B3549

TÉZISEK

IDEGI PLASZTICITÁS TANULMÁNYOZÁSA PATKÁNY SZOMATOSZENZOROS ÉS MOTOROS KÉRGÉN

Farkas Tamás

témavezetõ

Dr. Toldi József, D.Sc.
tanszékvezetõ egyetemi tanár

József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Összehasonlító Élettani Tanszék

Szeged
1998

BEVEZETÉS, CÉLKITÛZÉSEK

Az idegrendszer mûködése során - a homeosztázis fenntartása érdekében - képes a szervezet és a külvilág jelzéseinek felvételére, feldolgozására és a végrehajtó szervek felé irányuló parancsok kiadására. Az idegi plaszticitás fogalma igen tág és nehezen definiálható, legáltalánosabban az idegrendszer adaptív változásokra való képességét értjük alatta. Az idegrendszernek e képessége igen összetett: a reflextevékenységtõl kezdve, a sérülésekre adott válaszokon át, a bonyolult tanulási folyamatokig terjed. A fenti témakörök közül értekezésemben a másodikként említett, sérülésekre adott központi idegrendszeri reakciókkal foglalkozom. Morfológiai, elektrofiziológiai és magatartási kísérleteinkben a fejlõdõ és a felnõtt idegrendszer denervációra és deprivációra adott válaszait tanulmányoztuk egy erre alkalmasnak bizonyult modell állaton. A rágcsálók (egér, patkány) környezetüket bajuszszõreikkel (vibrisszáikkal) tapogatják le. A bajuszszõröknek - melyek az állat legfontosabb érzékszervét képezik - rendkívül precíz szomatotópiája található mind a szomatoszenzoros mind pedig a motoros kérgen. Mindez igen alkalmassá teszi ezeket az állatokat a szenzoros depriváció vagy denerváció kiváltotta plasztikus változások vizsgálatára. Az értekezés alapjául szolgáló kísérleteinkben az ilyen jellegû beavatkozások által kiváltott plasztikus folyamatokat tanulmányoztuk a patkány szomatoszenzoros és motoros rendszerében. Kezdetben magában a szomatoszenzoros rendszerben idéztünk elõ deprivációt: újszülött (neonatális) és felnõtt korban kétoldali folyamatos vibrisszanyírást végeztünk. Az állatok viselkedésében (orientációs tevékenység) bekövetkezett változásokat hasonlítottuk össze intakt felnõtt patkányok ellenében. Majd a látás korai elvesztésének a szomatoszenzoros rendszerre gyakorolt hatását vizsgáltuk magatartási és elektrofiziológiai kísérletekben. Ezen vizsgálataink során derült ki, hogy a szomatoszenzoros rendszer plasztikus jelenségeiben a kolinerg moduláció igen fontos szerepet játszik. A kérdéskör komplex megközelítése érdekében az utóbbi idõben a szomatoszenzoros rendszerrel rendkívül szoros és kölcsönös funkcionális kapcsolatban álló motoros rendszeren folytatjuk plaszticitási vizsgálatainkat. A kölcsönhatást bizonyítja az a tény is, hogy nemcsak a motoros kéreg efferens ágának, hanem a szomatoszenzoros kéreg afferens ágának átvágásával is ki lehet váltani a motoros kérgi reprezentációs térképek átrendezõdését. A fentiekre alapozva vizsgáltuk a motoros kérgen jelenlévõ szomatoszenzoros információ eredetét és azon tulajdonságait, amelyek révén részt vehet a motoros kérgi térképek deefferentáció (nervus facialis átvágás) utáni gyors átrendezõdésében.

Kísérleteink célja a következõ három fõ kérdéscsoport megválaszolása volt:

(1) Hogyan válaszol az idegrendszer egy-egy szenzoros bemenetének újszülöttkori elvesztésére, s a változások hogyan nyilvánulnak meg a viselkedés szintjén? Van-e valamilyen kompenzáló mechanizmus, mely pótolja az újszülöttkorban kiesett szenzoros rendszert? Ha igen, akkor hol és milyen mechanizmus révén nyilvánulnak meg ezen kompenzációs folyamatok?

(2) Milyen hatása van a felszálló kolinerg moduláló rendszernek a barrelkérgi neuronok kiváltott aktivitására?

(3) Jelen van-e a felnõtt motoros kérgen a szomatoszenzoros információ? Ha igen, akkor milyen jellemzõi vannak és honnan származik? Szerepe lehet-e a felnõtt motoros kéregben a motoros ideg átvágása után megfigyelt gyors funkcionális reorganizációban?

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti állatok, magatartási kísérletek

A kísérletekhez felnőtt (200-300 g) hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A magatartási kísérletek zajtalan szobában kétnaponta történtek. Az állatoknak át kellett futniuk egy "T" labirintuson, melynek végén ételjutalom volt elhelyezve. A kísérleti napokon a futtatások előtt 12 órás táplálékmegvonás történt. Az állatok egyik fő csoportján újszülöttkori (neonatális) és felnőtt kori szomatoszenzoros deprivációt (kétoldali vibrisszanyírást), míg a másik fő csoporton neonatális enukleációt (szemeltávolítást) hajtottunk végre. A beavatkozások hatásait intakt kontroll állatok ellenében vizsgáltuk (I/1-2; III/1).

Elektrofiziológiai kísérletek

Az állatokat uretán ill. xilazin-rompun keverékével intraperitoniálisan altattuk. Kísérleteinkben konvencionális extracelluláris elektrofiziológiai módszerrel tanulmányoztuk az elsődleges szomatoszenzoros és motoros kéreg sejtjeinek kiváltott aktivitását: kontrollált mechanikus szőringerlésre, ill. a talamikus posteriomedialis és ventrolateralis (Po, VL) magvak és a bajuszpárna (vibrisszapad) elektromos ingerlésére. A farmakológiai munkában nyomás injekcióval (pressure microinjection) egy - a regisztráló elektróda mellé ragasztott - letört hegyű, üveg mikroelektródából bocsátottuk a vizsgált kolinerg drogokat a tanulmányozott sejtek közelébe (I/2-4; II/ 2; III/1-3; IV/1-3; V/1).

Sejtjelölés, hisztotechnika

A motoros kérgi sejtek anatómiai azonosítása érdekében, a stabil juxtacelluláris elvezetés létrejötte után (Pinault 1996) Neurobiotint iontoforetizáltunk a regisztráló extracelluláris mikroelektródából. Az állatokat 5-8 órás túlélési idő elteltével 4% paraformaldehidet és 0.5% glutáraldehidet tartalmazó fixáló folyadékkal transzkardiálisan

perfundáltuk. A fixált agyakból kriosztáttal 40 μm vastag metszetek készültek. Az antitesttel (Vectrastain) és kromogénnel (DAB) alkotott reakcióterméket Ni-intenzifikációval erősítettük meg (II/2; III/2-3; IV/3; V/1).

Az adatok gyűjtése, kiértékelése

A magatartási kísérletekben a normál, a denervált valamint a deprivált állatok futási teljesítményeit statisztikailag Mann-Whitney kettes teszttel hasonlítottuk össze. Az elektrofiziológiai vizsgálatok során a regisztrációt és az azt követő off-line kiértékelést pClamp6.0.3 software segítségével végeztük. A sejtaktivitásból poststimulus timehistogramokat készítettünk (PSTH). A kísérleti adatok grafikai ábrázolását és statisztikai próbáját (T-teszt) Origin4.1 programmal végeztük. A sikeresen jelölődött és beazonosított sejtek teljes dendritarborizációját camera lucida segítségével rajzoltuk le (I/1-4; II/1-2; III/1-3; IV/1-3; V/1-3).

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

(1) A születésüktől fogva folyamatos bajusznyíráson átesett állatok labirintusbeli futási ideje számos kísérleti napon jobb volt a felnőtt korban nyírt állatok teljesítményénél. Ugyanakkor ezen állatok teljesítménye a kísérletsorozat első felében még a kontroll (teljesen intakt, felnőtt) állatok futási idejét is szignifikánsan felülmúlta (I/1).

A neonatálisan enukleált állatok térbeli tájékozódó képessége szignifikánsan jobb volt a kontrollokéhoz képest, mely más szenzoros rendszer(ek)ben bekövetkezett (túl)kompenzációra utalt (cross-modal hatás). Minden állat bajuszszőrének levágása után a korábban jól futó vak állatok eredménye a kontroll állatok teljesítménye alá csökkent. E jelenség a szomatoszenzoros rendszer döntő szerepére utalt a cross-modal kompenzációban. Az elektrofiziológiai vizsgálatok sejtszinten mutatták a szomatoszenzoros rendszer azon változásait, melyeket a neonatális enukleáció váltott ki. A vak állatok egyes barreljeiben a sejtek receptív mezője (azon bajuszszőrök száma, amelyekre a sejt válaszol) nőtt meg. Ugyanakkor ezen állatok más barreljeiben elhelyezkedő sejtek irányszelektivitása (bizonyos térbeli irányban történő ingerlés preferált volta a többihez képest) lett nagyobb (I/2; II/1).

(2) A kolinerg muszkarinos agonisták applikációja a legtöbb esetben megnövelte a korábban gyenge kiváltott aktivitást. Ennél fontosabb megfigyelés volt azonban az, hogy a vizsgált anyagok képesek voltak a kiváltott aktivitás latenciafüggő modulálására: a rendszerint 2-4 spike-ból álló válaszoknak az esetek túlnyomó többségében mindig csak egy latenciakomponense változott (nőtt ill. csökkent) (I/3-4; IV/1-3).

(3) Vizsgálataink szerint a motoros kéreg deefferentációja nagyon rövid idő alatt kérgi plasztícitást (a reprezentációs mintázat átrendeződése) eredményez. Felmerült a kérdés, hogy az elsődleges motoros kéreg milyen úton "értesül" efferens idegének átvágásáról. Vizsgálataink is bizonyították, hogy az elsődleges szomatoszenzoros és motoros rendszer szoros, kölcsönös kapcsolatban áll egymással. Ezen kapcsolatok elemzése az alábbi megállapításokat eredményezte. A vibrisszák mechanikus ill. a vibrisszapad elektromos ingerlése során a regisztrált motoros kérgi sejtek harmadánál tapasztaltunk rövid latenciájú (11.21 ms) szomatoszenzoros aktivitást. Az aktivitás asszociatív eredetére utalt a kiváltott

sejtek alacsony frekvenciakövetési képessége, kérgi bilaminárís eloszlása és a megfigyelt válaszoknak az ipszilaterális szomatoszenzoros kéreg funkcionális aktivitásától való függése. Az elsődleges és a másodlagos szomatoszenzoros kéreg teljes léziója után a motoros kérgen a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok az eredeti érték 10%-a alá csökkentek. A transzmisszióban esetlegesen részt vevő talamikus magvakban (Po, VL) a kiváltott aktivitás latenciája hosszabb volt a motoros kérgen megfigyelt latenciáknál. Az anatómiai vizsgálatok a kiváltott sejtek piramissejt-voltát mutatták (II/2; III/2-3; IV/3; V/1).

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A korai szenzoros depriváció a talamokortikális afféreneseknek egy szélesebb projekcióját, nem csak a megfelelõ barrelbe történõ terminációját okozta. Mindezek alapján a nyírt szõröknek megfelelõ barrelekben elhelyezkedõ sejtek receptív mezõje megnõtt, iránynszelektivitásuk csökkent, s nagyobb spontán aktivitással rendelkeztek. Az irodalomban nagyon kevés adat áll rendelkezésre a bajusznyírás által kiváltott és a viselkedés szintjén megnyilvánuló változásokról. Kísérleti adatainkat a korai szenzoros depriváció által más szenzoros rendszerekben indukált kompenzációs mechanizmusokkal (cross-modal hatás) magyaráztuk, mely az állatok orientációs teljesítményében nyilvánult meg (I/1-2).

A korai szenzoros denerváció által más szenzoros rendszerben történõ kompenzáció morfológiai bizonyítéka Asanumatól származik. Egérben neonatális enukleáció hatására a ventroposteriomedialis nucleus afferenseinek szegregációjában módosulás történik: a szomatoszenzoros afferensek szórványosan megjelennek a corpus geniculatum laterale-ban, mely struktúrának normál állatban kizárólag vizuális bemenetei lehetnek. A legerõsebb vetülés a fenotípusosan vak és lézionált látókérgû állatokban volt megfigyelhetõ. Válaszul a korai szenzoros denervációra, a talamikus afferensek projekciói kiterjedt reorganizáción mennek keresztül, nem specifikus struktúrákat véve célba. Ennek megfelelõen neonatálisan enukleált állatokban az elsõdleges és a másodlagos látókérgen szomatoszenzoros aktivációt írtak le autoradiográfiás analízissel és a felszíni kiváltott potenciálok szintjén. A potenciálok latenciája rövidebb volt a vizuális válaszokénál, és kollíziós teszt bizonyította az eltérõ modalitású válaszok generálásában részt vevõ sejtcsoportok részbeni ill. teljesen azonos voltát. A patkány látókérgén mechanikus vibrisszaingerlésre erõteljes "on" és "off" válaszokat adó sejtek voltak regisztrálhatók, mely jelenség a korai enukleáció által kiváltott, a látó- és a szomatoszenzoros kéreg között létrejövõ cross-modal hatás sejtszintû bizonyítéka. A neonatálisan enukleált állatok vibrisszái a tapasztalat szerint megnövekednek. A neonatálisan enukleált macskák normál társaiknál lényegesen jobb hanglokalizációval rendelkeznek. Denervációs kísérletsorozatunk eredményeit összegezve elmondhatjuk, hogy a neonatális enukleáció kompenzáló mechanizmusokat indít el a szomatoszenzoros rendszerben (cross-modal hatás), mely változások megnyilvánulnak mind az állatok viselkedésében, mind a barrelkéreg sejtjeinek megváltozott tulajdonságaiban (receptív

mezõ, irányszelektivitás) (I/2; III/1).

A szomatoszenzoros kéreg mûködésének modulálásában alapvetõ jelentõséggel bíró kolinerg rendszer vizsgálata után érthetõbb a problémával foglalkozó irodalom sokfélesége, az eredmények heterogén volta. Vizsgálataink alapján kiderült, hogy a kolinerg aktiváció ugyanazon sejten ellentétes hatást is kiváltott; a hatás kimenetele nagyban függött az érintett sejt funkcionális állapotától (az on és off válaszok valamint a preferált-nem preferált irányba történõ hajlításra adott válaszok eltérõ modulációja). A kolinerg modulációra vonatkozó kísérleteink tanulságaként elmondhatjuk, hogy hozzájárultak a kérdésfeltevések pontosításához és a jelenség világosabb megértéséhez (I/3-4; IV/1-2).

A patkány bajuszszõr-izmait beidegzõ faciális ideg egyik oldali átvágása után 5 percen belül a deefferentált motoros kéreg ingerlése egy alternatív szomatotópikus térkép megjelenését fedi fel. A megfigyelt ipszilaterális vibrisszamozgások, melyek latenciája 2-3 ms-al volt hosszabb a kontralaterálisokéinál, kiválthatók voltak normál állat motoros kérgi felszínének picrotoxinos (GABA antagonista) applikációjával is. Ez a transzkallózális axonok denervációt követõ diszinhibícióját sugallja. A felnõtt motoros kéreg e megfigyelt rendkívül gyors reorganizációjában a tapasztalt rövid megjelenési idõ miatt csak már meglévõ szinaptikus kapcsolatban álló elemek vehetnek részt. Elektrofiziológiai és anatómiai módszerrel jellemeztük a felnõtt vibrisszális motoros kérgen jelenlévõ szomatoszenzoros információnak - mint egy, az adott terület plasztikus folyamataiban esetlegesen részt vevõ elemnek - eredetét és tulajdonságait. Kísérleteink bizonyították, hogy a patkány motoros kérgén jelenlévõ erõteljes szomatoszenzoros aktivitás nagy része (de az sem kizárható, hogy teljes egésze) az ipszilaterális szomatoszenzoros kéregrõl származik, és valószínûleg részt vesz az érintett kéregrész felnõtt kori plasztikus folyamataiban (II/2; III/2-3; IV/3; V/1).

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

I. Az értekezésben tárgyalt közlemények

1 Völgyi, B., Farkas, T. and Toldi, J., Compensation of a sensory deficit inflicted upon newborn and adult animals. A behavioural study, Neuroreport., 4 (1993) 827-829.

2 Toldi, J., Farkas, T. and Völgyi, B., Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study, Neurosci. Lett., 167 (1994) 1-4.

3 Farkas, T., Kóródi, K. and Toldi, J., Stimulus-dependent muscarinic effects on evoked unit activity in the rat barrel cortex, Neurosci. Lett., 212 (1996) 1-4.

4 Farkas, T., Kóródi, K. and Toldi, J., Muscarinic cholinergic effects on stimulus-evoked responses in rat primary somatosensory cortex. An electrophysiological study, Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 47(2-4) (1996) 247-252.

II. Az értekezésben nem tárgyalt ill. megjelenés alatt álló közlemények

1 Farkas, T., Rojik, I., László, F., Varga, Cs. and Toldi, J., Neuroplastic effects of neonatal capsaicin on barrel cortex of adult rat. An electrophysiological and autoradiographic study, Eur. J. Neurol., 4 (1997) 1-7.

2 Farkas, T., Kiss, Zs., Toldi, J. and Wolff, J. R., Activation of the primary motor cortex by somatosensory stimulation in adult rats is mediated mainly by associational connections from the somatosensory cortex, Neuroscience (submitted)

III. Az értekezés témájához kapcsolódó külföldi kongresszusok absztraktjai:

1 Toldi, J., Farkas, T., Völgyi, B. and Rojik,I., Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of the rat, 29.10 in Abstracts of the 17th AnnualMeeting of the European Neuroscience Association, Vienna, Austria, 4-8 September 1994

2 Farkas, T., Toldi, J. and Wolff, J. R., Contralateral vibrissa-pad stimulation drives unit activity in the vibrissa-field of the rat primary motor cortex, 615 in Abstracts of the 25th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, Germany, 22-25 May1997

3 Farkas, T., Landgrebe, M., Toldi J. and Wolff J. R., Opening of an alternative somatotopic map in the vibrissal motor cortex of adult rats within minutes after facial nerve transection: What is the signal path? 26th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, Germany, 27-29 March 1998 (submitted)

IV. Az értekezés témájához kapcsolódó hazai kongresszusok absztraktjai:

1 Kóródi, K., Farkas, T., Rojik, I. and Toldi, J., Angular selectivity studies in the barrel cortex of the rat, 2nd Congress of MITT, Szeged, Hungary, 26-28 January 1995

2 Kóródi, K., Farkas, T., Rojik, I. and Toldi, J., Cholinergic modulation of the evoked responses of the rat barrel cortex, 3th Congress of MITT, Balatonfüred, Hungary, 25-27 January 1996

3 Farkas, T., Toldi, J. and Wolff, J. R., Neuronal plasticity induced in the somato-motor cortex of adult rat, Meeting of the Hungarian Physiological Society and the Romanian Society of Physiological Sciences, Szeged, Hungary, 30 June-2 July 1996

V. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások:

1 Toldi, J., Farkas, T. and Wolff, J. R., Denervation induced plastic changes in the somatosensory and motor cortices of rat, 5th Congress of MITT, Debrecen, Hungary, 21-24 January 1998 (submitted)

2 Négyessy, L., Toldi, J., Farkas, T., Kóródi, K., Páli, J. and Gál, V., The role of rearrangements of the connections between the cortex and thalamus in cross-modal compensations induced by early postnatal enucleation of rats, 5th Congress of MITT, Debrecen, Hungary, 21-24 January 1998 (submitted)

3 Páli, J., Gál, V., Toldi, J., Farkas, T., Kóródi, K. and Négyessy, L., Morphological investigations of the vibrissal trigeminal system following single follicle denervations in rat, 5th Congress of MITT, Debrecen, Hungary, 21-24 January 1998 (submitted)