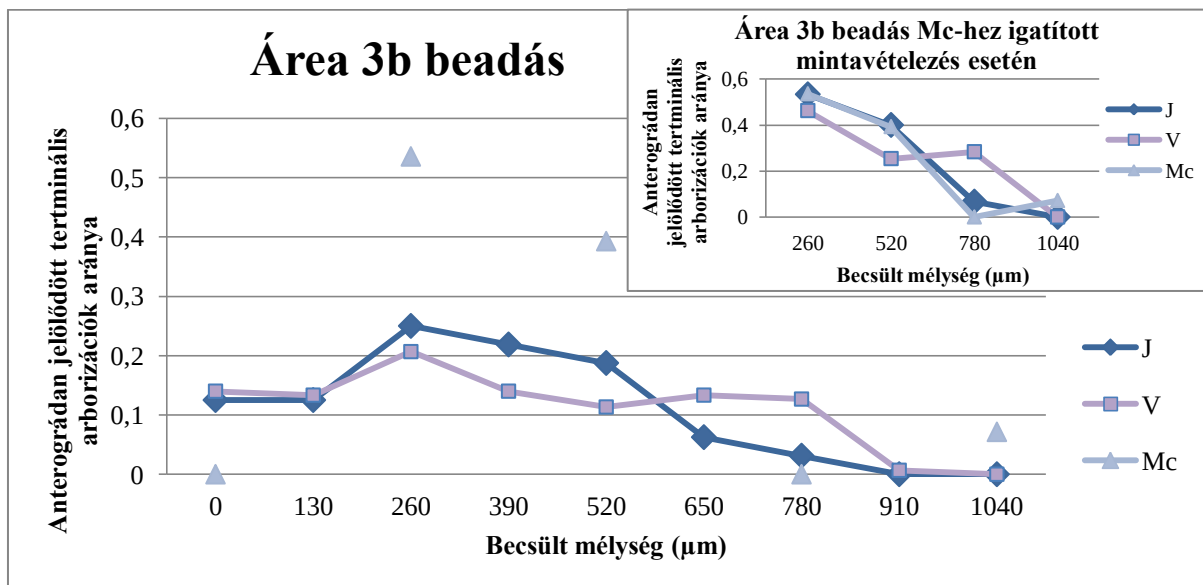
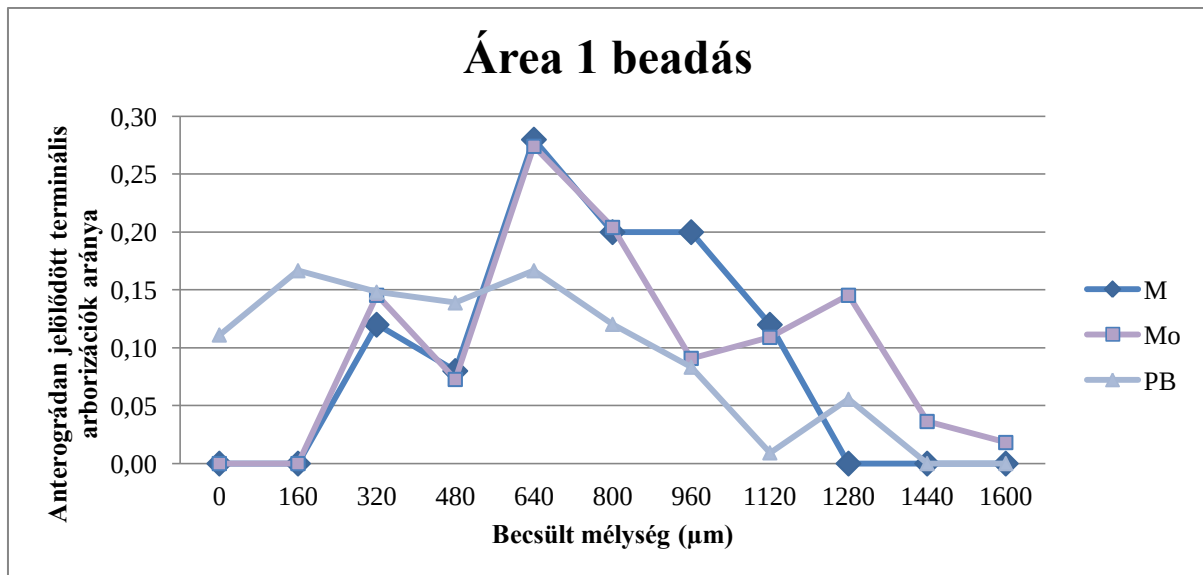
6. ábra

Retrográdan jelölődött neuronok aránya a mélység függvényében área 1 és 3b beadás esetén. Az área 3b beadáshoz csatolt diagram a Mc-hez igazított mintavételezést mutatja. A mélységet az agyfelszíntől számítva az egyes metszetek vastagságának ismeretében határoztuk meg. A vonalak az egyes eseteket jelölik (J, M, M Mc, Mo, PB, V).

Retrográd (6. ábra): Az área 1 beadásnál M esetében 1 kiugró értéket figyelhetünk meg a szupragranuláris rétegekben, ez a 480 μm -hez tartozó érték. Eddig az értékig a jelölődött neuronok száma nő, majd ez alatt a mélység alatt csökken. A 960 μm alatti metszetekben már nem jelölődtek neuronok. Mo esetében 3 kiugró értéket figyelhetünk meg a 480, 800, 1120 μm -es mélységű metszeteknél. Ebben az esetben az 1440 μm -es mélység alatt nem jelölődtek neuronok. A legsűrűbben jelölődött metszet 320 μm -rel mélyebben van, mint a másik két állat esetében. PB esetében a görbe lefutása hasonló M-éhez, de itt a szupragranuláris rétegekben több, míg az infragranuláris rétegekben kevesebb neuron jelölődött. Itt három kiugró értéket figyelhetünk meg. Az egyik a szupragranuláris rétegekben lévő 320 μm -hez tartozó érték, a másik kettő az infragranuláris rétegekben lévő 960 μm -hez és 1280 μm -hez tartozó érték.

Área 3b beadás esetén Mc-nél a mintavételezés ritkább volt, így ennél az állatnál fele annyi adat áll rendelkezésre, mint a másik kettőnél. Az área 3b beadás diagramjához csatolt diagramon látható, hogy ha Mc-hez igazítjuk a mintavételezést akkor nagyon hasonló eloszlásokat kapunk a 3 esetben. Mc-nél a legfelső rétegben is jelölődtek neuronok, a többi érték követi a J, V görbét. Kiugró érték még a 780 μm -nél lévő adat, ahol több neuron jelölődött, mint a másik két állatnál. J és V esetén a görbék lefutása nagyon hasonló. A szupragranuláris rétegekben lévő kiugró érték V-nél magasabb (390 μm), míg az infragranuláris rétegekben lévő kiugró érték J-nél magasabb (650 μm).

A diagramokról leolvasható, hogy a jelölődött neuronok minden régióban a szupragranuláris rétegekben dominálnak mindkét beadás esetén.



7. ábra

Anterográdan jelölődött terminális arborizációk aránya a mélység függvényében área 1 és 3b beadás esetén. Az área 3b beadáshoz csatolt diagram a Mc-hez igazított mintavételezést mutatja. A mélységet az agyfelszíntől számítva az egyes metszetek vastagságának ismeretében határoztuk meg. A vonalak az egyes eseteket jelölik (J, M, Mc, Mo, PB, V).

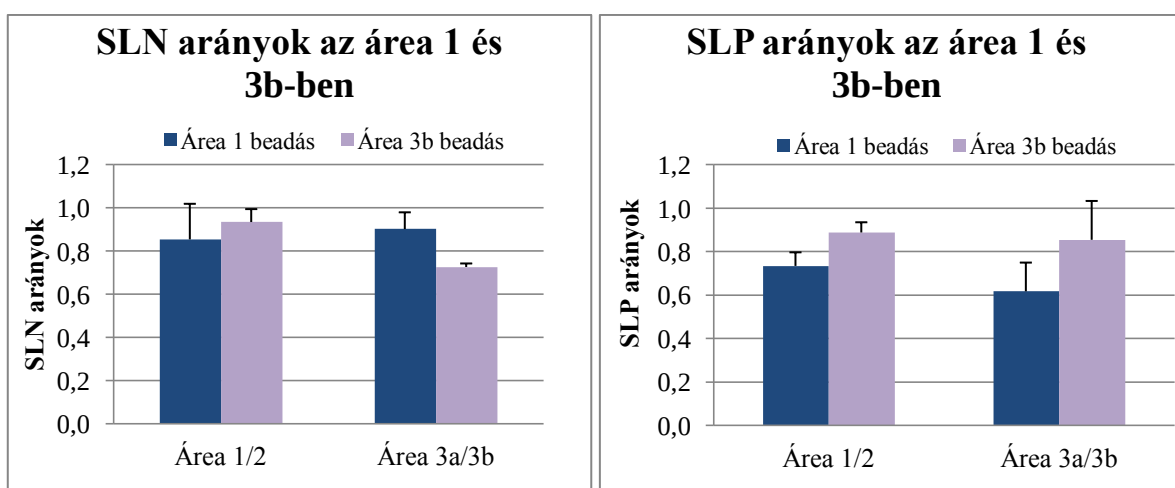
Anterográd (7. ábra): Área 1 beadás esetén M és Mo görbéje 800 μm -ig egyforma lefutású. M-nél 960 μm -tól csökken a jelölődött terminális arborizációk száma. Mo-nál az 1280 μm -hez tartozó érték kiugró, itt ugyanannyi terminális arborizáció jelölődött, mint a 320 μm -es mélységben. Ettől az értéktől kezdve csökken az anterográd jelölődés aránya. PB esetében a szupragranuláris rétegekben nagyjából egyforma mennyiségű terminális arborizáció

jelölődött. 640 μm -tól csökken az anterográd jelölődés aránya. Az infragranuláris rétegekben 1 kiugró érték található az 1280 μm -es mélységben.

Área 3b beadás esetén Mc-nél a mintavételezés ritkább volt, így ennél az állatnál fele annyi adat áll rendelkezésre, mint a másik kettőnél. Az área 3b beadás diagramjához csatolt diagramon látható, hogyha Mc-hez igazítjuk a minta vételezést akkor nagyon hasonló eloszlásokat kapunk a 3 esetben. Mc-nél a legfelső rétegben nem jelölődtek terminális arborizációk, viszont a mélyebb rétegekben 2 kiugró érték is szerepel a diagramon, az egyik a 260 μm -hez, a másik az 520 μm -hez tartozó. Ezekben a mélységekben sokkal több terminális arborizáció jelölődött, mint J és V esetében. J és V esetén a görbék lefutása itt is, mint a retrográd jelölődés esetén meglehetősen egyforma. A felsőbb rétegekben kb. egyforma az anterográd jelölődés aránya. Kiugró érték a 260 μm -nél, itt J-ben volt több a jel, és 650 μm -nél, itt V-ben volt több a jel, található. 780 μm alatt már nem találunk anterográd jelet ebben a két állatban.

Az anterográd módon jelölődött terminális arborizációk esetében elmondható, hogy az área 1 beadás esetében valamivel több terminális arborizációt találtunk, és itt is a szupragranuláris jelölődés dominál.

A következő diagramokon a retrográd módon jelölődött neuronokból számolt SLN, és az anterográd módon jelölődött terminális arborizációkból számolt SLP értékek láthatók área 1 és 3b beadás esetén a két áréára számolva.



8. ábra

A szupragranuláris rétegekben jelölődött neuronok (SLN) és terminális arborizációk (SLP) aránya az área 1-ben (área 2 is) és área 3b-ben (área 3a is).

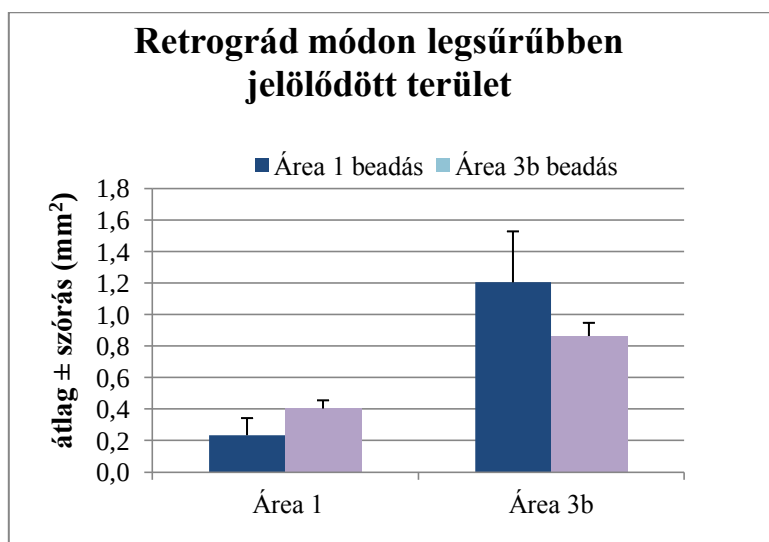
Az SLN arányokat mutató táblázaton (8. ábra) látható, hogy az área 1-ben az área 3b beadás esetében jelölődött több neuron, míg az área 3b-ben az área 1 beadás esetén.

Área 1 beadás esetén az área 3b-ben 6%-al több neuron jelölődött, mint az área 1-ben. Área 3b beadás esetén az área 1-ben 22%-al több neuron jelölődött, mint az área 3b-ben. Ez alapján elmondható, hogy a homotóp területek szupragranuláris rétegei jelölődtek jobban retrográd jelölés esetén. Az área 1 és 3b-re számolt kétutas, ismétléses ANOVA azt mutatja, hogy a beadási hely a retrográdan jelölődött neuronok esetén hatással van a mért értékekre ($p=0,053796$). A kétszélű, kétmintás, nem egyenlő varianciájú t-próba azt mutatja, hogy az área 3b-n belül szignifikáns a különbség az área 1 és 3b beadás között ($p=0,02599$).

Az SLP arányokat mutató táblázaton (8. ábra) látható, hogy mind az área 1-ben, mind az área 3b-ben az área 3b beadás esetén jelölődött több terminális arborizáció.

Área 1 beadás esetén az área 1-ben 16%-al több jelet kaptunk, mint az área 3b-ben. Área 3b beadás esetén az área 1-ben 5%-al volt több jel. Elmondható, hogy mindkét beadás esetén több jelet kaptunk az área 1-ben, ami azt jelenti, hogy itt több rostelvégződés található, az área 1 több bemenetet kap, mint az área 3b. Itt egyik beadás esetén sem szignifikáns a különbség. Az área 1 és 3b-re számolt kétutas, ismétléses ANOVA azt mutatja, hogy a beadási hely az anterográdan jelölődött terminális arborizációk esetén nincs hatással a mért értékekre ($p=0,605718$), viszont az área 1 és 3b beadás között van marginális különbség ($p=0,059419$).

Agykérgi nagyítási faktor (CMF)



9. ábra

Retrográd módon legsűrűbben jelölődött területek átlaga és szórása árter 1 és 3b beadás esetén.

A 9. ábráról leolvasható, hogy az erősen jelölődött kortikális területek az árter 1-ben kisebbek voltak, mint az árter 3b-ben mindkét beadás esetében. A különbség az árter 1 és árter 3b erősen jelölődött kérgi területeinek nagyságában statisztikailag szignifikáns volt (t-próba, $p < 0,01$). Két utas, ismétléses ANOVA esetén is szignifikáns kölcsönhatás van vizsgált területek helyzete és az injektálás helye között, ez a diagramon úgy jelenik meg, hogy a beadási helyen mért értékek kisebbek, mint a másik árterben. Azonos területen belül az injektált és nem injektált területek összehasonlításakor nem találunk statisztikailag szignifikáns különbséget (t-próba, árter 3b: $p = 0,158$ és árter 1: $p = 0,07$). Ha figyelembe vesszük a kérgi nagyítási faktort, a legsűrűbben jelölt kérgi terület által reprezentált bőrfelület, akkor a bőrfelület által reprezentált retrográd módon legsűrűbben jelölődött terület összehasonlítható az árter 3b-ben ($6,5 \pm 1,8 \text{ mm}^2$) és az árter 1-ben ($5,3 \pm 2 \text{ mm}^2$) (t-próba: $p \gg 0,05$).

Funkcionális megfontolások

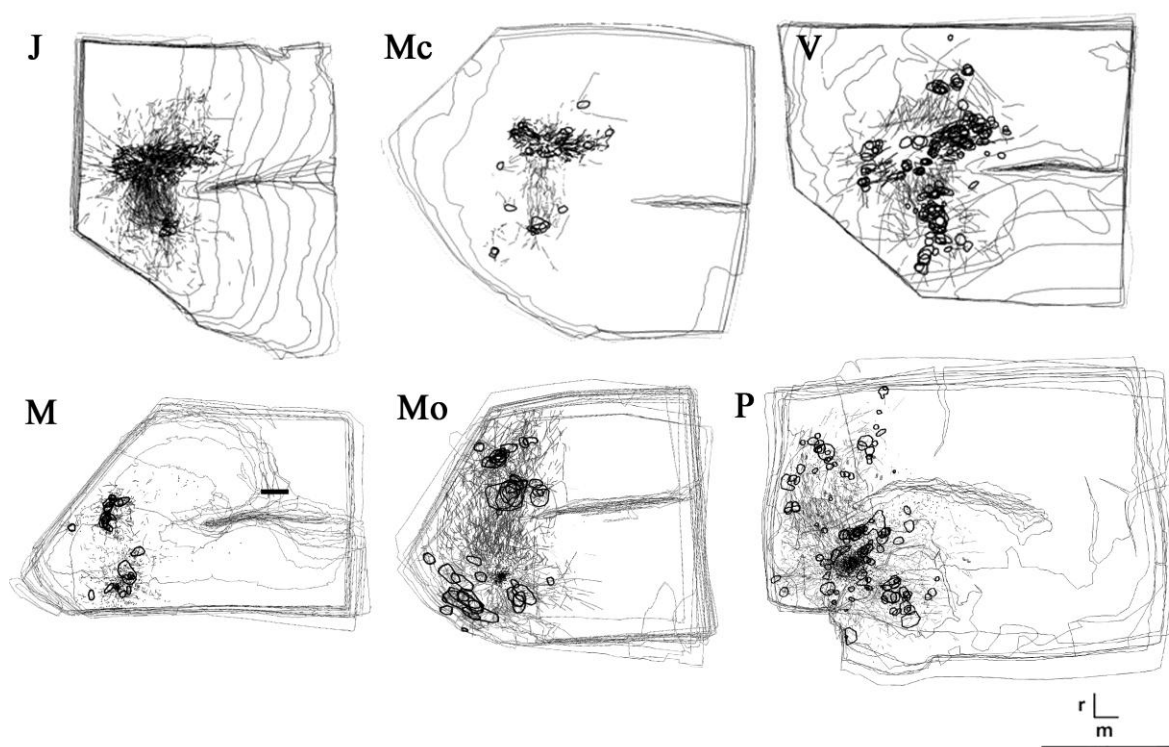
A jelenlegi eredmények azt mutatják, hogy erős lokális kapcsolatok vannak az ujjbegyek reprezentációs területein belül (Krubitzer és Kaas, 1990; Burton és Fanri 1995; Manger et al., 1997; Coq, 2004). A topografikusan szerveződő összeköttetés fontos szerepet játszik a taktilis információk eredetének megállapításában. A bőr egy-egy területét érő ingert perifériás szenzoros afferensek csoportja, populációja reprezentál (Goodwin és Wheat, 2004). Ma még nem tudjuk, hogy a szenzoros afferensek információi hogyan képeződnek le a központi idegrendszerben, de valószínűsíthető, hogy az área 3b-nek fontos szerepe lehet a primer afferens populációk által szállított információ integrációjában. Ezt a tényt a receptív mezők kortikális és szubkortikális szinten való összehasonlítása támasztja alá. Eredményeink azt mutatják, hogy a taktilis információ integrációja a szomszédos ujjbegyek reprezentációs területeinek kölcsönös kapcsolatain alapulnak. Továbbá, a primer szomatoszenzoros kéreg részt vesz a tapintott tárgy teljes reprezentációjának felépítésében. A “tölcser” illúzió jó példa az információ integrálásának szemléltetésére. Ezt az illúziót csak a szomszédos ujjak ingerlésével lehet kiváltani, ami az área 3b és 1-ben az ingerelt ujjak közötti terület aktivitását eredményezi (Chen et al., 2003). Ez alátámasztja azt az eredményünket, hogy az área 3b-ben erős kölcsönös kapcsolat van a szomszédos ujjak között. A szomszédos ujjbegyek reprezentációi között nem-mielines rostok teremtenek kapcsolatot, amelyek képesek az egyedi ujjbegy reprezentációk közötti kérgi területeket aktiválni.

A hosszú távú, áréak közötti kapcsolatok, különösen az área 3b és 1 között, kiindulási és célpontja is az área 1 homotopikus reprezentációs területe. Az área 3b fent említett lokális kapcsolatmintázata szerepet játszhat a lokális és globális információ integrációjában ezzel az área 1-ben a bonyolultabb receptív mező felépítéséhez. Végül fontos megemlíteni, hogy az área 3b és 1 között jelentős mennyiségű mileines rostot találtunk, amelyek a gyors jeltovábbításért felelősek.

A kiterjedt, diffúz, alacsony denzitású anterográd és retrográd jelölődés az área 3b-ben és 1-ben szintén szerepet játszhatnak a taktilis információ integrációjában, feltehetően küszöb alatti, modulatorikus neuronális kölcsönhatások révén. Összegezve elmondható, hogy az área 3b-ben az ujjbegyek reprezentációinak kapcsolati eloszlása azt sugallja, hogy a tapintási információ egy bonyolult integrációs folyamaton megy keresztül már az elsődleges szomatoszenzoros kéregben (área 3b), majd magasabb szintű szomatoszenzoros területekre kerül, mint például az SII, amely alapvető szerepet játszik a tárgyfelismerésben (Dijkerman and de Haan, 2007).

Kétirányú nyomkövetés- módszerei megfontolások

A kis és nagy molekulású BDA keverékének használata lehetővé teszi a kétirányú neuronális pályajelölést. A módszer lehetséges hátránya, hogy a retrográd módon jelölődött neuronokból induló axonokba a festék „visszatöltődik” távol a beadási helytől. Ez tehát indirekt módon egy másodlagos célterület megjelenéséhez vezet. A mi esetünkben ez a jelenség elhanyagolhatónak tűnik. Először is a hosszú axonok, amelyek nagy távolságban követhetők, leginkább a beadási helytől indulnak. Ez a mintázat nem figyelhető meg vagy elenyésző mértékű az elsődlegesen retrográd módon jelölődött neuroncsoportok körül. Másodszor néhány terminális arborizáció-szerű struktúrát olyan helyen figyeltünk meg, ahol a retrográd jelölődés hiányzott, és ezeket a terminális foltokat is hosszú axonok kötötték össze a beadási hellyel (10. ábra). Harmadszor a feltérképezett axonok elágaznak a terminális foltok felé, azt sugallva, hogy ez az axonok kifelé vezető iránya a beadási helytől. Legfontosabb azonban, hogy a terminális foltok a magas retrográd jel denzitású területeken vannak, amíg az axonok visszatöltődése esetén a retrográdan nem jelölődött területeken is meg kellene jelenniük (10. ábra).



10. ábra

Az axonok és a terminális arborizációk eloszlásának kétdimenziós térképe mind a hat esetben.

Felső sor: Área 3b beadás, alsó sor: Área 1 beadás

(méretarány: 5 mm)

Diszkusszió

Az ujjbegy reprezentáció horizontális kapcsolatainak mintái az área 3b és 1-ben hasonlóak a funkcionális térkép mintázataival ebben a két szomatoszenzoros kérgi áreaiban. Úgy tűnik, hogy az ujjbegy azonos bőrfelületéről érkező bemeneti jel szignifikánsan kisebb kérgi területen dolgozódik fel az área 1-ben, mint az área 3b-ben. Az egyéni eltérések ellenére az eredmények azonos trendeket követnek a 6 állatban.

A kapcsolatok eloszlásának vizsgálata megmutatta, hogy mind az áreaán belüli, mint az áreaák közötti kapcsolatok reciprok típusúak, mint ahogy azt Burton és Fabri (1995) már leírta. Az áreaán belüli laterális kapcsolatok a globális tapintási érzet alapjait szolgáltatják. Az áreaák közötti információtranszfer a homotóp területek között valósul meg, ezek pedig fontos szerepet játszhatalnak az exploráció és manipuláció során az egyes ujjakból származó ingerek integrációjában, koordinációjában.

Az anterográd és retrográd jel réteges eloszlásának vizsgálata megmutatta, hogy van hierarchia az áreaák között, ezt bizonyítja, hogy az área 1-ben több terminális arborizáció jelölődött, továbbá az área 1 kisebb receptív mező mérete és az agykérgi nagyítási faktor érték is, amely az área 1-ben kisebb.

Az agykérgi nagyítási faktor értékek vizsgálata megmutatta, hogy az ebből fakadó nagyobb konvergencia az área 1-ben felelős lehet a komplexebb receptív mező tulajdonságokért az área 3b-hez képest. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a feltételezést miszerint az área 1 magasabb feldolgozási szintet jelent, mint az área 3b.

Összefoglalás

Eredményeink azt mutatják, hogy az área 3b és 1 kapcsolatainak mintázata hasonló. Az áreaán belüli kapcsolatok a szomszédos ujjbegyek között teremtenek kapcsolatot, míg az áreaák közötti, hosszú kapcsolatok a homotóp területeket kötik össze. Emellett mind az áreaakon belüli, mind az áreaák közötti kapcsolatokban kimutatható egy alacsony denzitású, diffúz anterográd és retrográd jelölődés.

Legfontosabb eredményként elmondható, hogy az ujjbegyekből érkező információ integrálása már a primer szomatoszenzoros kéregben elkezdődik. Az área 3b egy elsődleges feldolgozási szintet jelent, míg az área 1 magasabb szintet képvisel.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Négyessy Lászlónak, hogy odafigyelő munkájával segítette a dolgozat megírását. Külön köszönet illeti Ashaber Máriát, aki a dolgozat elkészítésében nagy segítséget nyújtott, és Magyar Tündét, aki a labormunkában vállalt nagy szerepet, valamint a labor munkatársait, hogy munkánkban segítséget nyújtottak.

Irodalomjegyzék

Barone P., Batardiere A., Knoblauch K., Kennedy H. (2000): Laminar distribution of neurons in extrastriate areas projecting to visual areas V1 and V4 correlates with the hierarchical rank and indicates the operation of a distance rule. *J Neurosci.*, 20(9):3263-81.

Harold Burton, Mara Fabri (1995): Ipsilateral Intracortical Connections of Physiologically Defined Cutaneous Representations in Areas 3b and 1 of Macaque Monkeys: Projections in the Vicinity of the Central Sulcus. *The Journal of Comparative Neurology*, 355:508-538.

Kenneth C. Catania, Duncan B. Leitch, Danielle Gauthier (2011): A star in the brainstem reveals the first step of cortical magnification. *PLoS ONE*, vol.6, issue 7.

Li M. Chen, Robert Friedman, Anna W. Roe (2003): Optical imaging of a tactile illusion in area 3b of the primary somatosensory cortex. *Science*, Vol. 302, 881-885.

Li M. Chen, Robert Friedman, Anna W. Roe (2005): Optical imaging and SI topography in anesthetized and awake squirrel monkeys. *The journal of neuroscience*, 25(33):7648-7659.

Jacques-Olivier Coq, Huixin Qi, Christine E. Collins, Jon H. Kaas (2004): Anatomical and functional organization of somatosensory areas of the lateral fissure of the New World titi monkey (*Callicebus moloch*). *The journal of comparative neurology*, 476 (4):363-87.

H. Chris Dijkerman, Edward H. F. de Haan (2007): Somatosensory processes subserving perception and action. *Behavioral and Brain Sciences*, 30, 189 –239.

Felleman DJ., vanEssen DC. (1991): Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 1(1):1-47.

Robert M. Friedman, Li Min Chen, Anna W. Roe (2008): Responses of area 3b and 1 in anesthetized squirrel monkeys to single- and dual-site stimulation of the digits. *J Neurophysiol*, 100:3185-3196.

Antony W. Goodwin, Heather E. Wheat (2004): Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 27: 53-77.

Roland S. Johansson, J. Randall Flanagan (2008) Tactile sensory control of object manipulation. in: The senses: A comprehensive reference. *Elsevier Inc.*, vol. 6, pp. 67-86.

Eric R. Kandel, Thomas M. Jessel (1991): Touch. Part V., Chapter 26. *Principles of neural science* (szerkesztette: Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell) New York, Elsevier Science Publishing Co., ISBN 0-444-01562-0, pp: 367-384.

Leah Krubitzer, John Kaas (1990): Cortical connections of MT in four species of primates: areal, modular, and retinotopic patterns. *Visual Neurosci*, 2, 165-204.

Lund JS, Yoshioka T, Levitt JB (1993): Comparison of intrinsic connectivity in different areas of macaque monkey cerebral cortex. *Cereb Cortex.*, 3(2):148-62.

Paul R. Manger, Timothy M. Woods, Alberto Munoz, and Edward G. Jones (1997): Hand/Face Border as a Limiting Boundary in the Body Representation in Monkey Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 17(16):6338–6351.

John H. Martin, Thomas M. Jessel (1991): Modality coding in the somatic sensory system. Part V., Chapter 24. *Principles of neural science* (szerkesztette: Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell) New York, Elsevier Science Publishing Co., ISBN 0-444-01562-0, pp: 341-352

Mriganka Sur, Michael M. Merzenich, Jon H. Kaas (1980): Magnification, receptive-field area, and „hypercolumn” size in areas 3b and 1 of somatosensory cortex in owl monkeys. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 44, No. 2, 295-311.

Welker E., Van der Loos H. (1986): Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. *J Neurosci*, 6: 3355–3373.