Morfološka i kemijska obilježja kalretininskih neurona u neokorteksu primata

Džaja, Domagoj

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:236022

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Domagoj Džaja

Morfološka i kemijska obilježja kalretininskih neurona u neokorteksu primata

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neuromorfometriju Odsjeka za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za neuroanatomiju Medicinskog fakulteta La Timone Sveučilišta Aix Marseille (Institut de Neurosciences des Systèmes - INSERM UMR 1106).

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Zdravko Petanjek

Prvo se želim zahvaliti dr. Monique Esclapez koja mi je, svojim pristupom profesionalne brižnosti, omogućila metodološko usavršavanje te profiliranje kritičkog mišljenja u svom laboratoriju, laboratoriju obilježenom iznimnom kvalitetom rada i kvalitetom međuljudskih odnosa. Iako to možda nije bila de iure, dr. Esclapez je suštinski, uz profesora Petanjeka, zaista bila moj mentor.

Svojem mentoru, prof.dr.sc. Zdravku Petanjeku, zahvaljujem se na ukazanom povjerenju koje mi je omogućilo prve korake profesionalnog usmjeravanja, na strpljivosti i požrtvovnom radu, te dobronamjernim i korisnim savjetima koji su bili najvažniji za uspješan završetak ovog projekta.

Zato što su našu poslovnu svakodnevnicu kroz niz godina činili mnogo vedrijom, zahvaljujem se dr.sc. Sanji Darmopil, dr.sc. Nataši Jovanov-Milošević, dr.sc. Željki Krsnik, dr.sc. Sanii Kuzmac te dr. Goranu Ivkiću.

Ponajviše, zahvaljujem se svojoj obitelji na trajnoj, nesebičnoj i upravo monumentalnoj potpori u svim mojim stremljenjima. Oni su svoja djela zaustavili u mom djetinjstvu, kao trajne orijentire odrastanja. Oni su vjerovali u moje ciljeve, oni su podržavali moje puteve. Upravo stoga, ovaj rad posvećujem svojim roditeljima Koraljki i Zlatku, bakama Biserki i Olgi te djedovima Anti i Josipu.

Nanos gigantum humeris insidentes

Financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost

IP-11-2013-5943

COGNITIVECIRCUIT

Eksperimentalni postupci, analiza preparata i troškovi izrade ove disertacije u potpunosti su financirani sredstvima Hrvatske zaklade za zaklade za znanost, istraživački projekt HRZZ5943 – „Neuralna osnova viših kognitivnih funkcija“, voditelj prof.dr.sc. Zdravko Petanjek, koji se provodi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Opća klasifikacija kortikalnih neurona 4

1.2 Klasifikacija GABA-ergičkih neurona 6

1.3 Promjene u organizaciji neuralne mreže kore velikoga mozga u primata 11

1.4 Funkcionalna svojstva kalretininskih neurona 14

1.5 Funkcionalna i strukturna obilježja prefrontalnog korteksa u primata i homologna područja kod štakora 20

2. HIPOTEZA 29

3. CILJEVI RADA 30

4. MATERIJALI I METODE 31

4.1 Uzorak korišten u histološkoj analizi 31

4.2 Priprema tkiva za histološku analizu 32

4.3 Histološki i imunohistokemijski postupak 32

4.4 Stereološki postupak 34

4.5 Statistička analiza 38

4.6 Postupak ubrizgavanja i identifikacije virusa bjesnoće 43

5. REZULTATI 44

5.1 KVALITATIVNA ANALIZA 44

5.1.1 Citoarhitektonska obilježja i delineacija polja za kvantitativnu analizu 44

5.1.1.1 Medio-orbitalno polje u štakora 44

5.1.1.2 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u majmuna 48

5.1.1.3 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u čovjeka 52

5.1.2 Obilježja aferentnih projekcija medio-orbitalnog polja u štakora 56

5.1.3 Stanična organizacija kortikalnih polja 75

5.1.3.1 Medio-orbitalno polje u štakora 75

5.1.3.2 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u majmuna 80

5.1.3.3 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u čovjeka 83

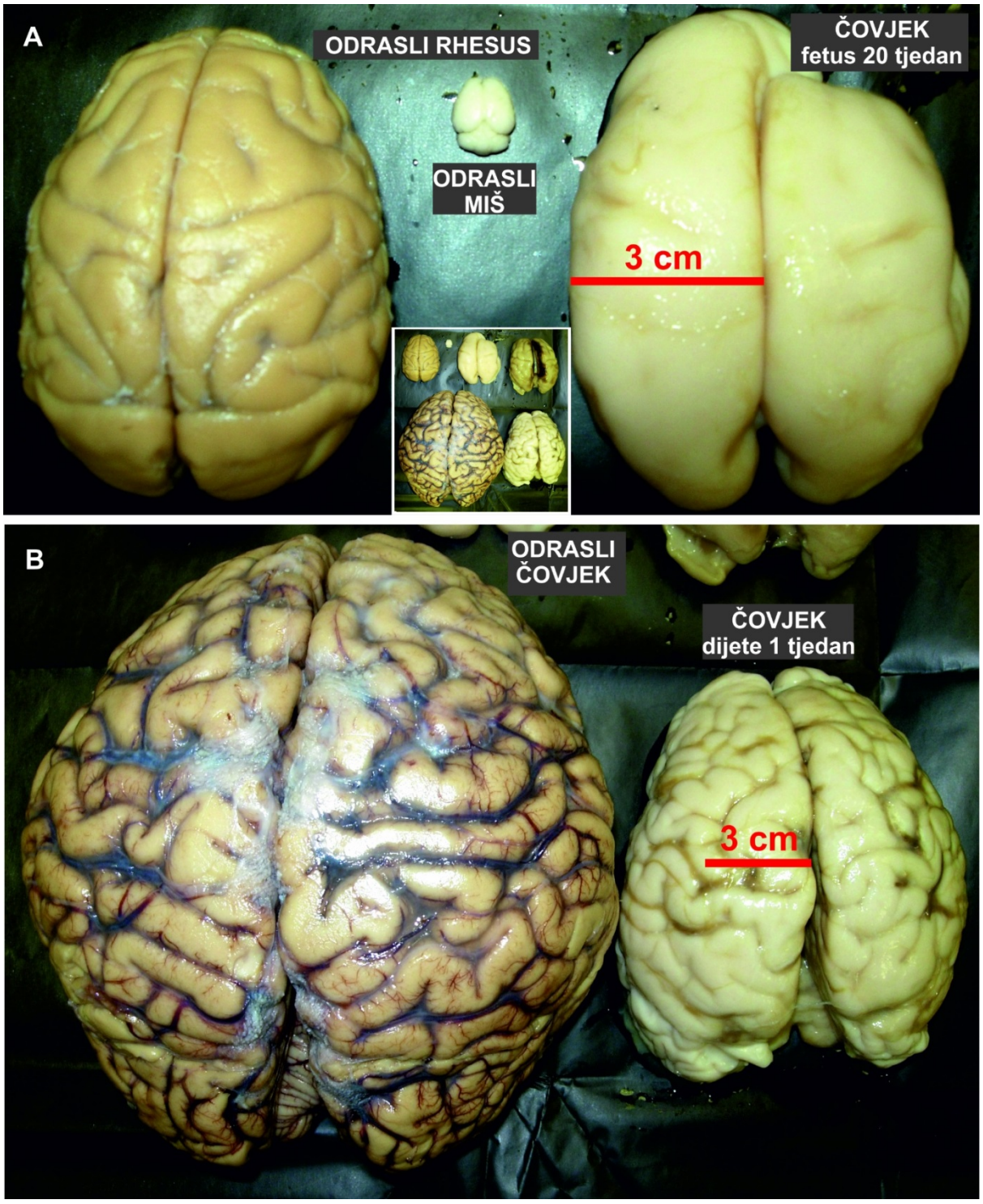
5.2 KVANTITATIVNA ANALIZA 87
5.2.1 Prikaz podataka po pojedinoj vrsti 87
5.2.1.1 Medio-orbitalno polje u štakora 87
5.2.1.2 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u majmuna 92
5.2.1.3 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u čovjeka 98
5.2.2 Usporedba podataka između vrsta 104
5.2.2.1 Promjene volumena slojeva, ukupnog broj neurona i gustoće neurona između analiziranih vrsta 104
5.2.2.2 Promjene udjela, broja i distribucije kalretininskih neurona između analiziranih vrsta 115
5.2.2.3 Razlike u tendenciji promjena kalretininskih neurona i ukupnog broja neurona između kortikalnih slojeva 122
6. RASPRAVA 126
6.1 Metodološka ograničenja u komparativnim studijama organizacije neuralne mreže kore velikoga mozga 126
6.2 Zajednička obilježja i razlike neuralne strukture medio-orbitalnog polja u štakora i polja 14c u majmuna i čovjeka 128
6.3 Promjene u udjelu kalretininskih neurona 132
6.4 Primjenjivost podataka o povećanju proporcije kalretininskih neurona na ostala kortikalna područja 134
6.5 Funkcija kalretininskih neurona u neokortikalnoj mreži 137
6.5.1 Morfološka i elektrofiziološka svojstva kalretininskih interneurona 137
6.5.2 Prostorna distribucija sinapsi na piramidnom neuronu 138
6.5.3 Hipoteza o ulozi kalretininskih interneurona u neokortikalnoj mreži 140
7. ZAKLJUČCI 143
8. SAŽETAK 145
9. SUMMARY 146
10. POPIS LITERATURE 147
11. ŽIVOTOPIS 155

Popis kratica:

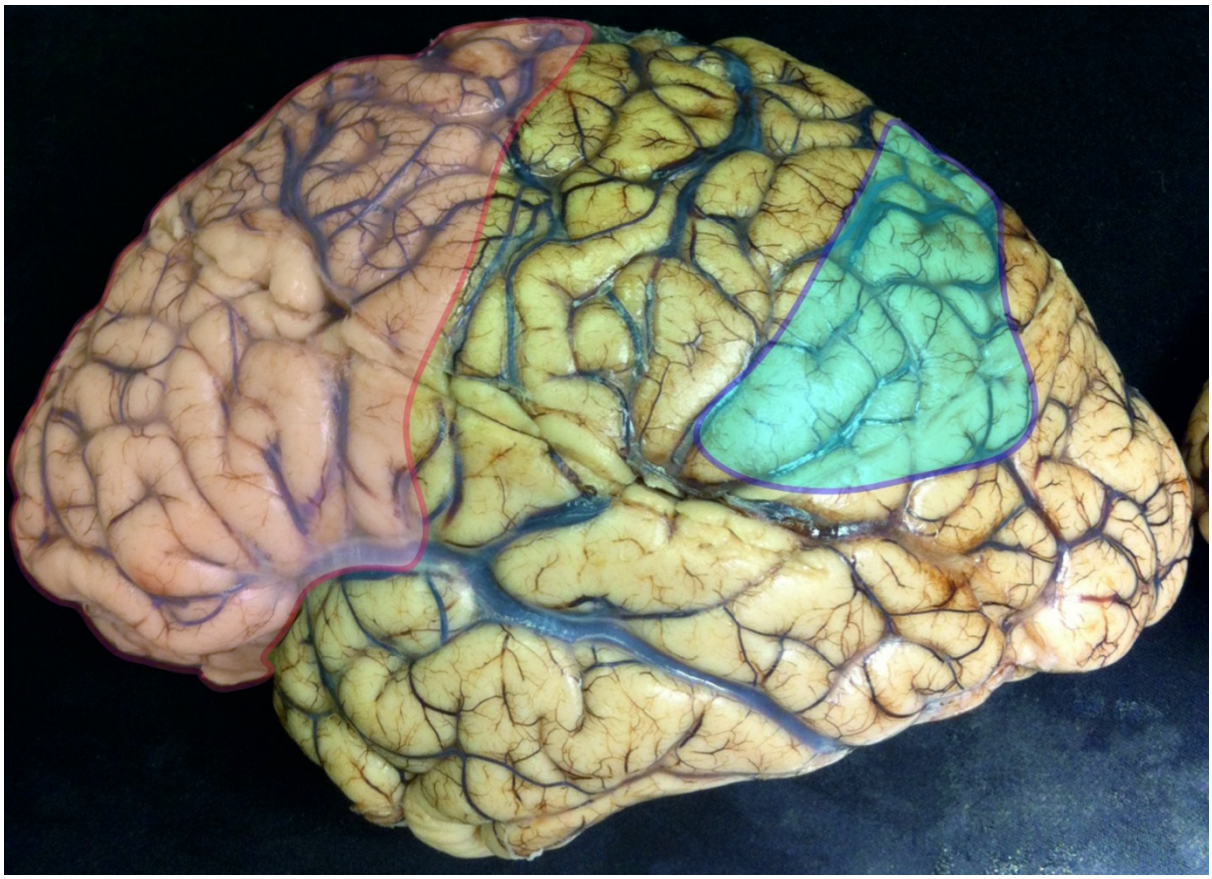
Amy	amigdala
CaBP	kalcij vežući protein
CB	kalbindin
CC	corpus calosum
Cg	cingularno
CM	centro-medijalni
CR	kalretinin
En	endopedunkularna
EPSP	ekscitacijski postsinaptički potencijal
GABA	gamma-amino-maslačna kiselina
Hyp	hipotalamus
IL	infralimbičko
KPBS	kalijev fosfatni pufer
MD	medio-dorzalni
MO	medio-orbitalno
NeuN	neuralni nuklearni antigen
NGS	normalni kozji serum
NHS	normalni konjski serum
nigra	nucleus niger
nNOS	sintetaza dušičnog monoksida
NPY	neuropeptid Y
PAG	periakveduktalna siva tvar
PB	natrijev fosfatni pufer
PL	prelimbičko
PL	piramidni sloj
POA	preoptičko područje
PrL	prelimbičko
RNA	ribonukleinska kiselina
Sept	septum
SOM	somatostatin
Th	talamus
VA	ventro-anteriorni
VO	ventro-orbitalno
WM	bijela tvar

1. UVOD

Struktura neuralne mreže kore velikoga mozga predstavlja temelj kognitivnih potencijala, psiholoških funkcija koje se posebno usložnjavaju tijekom evolucije sisavaca (1). Izrazito povećanje broja neurona (Slika 1-1) i njihovih međusobnih veza nužno je za pojavu jezika, govora i matematičkih vještina, omogućava kompleksnu modulaciju afektivnog odgovora, otvara mogućnost mentaliziranja, te u konačnici omogućava visoku razinu kognitivne fleksibilnosti i radne memorije (1, 2). Međutim, čak niti eksponencijalno povećanje broja neurona ne bi omogućilo ovakve kognitivne pomake, a da se paralelno ne mijenja i sam ustroj neuralne mreže. Kvantitativne promjene nisu linearne, te se najviše povećava broj neurona u multimodalnim asocijativnim kortikalnim područjima (Slika 1-2), a pojavljuju se i nova kortikalna polja specifične citoarhitektonske građe i specifičnih funkcionalnih svojstava (3). Osim toga, u samom unutarnjem ustroju ne dolazi do linearnog povećanja svih neuralnih elemenata, te su neki opisani samo u kori velikoga mozga čovjeka (4). Sve ovo ukazuje kako ustroj korteksa postaje kod čovjeka suštinski drugačiji od bilo koje druge vrste.



Slika 1-1: Usporedba veličine mozga miša, majmuna i čovjeka. Dorzalni pogled na mozak odraslog miša (A), rhesus majmuna (A), i ljudskog mozga (B), kao i fetalnog ljudskog mozga sredinom (A) i po završetku trudnoće (B). Vidljivo je kako veličina ljudskog mozga već sredinom trudnoće doseže veličinu odraslog mozga rhesus majmuna. Istovremeno, odrasli mozak rhesus majmuna je otprilike stotinu puta veći od mozga odraslog miša. (B) Mozak odrasle osobe je tri do četiri puta veći od mozga novorođenčeta, koji ima veličinu mozga odrasle čimpanze. Obrazac girifikacije mozga ljudskog novorođenčeta sličan je onom u odraslom mozgu. Slika modificirana prema Hladnik, Džaja i sur. 2014, Frontiers in neuroanatomy 8:50 (107).



Slika 1-2: Slika prikazuje odrasli ljudski mozak s označenim općim (multimodalnim) asocijativnim područjima. U čovjeka ovaj tip kore predstavlja gotovo polovicu ukupne kortikalne površine, a koji zauzima 80% čeonog režnja (crveno), a ostatak zauzima tjemeni i rubne dijelove sljepoočnog i zatiljnog režnja (plavo). Slika modificirana prema Hladnik, Džaja i sur. 2014, Frontiers in neuroanatomy 8:50 (107).

1.1 Opća klasifikacija kortikalnih neurona

Dvije su osnovne skupine neurona kore velikoga mozga: glutamatergički ekscitacijski i GABA-ergički inhibicijski neuroni (5-7). Za glutamatergičke neurone se najčešće koristi sinonim piramidni neuroni (8-11), jer većina ima tijelo u obliku stošca s vrhom okrenutim prema pijalnoj površini te bazom okrenutom prema bijeloj tvari. Od vrha tijela polazi dendriti koji debljinom odskače od svih ostalih i usmjeren je okomito u odnosu na pijalnu površinu. Kod piramidnih neurona infragranularnih slojeva (slojevi V i VI) apikalni se dendrit najčešće podijeli na dvije grane koje nastavljaju istim tijekom prije nego se završno razgranaju kroz slojeve I i II. Kod piramidnih neurona supragranularnih slojeva glavna grana se najčešće ne dijeli, ali se također završno razgranjuje kroz slojeve I i II. Od glavne grane apikalnog dendrita, uglavnom u početnim dijelovima (prvih 200μm), pod oštrim kutom izlaze tanke grane, takozvani postranični – kosi dendriti. Od baze tijela izlazi nekoliko (najčešće 4-6) približno simetričnih dendrita koji su, ovisno o laminarnom smještaju piramidnih neurona, usmjereni prema lateralno i dolje te se bogato razgranjuju.

Dendriti piramidnih neurona prekriveni su dendritičkim trnovima. Akson im je usmjeren prema bijeloj tvari i projicira se u druga područja kore velikoga mozga (kortiko-kortikalne projekcije) ili druge strukture središnjeg živčanog sustava (kortiko-subkortikalne projekcije). Neurotransmiterska svojstva (glutamat-ekscitacija), prisutnost trnova i akson koji napušta strukturu, zapravo su svojstva koja obilježavaju ovu populaciju neurona. Naime, značajan dio njih odstupa od pravilnog oblika karakterističnog za tipični piramidni neuron te bi ih najtočnije bilo definirati kao glutamatske/ekscitacijske trnaste projekcijske neurone. Tako recimo populacija ovih neurona u sloju II ima apikalni dendrit koji se odmah razgrana te stoga ima zvjezdastu dendritičku morfologiju. Mnogi piramidni neuroni sloja V imaju asimetrično bazalno dendritičko stablo, s jednim izraženijim bazalnim dendritom. Apikalni dendrit kod nekih nije toliko dominantan i ne seže do pijalne površine niti ima bogato terminalno razgranjenje. U sloju V se mogu u nekim područjima uočiti piramidni neuroni sa specifičnim morfološkim svojstvima, kao što su gigantske Betzove piramide u primarnom motornom, Meynertove u primarnom vidnom korteksu te posebno zanimljive von Economo stanice koje nalazimo samo u prednjem cingularnom i inzularnom području čovjeka i nekih čovjekolikih majmuna (12, 13). U sloju VI prevladavaju trnasti projekcijski neuroni koji nemaju stožasto tijelo, već im je tijelo bipolarnog oblika te se i prema pijalnoj površini i prema bijeloj tvari proteže po jedan izraženi dendrit. Ovdje također nalazimo i multipolarne oblike trnastih neurona.

Stoga je predloženo da se svi ovi neuroni klasificiraju kao modificirani piramidni neuroni (14), a tu bi se ubrojio i dio piramidnih neurona koji prolazi morfološku transformaciju tijekom razvoja; nakon što poprime oblik tipične piramide, dolazi do povlačenja apikalnog dendrita i povlačenja glavne grane aksona koji napušta korteks. Ovo se događa kod glutamatskih neurona koji izgrađuju sloj IV (5, 15, 16). Tako ovi neuroni imaju zvjezdasto razgranate dendrite prekrivene trnovima (eng. „spiny stellate cells“) te nisu projekcijski jer akson uspostavlja sinapse samo lokalno unutar dijela kore gdje su smješteni i ne odlazi u bijelu tvar. Ovdje treba spomenuti da gotovo svi piramidni neuroni dodatno posjeduju i povratne, kolateralne grane, koje se razgranjuju neposredno u susjedni korteks. Kod nekih populacija piramidnih neurona (primjerice kod primata veliki piramidni neuroni smješteni u sloju IIIC) lokalno razgranjenje aksona je izrazito bogato te čini i do 80% sinapsi koje akson uspostavlja s ciljnim neuronima (8-11).

U odnosu na drugu glavnu populaciju kortikalnih neurona, koji sintetiziraju inhibicijski neurotransmiter gamma-amino-maslačnu kiselinu (GABA), općenito se uzima da su glutamatergički neuroni pet do šest puta brojniji. Ovaj omjer ovisi o području i vrsti, a posebno su izražene laminarne razlike. Stoga se glutamatergičke neurone često označava i kao „glavne“ neurone (eng. „principal cells“), iako oni nisu toliko heterogena populacija kao GABA-ergički neuroni kojih je značajno manje(17). Njihova heterogenost prisutna je u načinu projekcije aksona i uspostave veza s ciljnim neuronima te u molekularnim i funkcionalnim svojstvima (6, 18). U pravilu, GABA-ergički neuroni imaju akson koji se razgranjuje samo lokalno i pristupa na susjedne kortikalne neurone te se oni za razliku od piramidnih koji su projekcijski, definiraju kao neuroni lokalnih neuralnih krugova. Danas se kao sinonim za kortikalne GABA-ergičke neurone uvriježio i termin interneuroni, iako oni ne predstavlja u strukturnom i funkcionalnom smislu neurone „umetnute“ u glavni neuralni krug. To je slučaj u kralježničnoj moždini gdje su većina inhibicijskih (GABA-ergičkih i glicinskih) neurona u svojstvu interneurona. Osim toga, manji broj kortikalnih GABA-ergičkih neurona posjeduje aksone koji ulaze u bijelu tvar (19, 20) i projiciraju se na udaljene kortikalne ciljeve. Oni najvećim dijelom potječu iz ranih fetalnih funkcionalnih neokortikalnih krugova (21-23).

GABA-ergički neuroni su unutarnji modulatori kortikalne aktivnosti, što postižu izravnom i neizravnom kontrolom prema različitim receptivnim odjeljcima projekcijskih neurona (24). Tako akson pojedinih subpopulacija GABA-ergičkih neurona sinapse stvara dominantno na početnom dijelu aksona, takozvani akso-aksonski neuroni. Oni se zbog specifičnog izgleda aksonskog grananja često nazivaju i „stanice oblika svijećnjaka“ (eng.

„chandelier cells“). Neke pak subpopulacije uspostavljaju sinapse prvenstveno na tijelu i početnim dijelovima dendrita piramidnih neurona, mjestima gdje nema ekscitacijskih sinapsi, već su gusto prekriveni samo inhibicijskim GABA-ergičkim sinapsama. Završni splet aksona oko tijela ima specifičan izgled pa se ovi neuroni često nazivaju košarasti neuroni (eng. „basket cells“). Neke subpopulacije se prvenstveno projiciraju prema središnjim i distalnim dijelovima dendritičkog stabla piramidnih neurona, mjestima gdje dominiraju ekscitacijske glutamatske sinapse koje se većinom nalaze na dendritičkim trnovima koje GABA-ergički neuroni u pravilu ne inerviraju.

Subpopulacije GABA-ergičkih neurona koje se projiciraju na dendrite piramida često pokazuju specifičnu morfologiju dendritičkog i aksonskog stabla na temelju koje ih klasificiramo. Tako se dendriti nekih neurona granaju kolumnarno jednim stablom kroz supragranularne, a drugim kroz infragranularne slojeve. Stoga ih nazivamo bipolarno razgranate stanice tj. stanice s dva čuperka, eng. „bitufted cells“, gdje posebnu vrstu čine stanice kojima se i akson razgranjuje na takav način, eng. „double bouquet“. Double bouquet neurone prvo je opisao Ramon Cajal u ljudskom korteksu (25), a potom su pronađeni i u korteksu majmuna, gdje su prozvani „stanice sa aksonom nalik na konjski rep“ (26). Neke subpopulacije imaju dendritičko razgranjenje koje nalikuje razgranjenju glije, pa ih nazivamo neurogliaformne stanice (6). Dio kortikalnih GABA-ergičkih neurona se isključivo projicira na druge GABA-ergičke neurone. Ovdje treba uočiti kako je konačan učinak ovih neurona na piramide zapravo disinhibicija, što je različito od GABA-ergičkih neurona koji piramide kontaktiraju izravno (27).

1.2 Klasifikacija GABA-ergičkih neurona

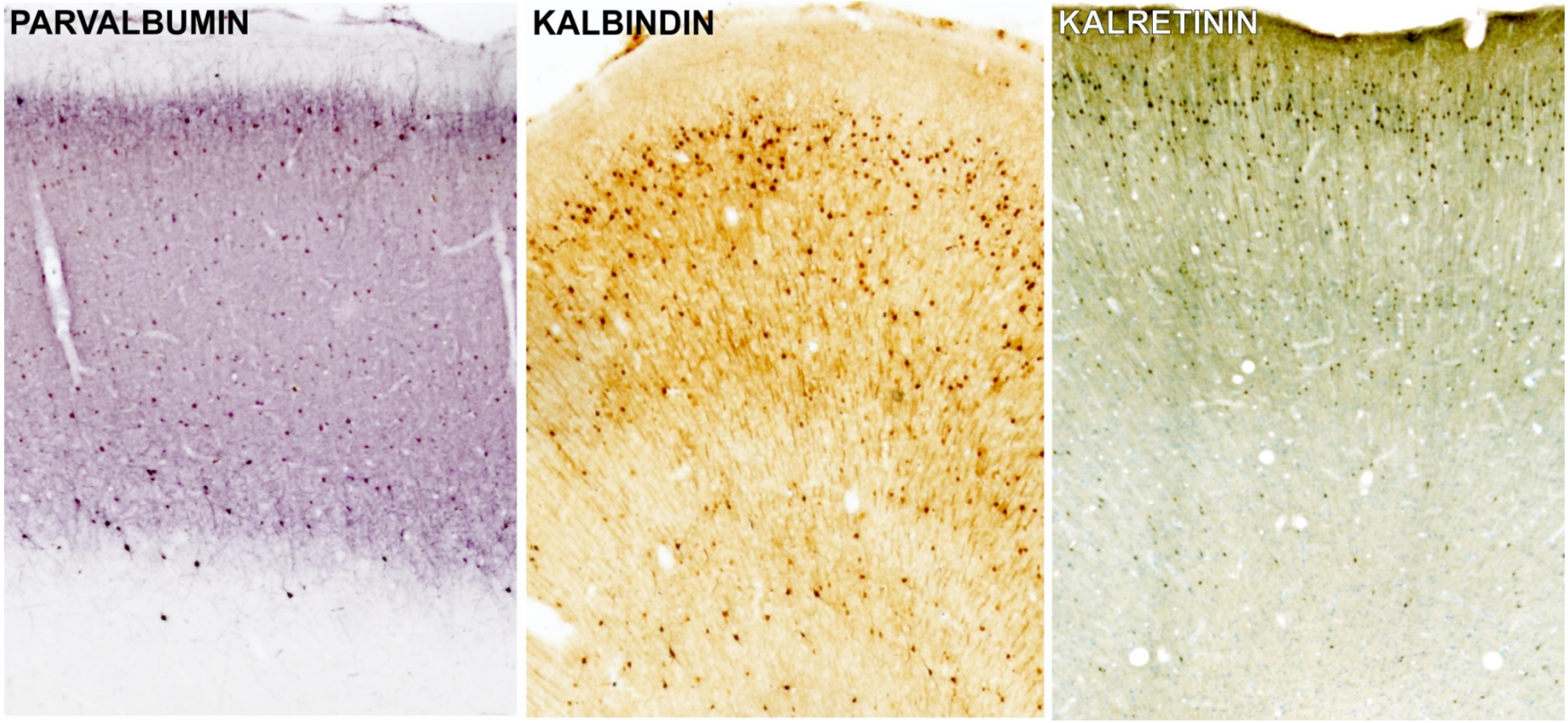
Osnovna podjela GABA-ergičkih neurona temelji se na projekciji njihovih aksona (17, 28), ali se oni dalje klasificiraju u podskupine na temelju svojih vrlo heterogenih elektrofizioloških svojstava (6, 16, 29). Heterogenost je prisutna i u ekspresiji molekularnih biljega. Klasifikacija na temelju ekspresije određenih molekularnih biljega je s druge strane vrlo korisna jer omogućava jednostavan način analize regionalnih i laminarnih razlika u distribuciji i porijeklu, uključujući i velike razlike do kojih dolazi tijekom evolucije. Visoka razina ekspresije jednog od tri kalcij-vežućih proteina (CaBP), parvalbumina (PV), kalbindina (CB) te kalretinina (CR) karakteristična je samo za kortikalne GABA-ergičke neurone (Slika 1-3). Više od 80% ovih neurona ima visok stupanj ekspresije jednog od navedeni kalcij-vežućih proteina, bez većeg preklapanja između populacija. Ovo navedene

kalcij vežuće proteine čini prikladnim za identifikaciju glavnih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona (30-38). Pokazalo se da gotovo svi neuroni koji izražavaju kalbindin također izražavaju i neuropeptid somatostatin (SOM). Somatostatin je prisutan u većem broju neurona, jer približno jedna trećina stanica pozitivnih na somatostatin nema prepoznatljivu ekspresiju kalbindina (31, 33, 39, 40). Somatostatinski neuroni predstavljaju dakle širu populaciju kortikalnih GABA-ergičkih neurona koja također uključuje neurone s visokom razinom sintetaze dušičnog monoksida (nNOS) te neurone pozitivne na neuropeptid Y (NPY), od kojih je većina negativna na kalbindin. Ekspresija somatostatina se uglavnom ne nalazi u neuronima koji izražavaju parvalbumin ili kalretinin. Stoga je somatostatin bolje koristiti kod molekularnog obilježavanja jer obuhvaća veći dio spektra GABA-ergičkih neurona, te se uključivanjem somatostatina obilježava više od 90% populacije kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Slika 1-4).

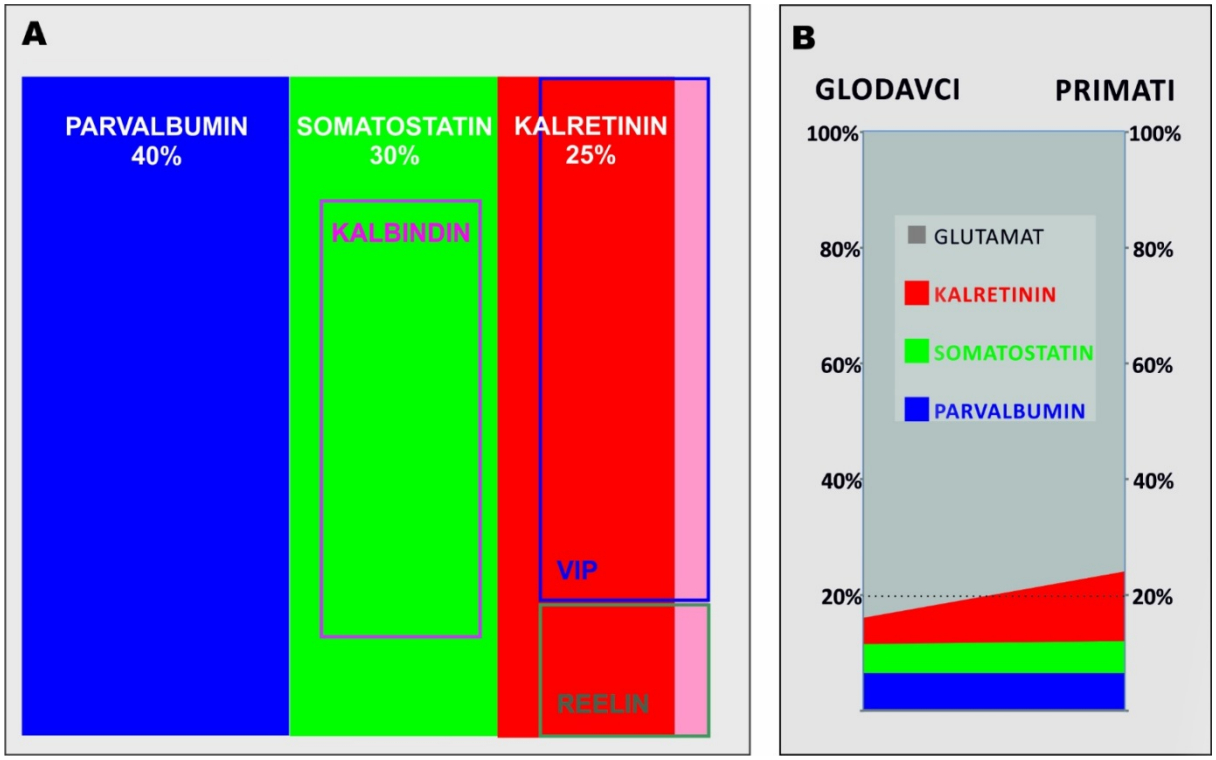
Između navedenih molekularnih biljega i projekcija aksona postoji dobra korelacija. Tako velik dio populacije neurona koji izražavaju parvalbumin akson projicira prema tijelu neurona i proksimalnim dendritima, ali i na inicijalni segment aksona. Neuroni koji izražavaju kalretinin većinom stvaraju sinapse na proksimalnim, a somatostatinski većinom na distalnim dijelovima dendritičkog stabla piramidnih neurona.

Ovakva podjela i korelacija je vrlo okvirna, s obzirom na postojanje regionalnih i laminarnih razlika te razlika između različitih vrsta. Međutim, ova klasifikacija ne uzima u obzir elektrofiziološka svojstva neurona koja su izrazito kompleksna i ne koreliraju jasno s klasifikacijom subpopulacija na osnovi molekularnih i aksonskih svojstava.

Najveći dio istraživanja o svojstvima, distribuciji i porijeklu GABA-ergičkih neurona proveden je na miševima i štakorima. Kod glodavaca su najbrojniji neuroni koji izražavaju parvalbumin s približno 40%, slijede somatostatinski s približno 30%, a najmanje brojni su kalretininski neuroni s približno 25% udjela u populaciji GABA-ergičkih neurona (35, 37, 38). Dio kalretininskih neurona istovremeno izražava i vazoaktivni-intestinalni-polipeptid (VIP)(41) ili reelin (Slika 1-4A). Ipak, neki neuroni izražavaju samo VIP ili reelin te oni najvjerojatnije čine 5-10% ukupne populacije GABA-ergičkih neurona, što odgovara postotku kojega ne obilježava niti jedan od tri glavna markera (36, 41). Novi podaci pokazali su kako oko 30% GABA-ergičkih neurona izražava membranski ionotropni receptor za serotonin – 5HT3a te da to obuhvaća sve neurone koji izražavaju kalretinin, VIP i reelin. Ukoliko bi se to pokazalo primjenjivim na sva kortikalna područja i druge životinjske vrste, svi GABA-ergički neuroni mogli bi se identificirati na temelju ekspresije jedne od tri molekule: 5HT3a receptora, parvalbumina i somatostatina (42).



Slika 1-3: Mikrofotografija prikazuje imunocitokemijske rezove neokorteksa majmuna obrađene protutijelima na tri vrste kalcij vežućih proteina kojima molekularno definiramo tri glavne subpopulacije GABA-ergičkih neurona. Iz zbirke majmunskih mozgova dr. Monique Esclapez, Marseille.



Slika 1-4: Udio glavnih molekularnih subpopulacija unutar cjelokupne populacije kortikalnih GABA-ergičkih neurona u glodavaca (A) te usporedba udjela pojedinih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona unutar cjelokupne neuralne populacije između štakora i primata (B). (A) Shema pokazuje udio pojedinih subpopulacija GABA-ergičkih neurona, gdje je primjetno kako pravalbuminski, somatostatinski te kalretininski interneuroni predstavljaju više od 90% cjelokupne populacije, bez značajnog preklapanja. (B) Shema pokazuje 50%-tni porast udjela kortikalnih GABA-ergičkih neurona između glodavaca (16%) i primata (24%), što je najvećim dijelom odraz trostrukog povećanja kalretininske populacije (prikazana crvenom bojom – rast s 4% kod glodavaca na 12% od ukupnog broja neurona kod primata). Slika modificirana prema Hladnik, Džaja i sur. 2014, Frontiers in neuroanatomy 8:50 (107).

Brojne su studije provedene u različitih vrsta analizirajući udio i laminarnu distribuciju molekularno definiranih populacija GABA-ergičkih neurona (19, 30-35, 37-39, 43-51). Zbog različitih metodoloških pristupa, teško je uspoređivati rezultate ovih studija i stvoriti nedvosmisleni zaključak o postojanju regionalnih i laminarnih razlika unutar jedne vrste ili o razlikama između vrsta (36). Pokušaj da se stvori jedan opći zaključak o udjelu pojedinih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona između različitih funkcionalnih područja, ili opći zaključak o tendenciji evolucijskog pomaka između vrsta, predstavljalo bi pretjerano pojednostavljivanje.

Ipak, rezultati studija koje su analizirale veći broj regija (34, 38) ukazuju na visoku konzistenciju u proporciji i laminarnoj distribuciji različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona. Čini se da je čak i glavni obrazac laminarne i regionalne distribucije visoko očuvan kroz evoluciju sisavaca, ali bez proporcionalnog povećanja svih subpopulacija.

Većina studija provedenih na glodavcima pokazuje kako GABA-ergički neuroni predstavljaju manje od 20% kortikalnih neurona (34, 44, 45, 47, 48, 52-56). Od tri glavne molekularno definirane populacije, najbrojnija populacija su parvalbuminski neuroni, dok su kalretininski najmalobrojniji (31, 33, 35, 37, 47). Za razliku od toga, kod čovjeka kalretiniski neuroni postaju najbrojnija populacija te na njih otpada gotovo polovica od ukupnog broja kortikalnih GABA-ergičkih neurona (32, 46, 49, 57-63). Multimodalna asocijativna kortikalna polja kod čovjeka predstavljaju gotovo 50% neokortikalne površine (Slika 1-2), što treba napomenuti jer neki istraživači zastupaju mišljenje o dramatičnom povećanju udjela kalretininskih neurona upravo u ovim područjima.

Tijekom evolucije sisavaca porast u broju GABA-ergičkih neurona veći je nego za piramidne neurone, pa tako u primata udio raste iznad 20% (43, 46, 64-69). U prosjeku se proporcija GABA-ergičkih neurona povećava za približno 50% uspoređujući glodavce i primate (kod štakora je udio ~16%, a u primata ~24%) (Slika 1-4B). Broj parvalbuminskih i somatostatinskih neurona uglavnom raste linearno s povećanjem ukupnog broja neurona tako da je njihova proporcija između 5-7% i u glodavaca, i u primata. To ukazuje kako je porast u proporciji GABA-ergičkih neurona prvenstveno posljedica eksponencijalnog porasta u broju kalretininskih neurona. Tako udio kalretininskih u ukupnoj populaciji neurona raste s približno 4% u glodavaca na približno 12% u primata. Za pretpostaviti je kako ovakav disproporcionalan porast jedne subpopulacije inhibitornih neurona mora dovesti do suštinskih promjena u organizaciji neuralne mreže i načinima procesiranja signala (36). Funkcionalna korelacija između porasta proporcije kalretininskih neurona, posebice u asocijativnim

područjima korteksa čovjeka, s izrazitim povećanjem kognitivnih sposobnosti je izrazito spekulativna, ali i očita (70).

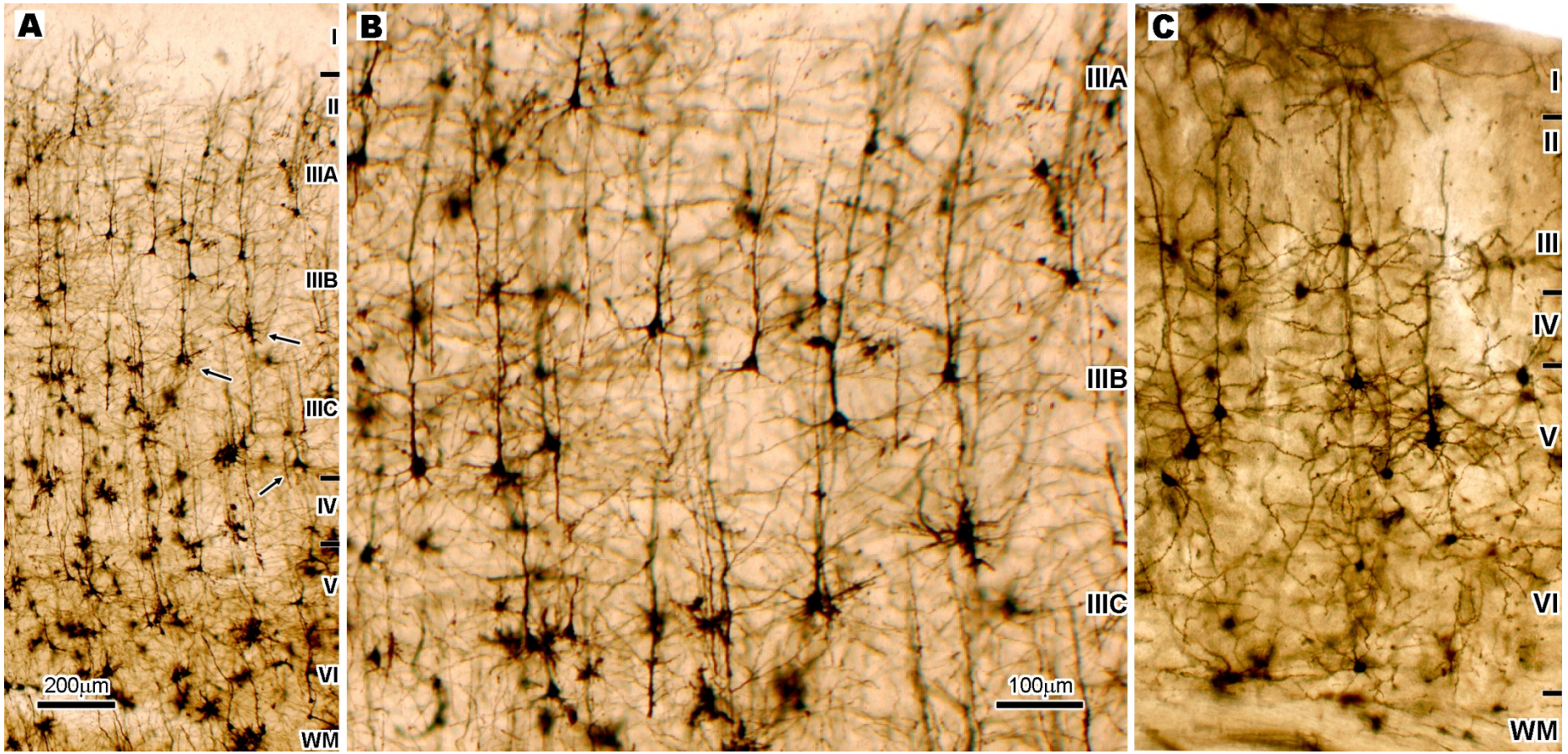
Za većinu neuroloških i psihijatrijskih poremećaja se smatra da dolazi do promjena u organizacije GABA-ergičke mreže (71-75). Brojni neuropsihijatrijski poremećaji i bolesti, poput shizofrenije i autizma, pogađaju samo ljudsku vrstu, a i oni koji su zajednički za većinu sisavaca, npr. epilepsija (76-79), ima u čovjeka specifičnu i kompleksniju simptomatologiju. Upravo zbog uloge kortikalnog GABA-ergičkog sustava u etiopatogenezi ovih poremećaja važno je razumjeti specifična svojstva njegove organizacije, posebno u onim dijelovima gdje su prisutne velike razlike između čovjeka i drugih vrsta, što je slučaj s populacijom kalretininskih neurona.

1.3 Promjene u organizaciji neuralne mreže kore velikoga mozga u primata

Piramidni supragranularni neuroni isključivo se projiciraju u druge dijelove kore velikoga mozga (3, 80-83), od kojih jedan manji dio pruža čak i paralelne projekcije prema nekoliko kortikalnih polja (84, 85). To je posebno karakteristično za velike piramide dubokog dijela sloja III (IIIC) asocijativnih područja (Slika 1-5), što se poklapa s eksperimentalnim rezultatima na prefrontalnom korteksu makaki majmuna koji su ove neurone identificirali kao ključne u procesuiranju radne memorije i drugih složenih kognitivnih funkcija (86-88). Uz to, selektivno oštećenje velikih piramidnih neurona sloja IIIC korelira sa propadanjem viših kognitivnih funkcija kod starenja, Alzheimerove bolesti i shizofrenije (3, 89-95).

Razvojne studije su pokazale kako se magnocelularnost sloja III asocijativnih područja pojavljuje tijekom ranog djetinjstva u razdoblju kada i broj sinapsi doseže maksimalne vrijednosti te dolazi do pojave složenih kognitivnih funkcija karakterističnih za čovjeka (96, 97). Sve ovo pokazuje da su veliki piramidni neuroni dubokih dijelova sloja III (IIIC), koji su posebno izraženi u multimodalnim asocijativnim područjima (Slika 1-5), glavni integrativni elementni kortiko-kortikalnog sustava te se mogu funkcionalno definirati kao asocijativni neuroni (96, 98).

Aksoni supragranularnih piramidnih neurona prefrontalnog korteksa u primata pružaju velik broj izdanaka paralelnih s pijalnom površinom, koji se okomito odvajaju od glavne grane. Oni tvore gustu mrežu horizontalnih intrakortikalnih aksona koji se protežu i do nekoliko milimetara od tijela, granajući se svojim terminalnim ograncima u pravilnom kolumnarnom (vertikalnom) rasporedu kroz slojeve II i III. Tako asocijativni neuroni sloja IIIC približno 80% sinapsi stvaraju lokalno u području gdje su smješteni (99).



Slika 1-5: Mikrofotografija rezova asocijativne kore ljudskog i mišjeg neokorteksa, obojanih Golgi Cox metodom. (A) Dorzolateralni dio frontalnog granularnog korteksa (Brodmannovo polje 9) pokazuje kako su supragranularni kortikalni slojevi (II i III), koji sadrže kortiko-kortikalno projicirajuće neurone, dvostruko deblji od infragranularnih slojeva (V i VI), koji sadrže kortiko-subkortikalno projicirajuće neurone. Uz to, piramidni neuroni smješteni u dubokom dijelu sloja III (podsloj IIIc) imaju najveće tijelo te najkompleksnije i najrazvijenije dendritičko stablo. Na rezovima obojanim Golgi metodom, to su najizražajniji neuroni, dok na Nissl rezovima oblikuju citoarhitektonsko svojstvo vidljivo samo u multimodalnim asocijativnim poljima moždane kore majmuna i čovjeka – magnocelularnost, tj. magnopiramidalnost sloja III (157). Na rezovima obojanima po Nisslu, piramidni neuroni sloja IIIc imaju, ne samo veliko tijelo, nego i intenzivno obojanu citoplazmu kao posljedicu visoke metaboličke aktivnosti (103). Također, imaju i najintenzivnije SMI 32 obojenje, što upućuje na vrlo dugo i razgranato aksonalno stablo (89). Navedena morfološka obilježja odlika su asocijativnih, kortiko-kortikalnih neurona. (B) Povećani dio slike A prikazan je na istom povećanju kao i slika C. (C) Multimodalna asocijativna kora u miša smještena je u parieto-okcipitalnom području. Kad se to multimodalno polje usporedi s onim u čovjeka (A, B) vidi se kako je u miša proporcija kortiko-kortikalnih projekcijskih neurona manja nego proporcija kortiko-subkortikalnih, kao i to da su najveći neuroni smješteni u sloju V. Stoga, debljina slojeva II i III u miša je više nego upola manja od debljine slojeva V i VI, što je upravo obrnuto nego kod čovjeka. U asocijativnim područjima ljudskog temporalnog korteksa, gdje nije razvijen sloj IIIc, 44% od ukupnog broja neurona je smješteno u slojevima II i III, koji imaju trećinu više neurona nego slojevi V i VI (80). Može se pretpostaviti kako u poljima koji imaju razvijen sloj IIIc gornji slojevi korteksa sadrže više od 50% od ukupnog broja neurona. U miša, gornji slojevi korteksa sadrže samo oko 22% ukupnog broja neurona. Slika modificirana prema Džaja i sur. 2014, Frontiers in neuroanatomy 8:103 (178).

Ovakva organizacija lokalnih intrakortikalnih veza kod kortiko-kortikalnih projekcijskih neurona u primata ukazuje na značajnu filogenetsku reorganizaciju neuralne mreže. Tijekom evolucije mozga čovjeka dolazi do povećanja broja, ali i širine prostora između kortikalnih minikolumni. Povećavanje ovog prostora posebno je izraženo u prefrontalnom korteksu, što ukazuje na dramatično povećanje inter-kolumnarne interakcije (83, 100). Ono što dodatno izdvaja prefrontalni korteks su izrazito bogate i guste veze s drugim asocijativnim područjima, koje su značajno brojnije čak i u usporedbi s drugim multimodalnim asocijativnim poljima (101). Stupanj i učinkovitost intra-arealnog procesuiranja u prefrontalnom korteksu i inter-arealne integracije prema drugim područjima utječe na ukupnu razinu kortikalnog procesiranja, što se posljedično odražava na razinu kognitivnih sposobnosti pojedinca (102). S obzirom na organizaciju aferentnih i eferentnih veza piramidnih neurona supragranularnih slojeva prefrontalnog korteksa primata (103, 104), može se zaključiti kako je razvoj i složenost veza asocijativnih neurona sloja III ključna u povećaju učinkovitosti kortiko-kortikalnog procesiranja (105, 106).

Navedeni podaci o organizaciji veza kortikalnih piramidnih neurona jasno pokazuju da u primata dolazi ne samo do kvantitativnog povećanja, već i do velikih promjena u načinu organizacije kortiko-kortikalnih i ekscitacijskih intra-kortikalnih veza. Može se pretpostaviti da ovakva suštinska reorganizacija neće dovesti do učinkovitog procesuiranja, ukoliko se ustroj GABA-ergičke mreže ne prilagodi promjenama na piramidnim neuronima (Slika 1-6).

Kao prvi korak u razumijevanju promjena kortikalnog GABA-ergičkog sustava kod čovjeka je komparativna analiza distribucije i proporcije subpopulacija neurona kod različitih životinjskih vrsta (Tablica 1-1). U prethodnom poglavlju spomenuto je kako postoje ograničenja u oblikovanju nedvosmislenog zaključka o postojanju regionalnih i laminarnih razlika unutar jedne vrste ili o razlikama između vrsta (36). No s druge strane podaci ukazuju kako unutar pojedine vrste ne postoje dramatične arealne razlike u proporciji i laminarnoj distribuciji različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona (34, 38) te da je opći obrazac distribucije očuvan između različitih vrsta sisavaca.

Također je već spomenuto da se usporedbom rezultata u malih eksperimentalnih glodavaca s rezultatima u primata pokazuje povećanje proporcije GABA-ergičkih neurona od najmanje 30% te da je ono najvjerojatnije i veće (~50%). U većini studija je pokazano kako se proporcija GABA-ergičkih neurona u štakora i miša kreće između 14–16% od ukupne populacije neurona, a kod majmuna i čovjeka ona uglavnom iznosi više od 20% (20–29%).

Podaci ukazuju da je ovaj porast udjela GABA-ergičkih neurona primarno vezan uz povećanje proporcije kalretininskih neurona, čemu u prilog govore i podaci o povećanju

kaudalnog dijela ganglijskog brežuljka (koji je izvor kalretininskih neurona) i stvaranja kalretininskih neurona u kortikalnim proliferativnim zonama kod primata (107-109). U glodavaca se proporcija kalretininskih neurona u ukupnoj populaciji GABA-ergičkih stanica kreće od 16–18%, dok u primata ta proporcija doseže u pojedinim regijama 35-40%. Najveća proporcija GABA-ergičkih neurona opisana je za slojeve II i III asocijativne kore sljepoočnog režnja, gdje oni čine oko 1/3 ukupne populacije neurona te gotovo polovica otpada na kalretininske neurone (46).

Jedna novija studija (41) pokazala je da su u majmuna i čovjeka kalretininski neuroni dvostruko brojniji u čeonom i tjemenom području u usporedbi s ostalim dijelovima mozga, što pokazuje da njihov broj eksponencijalno raste upravo u multimodalnim asocijativnim područjima primata. Podaci o filogenetskim promjenama u organizaciji GABA-ergičke neuralne mreže ukazuju na važnost povećanja udjela kalretininskih neurona koji očigledno dobro korelira s promjenama u organizaciji veza piramidnih neurona supragranularnih slojeva multimodalnih kortikalnih polja.

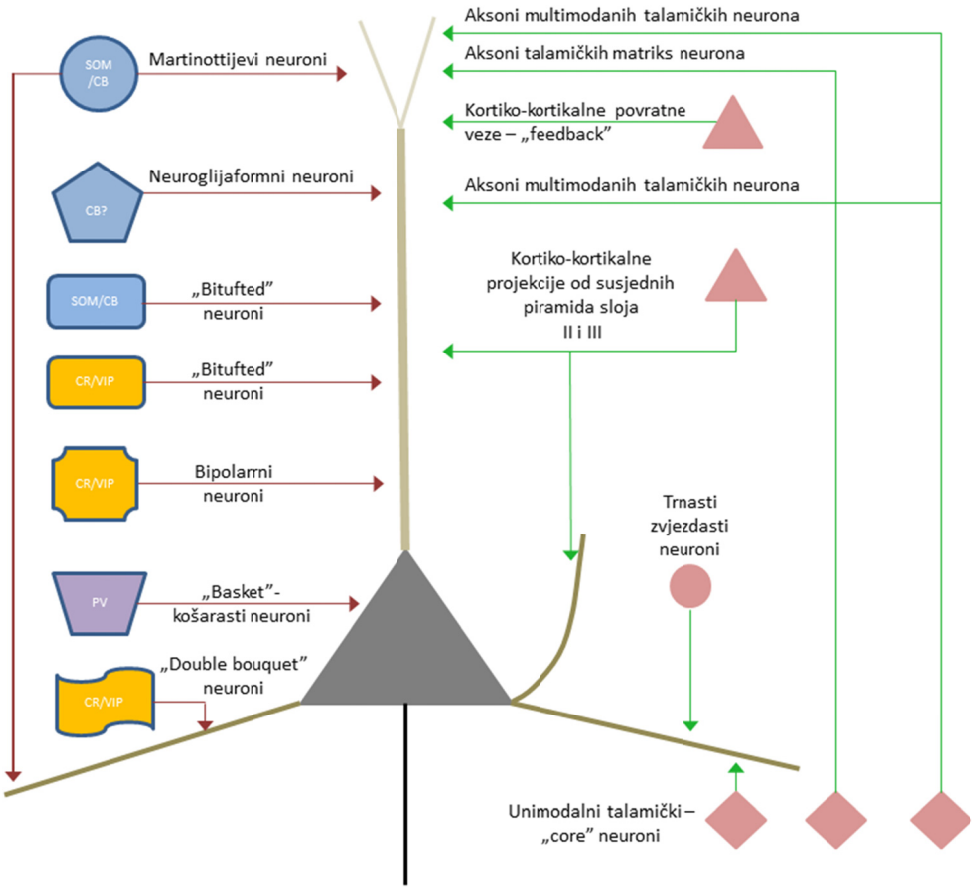
1.4 Funkcionalna svojstva kalretininskih neurona

Razina povećanja broja neurona i kortikalnih kolumni do kojeg je došlo u kori velikog mozga čovjeka zahtjeva daleko kompleksniju intra-arealnu i inter-arealnu integraciju. To je potrebno kako bi kvantitativno povećanje pratio i odgovarajući funkcionalni pomak i ostvarilo složenije procesuiranje informacija (106, 110). Pojava asocijativnih neurona (5, 8, 9) dovodi do značajne promjene u ustroju neuralnih krugova te omogućuje primatima višu razinu integracije unutar neuralne mreže (105). Uz to, kod primata u usporedbi s glodavcima, paralelno s povećanjem broja kortiko-kortikalnih neurona dolazi i do supralinearnog povećanja broja kalretininskih neurona. Nameće se pitanje kako to mijenja strukturu neuralne mreže. Izravne zaključke nije moguće dobiti, ali bi se na osnovi funkcionalnih svojstava različitih vrsta kalretininskih neurona mogla napraviti simulacija o promjenama elektrofizioloških svojstava neuralne mreže.

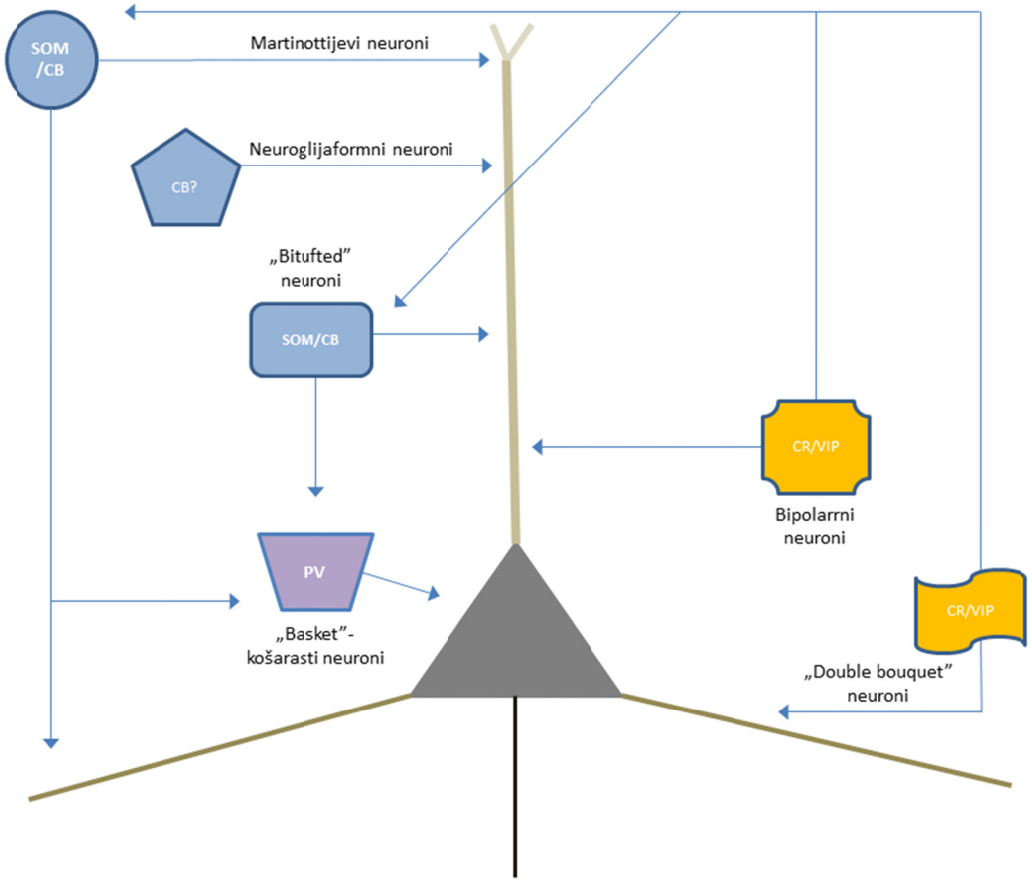
U glodavaca na osnovi elektrofizioloških svojstava definiramo dvije glavne vrste kalretininskih neurona: akomodirajući i ne-adaptirajući/ne-brzo okidajući (eng „non-adapting/non-fast spiking“) neuroni (16, 27, 111). Ove elektrofiziološke vrste koreliraju s ekspresijom membranskih proteina reguliranih naponom (16), koji čine tzv. kalretininsku skupinu proteina (112, 113).

Tablica 1-1. Pregled literature o udjelu GABA-ergičkih (A) i kalretininskih neurona (B) u neokorteksu glodavaca (31–56) i primata (32–69).

A. Postotak GABA-ergičkih neurona u populaciji svih neurona		
Anatomska regija	**Štakor i miš**	**Majmun i čovjek**
Primarna vidna kora (V1)	15% (52) - Štakor 14,5% (53) - Štakor 15% (54) - Štakor	20,5% (66) - Majmun 15% (67) - Majmun 20% (43) - Majmun
Primarna somato-senzorička kora (S1)	14% (45) - Štakor 25% (55) - Štakor	20 - 29% (68) - Majmun
Čeoni režanj	22% (56) - Štakor 16% (47) - Štakor	24,9% (57) - Majmun 21,2% (69) - Čovjek
Sljepoočni režanj		37,7% (46) - Čovjek
Analiza više režnjeva	19,5% (34) - Miš 15% (44) - Štakor	25% (43) - Majmun
B. Postotak kalretininski neurona u populaciji GABA-ergičkih neurona		
Anatomska regija	**Miš i štakor**	**Majmun i čovjek**
Primarna vidna kora (V1)	17% (33) - Štakor 24% (35) - Miš	20% (32) - Majmun
Čeoni režanj	16,1% (37) - Štakor 24,7%* (47) - Štakor	28.6% (49) – Majmun 28.8%* (63) - Čovjek 34.2%* (63) - Majmun
	18% (31) - Štakor	33.2% - 44.8%* (57); (60); (61)* - Majmun
Sljepoočni režanj		46,2% (46) – samo slojevi II i III - Čovjek
Analiza iz više režnjeva	18% (38) - Miš 13,9% (34) - Miš	
* Vrijednosti su izračunate iz podataka prikazanih u izvornim člancima		



Slika 1-6A: Organizacija aferentnih projekcija prema dominantnim mjestima pristupanja na piramidni neuron sloja III. Izvori inhibicije prikazani su lijevo, a ekscitacije desno. Na bazalne dendrite koji su usmjereni horizontalno i prema dolje, od distalno prema proksimalno pristupaju prvo aksoni od talamičkih unimodalnih jezgara, aksoni trnastih zvjezdastih neurona (na kojima je glavnina sinapsi od aksona unimodalnih talamičkih jezgara), te lokalne projekcije susjednih piramidnih neurona. Istovremeno, bazalne dendrite inhibiraju Martinottijeve stanice te stanice s dva čuperka („double bouquet"). Na tijelu piramide nalaze se samo inhibitorne sinapse, koje primarno dolaze od nekoliko vrsta košarastih interneurona. Ekscitacija u području apikalnog dendrita dolazi od drugih piramidnih neurona slojeva II i III te multimodalnih talamičkih jezgara (npr. pulvinara). Apikalni dendrit inhibiraju bipolarni interneuroni, stanice sa dva čuperka („bitufted") te neurogliaformne stanice. Stanice s dva čuperka pripadaju u dvije molekularne skupine, one koje izražavaju kalretinin (CR) i vazo-intestinalni peptid (VIP), te one koje izražavaju somatostatnin (SOM). Kod neurogliaformnih neurona otpuštanje GABA-e vezano je prvenstveno uz volumnu transmisiju, a samo manji dio se sinaptički otpušta u distalnom dijelu apikalnog dendrita. Ekscitacija u području terminalnog razgranjenja apikalnog dendrita dolazi od povratnih („feedback") aksona iz drugih kortikalnih polja, neurona talamičkog matriksa te multimodalnih talamičkih jezgara. Na ovom dijelu glavni izvor inhibicije su Martinottijeve stanice.



Slika 1-6B: Prikaz funkcionalne povezanost GABA-ergičkih interneurona koji reguliraju aktivnost piramidnog neurona. Interneuroni koji sadrže istovremeno kalretinin (CR) i vazointestinalni peptid (VIP) rade inhibiciju proksimalnih dijelova bazalnog i apikalnog dendritičkog stabla. Istovremeno, oni inhibiraju Martinottijeve i stanice s dva čuperka pozitivne na somatostatin. To dovodi do disinhibicije u području distalnog dendritičkog stabla i istovremeno do porasta aktivnosti košarastih neurona pozitivnih na parvalbumin. Na taj način raste frekvencija inhibitornih postsinaptičkih potencijala na razini tijela.
Kalretiniski neuroni su na ovoj shemi prikazani kao da istovremeno sadrže i vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), jer u infragranularnim slojevima (V i VI) glodavaca čak 90% kalretininskih neurona izražava VIP **(40)**. U supragranularnim slojevima (II i III) ovaj postotak je oko 70% . U populaciji VIP neurona 60% izražava i kalretinin. U primata je pokazano kako je većina VIP neurona pozitivna kalretinin (41).Ovo je značajno jer se u elektrofiziološkim studijama VIP često koristi kao biljeg interneurona.

Na temelju morfoloških svojstava aksona (Slika 1-6), razlikujemo tri osnovne skupine kalretininskih neurona: (a) prvu čini posebna podvrsta stanica s dva čuperka (eng. „double bouquet cells“) s vertikalno orijentiranim aksonima koji većinom pristupaju na bazalne dendrite piramida (114, 115); (b) bipolarne neurone koji šalju aksone na proksimalni dio apikalnog dendrita (116); t (c) stanice s dva čuperka (eng. „bitufted cells“) koje se projiciraju na srednji dio apikalnog dendrita piramidnih neurona (117).

Stoga kalretininski neuroni vrše izravnu inhibiciju proksimalnog dijela apikalnih i bazalnih dendrita (118), ali ih kontaktiraju samo s manjim dijelom (~10%) svojih sinapsi (27). No, kalretininski neuroni su izvor obilnih sinaptičkih projekcija na somatostatinske neurone (119) i druge okolne kalretininske neurone (27). Spomenuti somatostatinski neuroni su pak izvor izravnih inhibicijskih sinaptičkih veza s apikalnim i bazalnim dendritima piramida (117, 120) te susjednim parvalbuminskim neuronima (119).

Parvalbuminski neuroni su većinom košaraste („basket“) stanice koje vrše snažnu inhibiciju tijela piramidnih stanica (16, 119). Optogenetska aktivacija brzo-okidajućih („fast spiking“) parvalbuminskih neurona inducira gamma oscilacije u okolnim piramidama (121, 122), dok bi bez aktivnosti parvalbuminskih stanica piramide nastavile nesinhrono okidanje (123).

Drugim riječima, parvalbuminski košarasti neuroni dovode do „resetiranja“ u fazi svojih ciljnih piramida pomoću hiperpolarizacije, nakon koje se u piramidnim neuronima događa povratna, kratkotrajna depolarizacija i sinhrono okidanje (124). Uklanjanje inhibitornog utjecaja nad parvalbuminskim košarastim neuronima produžuje njihovo djelovanje na piramide (125). Upravo bi ovo mogla biti jedna od bitnih funkcija kalretininskih neurona. Blokiranjem somatostatinskih neurona (119, 126), kalretininski neuroni bi mogli kreirati vremenski prozor disinhibicije nad parvalbuminskim košarastim neuronima, čime bi njihov učinak nad piramidama bio dugotrajniji i osiguravao duže periode sinhronizacije u domeni gamma oscilacija.

Ukupno promatrajući, ova funkcionalno povezana skupina stanica – kalretininski neuroni, njihovi ciljni somatostatinski neuroni, parvalbuminski neuroni te njihove ciljne piramide zajedno čine neuralni sklop („neural assembly“) (127, 128). Funkcionalno gledano, prednost neuralnog sklopa je da s velikom učinkovitošću (odnosno velikom vjerojatnošću) može aktivirati svoje sinaptičke ciljeve, a to uspijeva zbog sinhrone aktivnosti svojih piramida (129, 130). Važnost interneurona jest u tome što su potrebni za međusobno odvajanje i održavanje aktivnosti te uspostavu vremenskog obrasca aktivacije pojedinih neuralnih sklopova (128).

Može se pretpostaviti kako je uloga povećane proporcije kalretininskih neurona ovisna o kriteriju njihove teritorijalne ekskluzivnosti, odnosno o njihovom razvojnom pozicioniranju prema ciljevima u usporedbi s drugim kalretininskim interneuronima. Ako ovi, u evoluciji novo dodani kalretininski neuroni, ne pokazuju teritorijalnu ekskluzivnost, odnosno sinaptički se projiciraju na neurone koji već primaju projekcije iz drugih kalretininskih neurona, onda se novo dodani kalretininski neuroni uključuju u već postojeće neuralne sklopove. Na taj način uspostavljaju sinapse sa somatostatinskim neuronima s kojima su se već neki drugi kalretininski sinaptički povezali. Rezultat toga bio bi povećani broj kalretininskih neurona po sklopu, dok se broj piramida unutar sklopa ne bi promijenio, što bi dovelo do potentnijeg učinka kalretininske populacije na piramide. Međutim, u obrnutom slučaju, ako su kalretininski neuroni donekle teritorijalno isključivi, odnosno tek ih se nekoliko povezuje sa sinaptičkim ciljem, novo dodani kalretininski neuroni dovest će do veće funkcionalne segmentacije skupa piramidnih neurona stvarajući veći broj malih sklopova, što je mehanizam nastanka veće razine paralelnog procesiranja. Veći opseg paralelnog procesiranja, utjelovljen u većem broju malih neuralnih sklopova, mogao bi dovesti do eksponencijalnog rasta u kapacitetu memorije neokortikalne mreže.

Dostupne studije sugeriraju da je evolucijski put kortiko-kortikalne mreže primata uključivao ekspanziju u dva smjera. Prvo, došlo je do povećanja kortiko-kortikalne povezanosti između piramidnih neurona slojeva II i III, što je mehanizam koji vodi većem opsegu inter-arealnog procesiranja. Drugo, povećao se udio kalretininskih GABA-ergičkih neurona u ukupnoj neuronskoj populaciji, što bi bio mehanizam za povećanje sinhronosti te porast paralelnog procesiranja između kortikalnih polja.

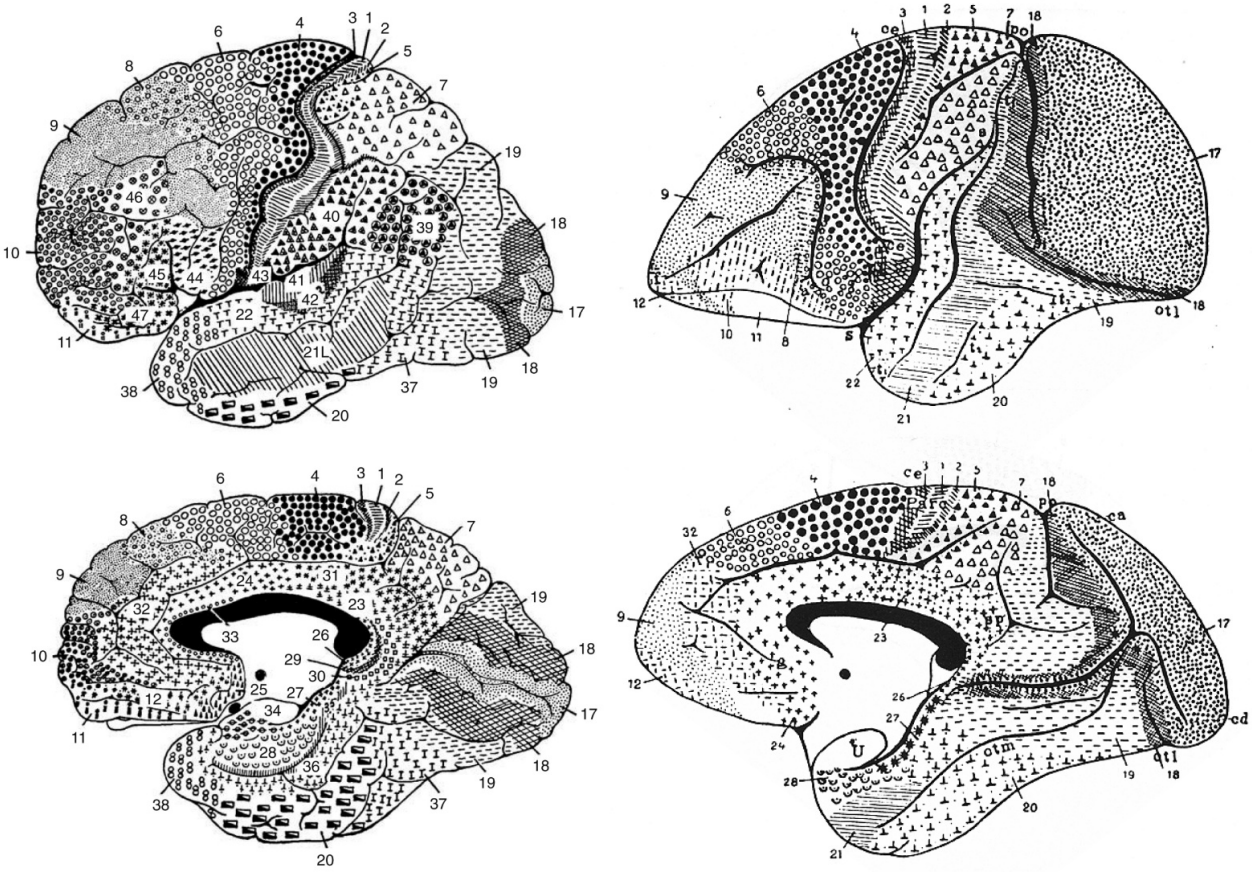
Otvoreno pitanje jest koja je to populacija kalretininskih neurona koja se pojavljuje kao skok u proporciji – jesu li to isti neuroni kao i kod glodavaca koji su zbog većeg broja inicijalnih dioba u stadiju matičnih stanice doveli do povećanja broja kalretiniskih neurona koja se pozicionira u korteks. Druga mogućnost je da su se pojavile neke nove populacije kalretininskih neurona, molekularno i/ili funkcionalno različite od populacija u korteksu glodavaca.

1.5 Funkcionalna i strukturna obilježja prefrontalnog korteksa u primata i homologna područja kod štakora

Prefrontalni korteks (Slika 1-2), koji se funkcionalno naziva "frontalni asocijacijski korteks" je područje kore mozga (Slika 1-7) koje procesuira najsloženije kognitivne funkcije (85, 131-138). Citoarhitektonski naziv, "frontalni granularni korteks", označava osnovnu razliku u odnosu na stražnje dijelove frontalnog režnja, polje 4 - primarni motorni korteks i polje 6 premotorni i suplementarni motorni korteks. Ove dijelove frontalnog režnja karakterizira agranularnost, odnosno nemogućnost da se jasno definira sloj IV.

Granularni dio frontalnog režnja nije jedinstvena funkcionalna cjelina, pa se ugrubo može podijeliti na (Slika 1-8): 1) polje 8, područje koje bi se funkcionalno trebalo karakterizirati kao premotoričko područje, obzirom da je zaduženo za konjugirane pokrete očiju, 2) polja 44 i 45, Brocino govorno područje, koje se u širem funkcionalnom smislu riječi također može ubrojiti u premotorna područja, 3) polja 11, 12, 13, 14, 47, odnosno orbitofrontalno područje, koje se funkcionalno može klasificirati kao dio limbičkog sustava jer ima glavnu ulogu u kognitivnoj regulaciji emotivnog odgovora; 4) polje 32 koje je funkcionalno vezano uz prednji dio cingularne vijuge (polja 24 i 25) pa se često zajednički ova polja definiraju kao medijalni dio prefrontalnog korteksa s ulogom u procesuiranju motivacijske komponente izvršnih funkcija te 5) polja 9, 10, 46, koja predstavljaju dorzolateralni dio prefrontalnog korteksa i ključna su u procesuiranju radne memorije i preko eferentnih projekcija prema bazalnim ganglijima pokreću motorni odgovor kod izvršnih funkcija vezanih uz najsloženije kognitivne zadatke.

U citoarhitektonskom smislu prefrontalni korteks zapravo obilježava „dominacija“ supragranularnih slojeva (II i III) koje izgrađuju neuroni s kortikalnim projekcijama (Slika 1-5A). U nekim dijelovima debljina ovih slojeva i dvostruko je veća od infragranularnih (slojevi V i VI). U većini prefrontalnih kortikalnih polja sloj III se jasno može raspodijeliti na tri podsloja, gdje sloj IIIC sadrži najveće i najrazgranatije neurone promatrajući kroz sve slojeve. Veličina ovih neurona posebno je dominantna u nekim poljima prefrontalnog korteksa (primjerice polja 44 i 45) uspoređujući ih s poljima u drugim režnjevima te stoga govorimo o magnocelularnosti (magnopiramidalnosti) sloja III (131).

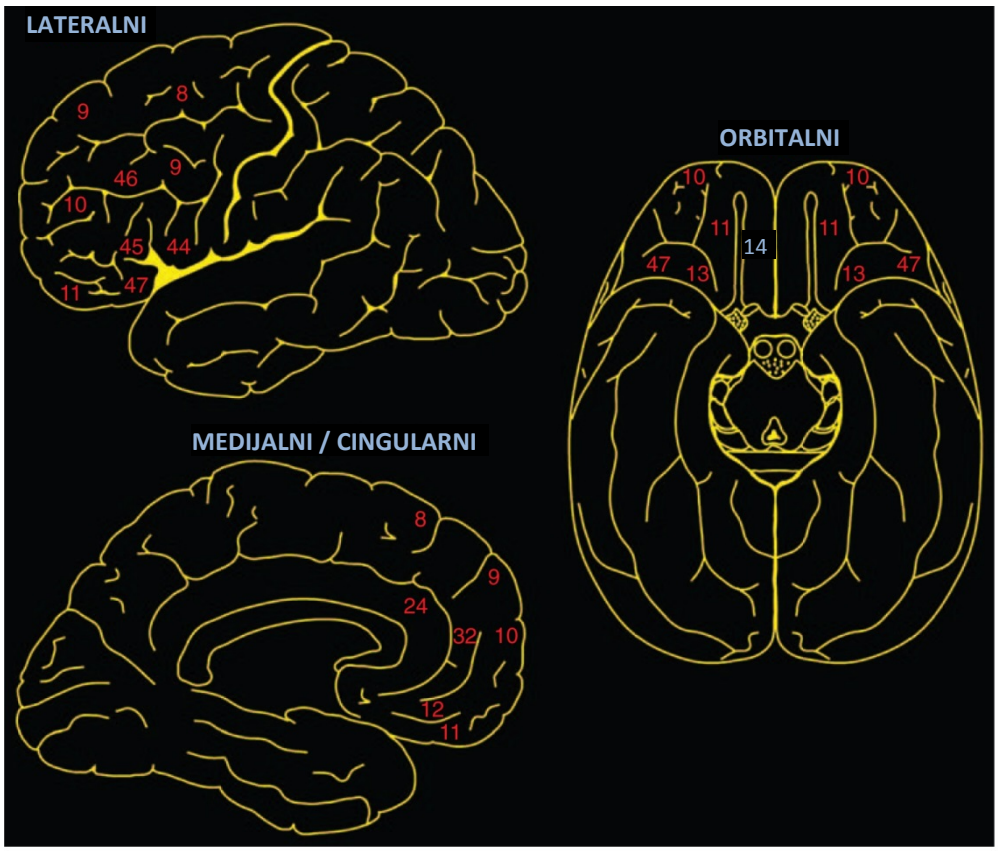


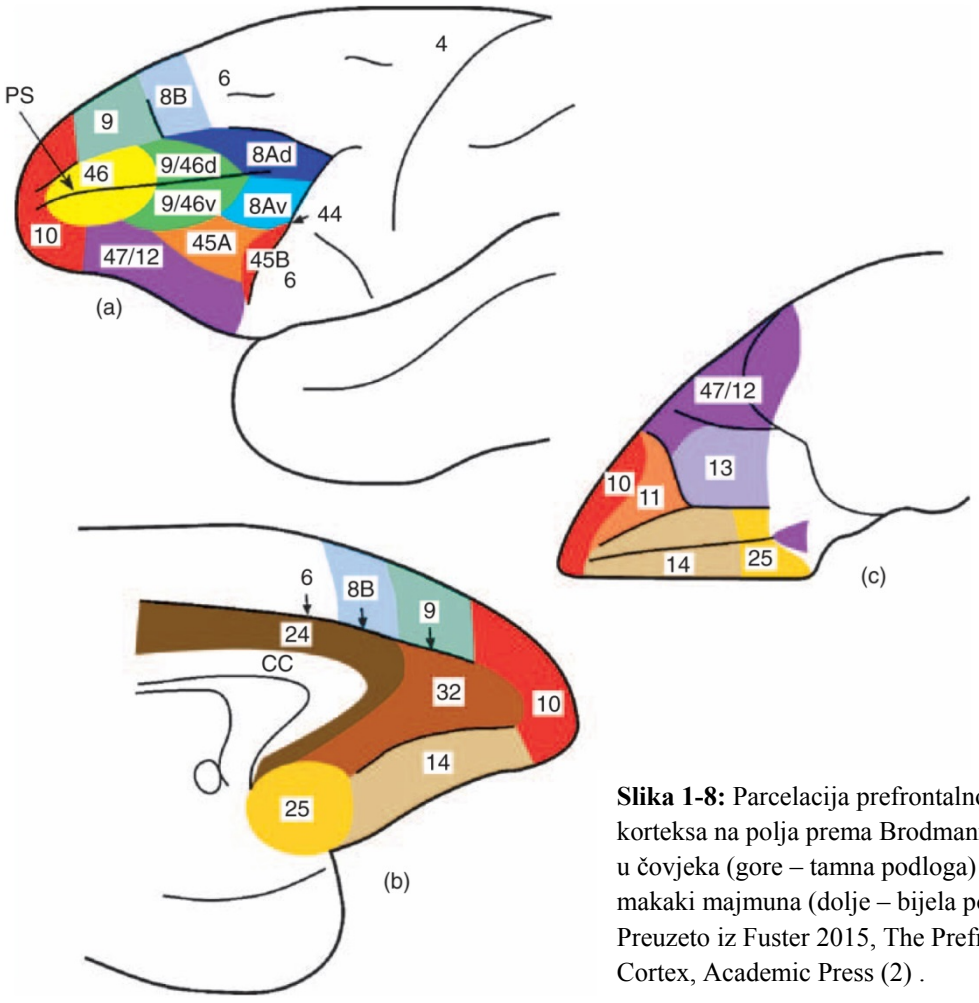
Slika 1-7: Slika prikazuje citoarhitektonsku parcelaciju kore velikoga mozga na polja prema Brodmannu, uspoređujući čovjeka (lijevo) i makaki majmuna (desno) (133, 139).

Definicija prema projekciji iz mediodorzalne talamičke jezgre jedina jasno definira ovaj dio kao kompaktnu cjelinu (134), gdje po tom kriteriju u prefrontalni korteks spada i prednji dio cingularne vijuge. Međutim, topografska distribucija projekcija iz različitih strukturno-funkcionalnih cjelina mediodorzalne jezgre vrlo je pravilno ograničena unutar prefrontalnih kortikalnih polja, tako da se i prema tome može nazrijeti funkcionalna različitost (Slika 1-9).

To posebno jasno razlikuje dorzalne i lateralne dijelove (polja 8, 9, 10, 44, 45, 46) koji imaju projekcije s lateralnim dijelovima mediodorzalne jezgre, dok su orbitalni i medijalni dijelovi (polja 11, 12, 13, 14, 32, 47) povezani s medijalnim dijelovima jezgre. Ovakva gruba podjela prefrontalnog korteksa prema projekcijama iz mediodorzalne talamičke jezgre može se preslikati i na razlike koje postoje i u drugim projekcijama (101).

Veze s talamusom su recipročne, te podjednako obimne u svim dijelovima prefrontalnog korteksa. Povratne talamičke projekcije dio su glavnog izlaznog puta prefrontalnog korteksa, a to su projekcije prema bazalnim ganglijima. Projekcije u bazalne ganglije su također različito topografski organizirane; dorzalni i lateralni dijelovi korteksa projiciraju se u dorzalne („kognitivne“) dijelove kaudatusa i putamena, dok orbitalni i medijalni projekcije šalju u ventralne („limbičke“) dijelove, prvenstveno nukleus akumbens (slika 1-9). Značajna razlika postoji i u projekcijama koje primaju različiti dijelovi mediodorzalne talamičke jezgre; tako lateralni dijelovi mediodorzalne jezgre primaju projekcije iz cerebeluma, čime se zatvara krug gdje su informacije iz dorzalnih i lateralnih dijelova prefrontalnog korteksa preko projekcija u jezgre ponsa (te gornje kolikule i retikularnu formaciju) bile proslijeđene u mali mozak. Projekcije iz orbitalnih i medijalnih dijelova prefrontalnog korteksa nisu usmjerene prema motornim strukturama, već prema strukturama koje su vezane uz viceromotornu regulaciju (dorzalna jezgra vagusa i parabrahijalna jezgra), procesuiranje visceralnih osjeta (jezgra solitarnog trakta) te regulaciju prijenosa bolnih podražaja (periakveduktalna siva tvar). Zanimljivo je da ventralni dio strijatuma prima jednosmjerne projekcije iz hipokampusa, a ove informacije zatim preko medijalnog dijela mediodorzalne jezgre odlaze u orbitalne i medijalne dijelove prefrontalnog korteksa.

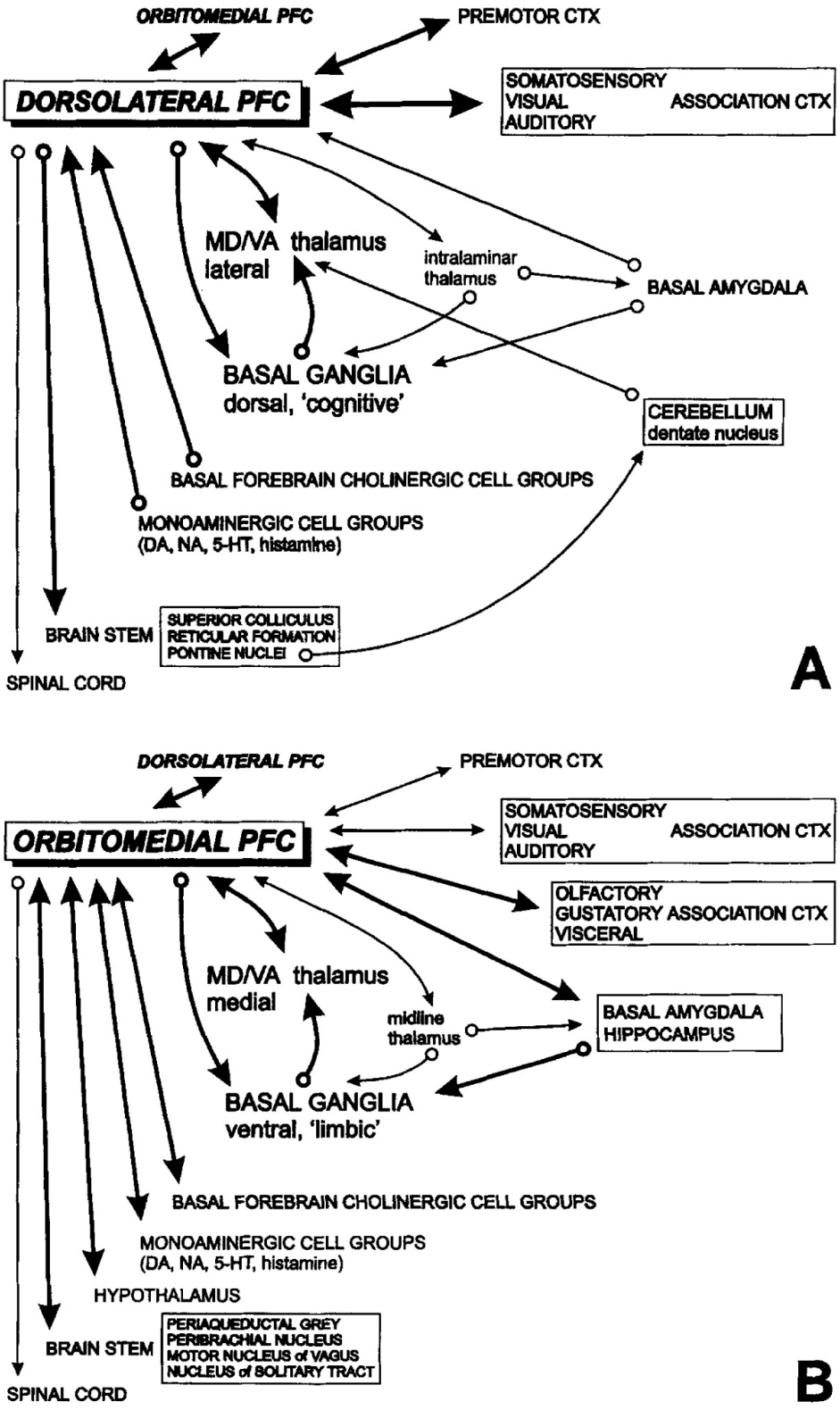




Slika 1-8: Parcelacija prefrontalnog korteksa na polja prema Brodmannu (139) u čovjeka (gore – tamna podloga) i makaki majmuna (dolje – bijela podloga). Preuzeto iz Fuster 2015, The Prefrontal Cortex, Academic Press (2) .

Treba naglasiti da su veze orbitalnih i medijalnih dijelova s moždanim deblom recipročne, dok su veze lateralnih i dorzalnih područja prema moždanom deblu jednosmjerne (Slika 1-9). Projekcije iz svih dijelova prefrontalnog korteksa prema kralježničnoj moždini su također jednosmjerne. Recipročne veze prefrontalni korteks ima s drugim unimodalnim i multimodalnim asocijacijskim kortikalnima poljima. Dorzalni i lateralni dijelovi posebno intenzivno izmjenjuju informacije s vidnim, slušnim i somatosenzibilnim dijelovima korteksa, kao i s premotoričkim područjem, dok su ove projekcije daleko manje izražene u orbitalnim i medijalnim dijelovima prefrontalnog korteksa. Međutim, orbitalni i medijalni dijelovi prefrontalnog korteksa imaju snažne recipročne projekcije s njušnim, okusnim i drugim visceralnim asocijativnim područjima korteksa, koje u dorzalnim i lateralnim dijelovima nisu prisutne. Snažne recipročne veze orbitalni i medijalni prefrontalni korteks ima i s amigdalama, dok su projekcije koje dolaze iz amigdala u dorzalni i lateralni prefrontalni korteks daleko slabije i jednosmjerne. Posebno treba naglasiti da orbitalni i medijalni dijelovi prefrontalnog korteksa imaju izražene recipročne veze s hipotalamusom, dok iste nisu opisane u dorzalnom i lateralnom prefrontalnom korteksu.

Ulazne i izlazne projekcije jasno pokazuju da su dorzalni i lateralni dijelovi prefrontalnog korteksa vezani uz strukture motornog sustava, što obilježava specijalizaciju prema izvršnim kognitivnim funkcijama. Orbitalni i medijalni dijelovi povezani su uz visceralne i limbičke strukture, što obilježava njihovu ulogu u regulaciji emocionalnog odgovora i kontroli homeostaze (101). Ovdje naravno treba jasno napomenuti da su pojedinačno gledajući najznačajnije aferentno-eferentne projekcije međusobne veze ova dva područja. Također treba naglasiti da se ovdje radi o općim razlikama u vezama između dorzo-lateralnih i orbito-medijalnih kortikalnih polja te da postoje i druge specifičnosti u vezama koje definiraju svako polje ponaosob.

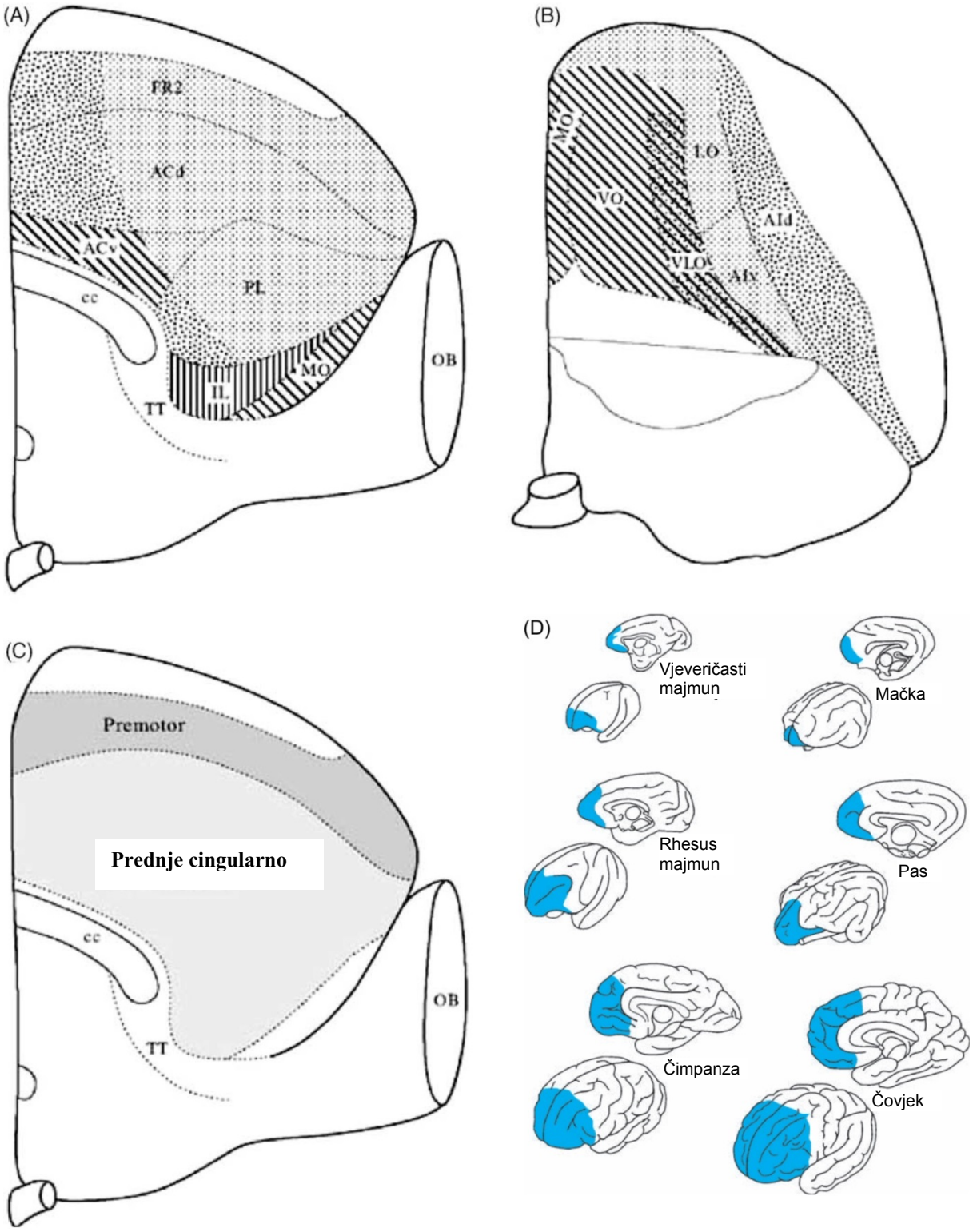


Slika 1-9: Shema organizacije aferentnih i eferentnih veza prefrontalnog korteksa (PFC), po kojoj razlikujemo dva glavna dijela: dorzolateralni (A) i orbitomedijalni (B). Treba naglasiti da su ova područja sastavljena od većeg broja citoarhitektonskih polja gdje svako ima određene specifičnosti u vezama s dugim strukturama mozga. Shema modificirana preuzeta iz Groenewegen i Uylings. 2000, Progress in Brain Research 126:3-28 (101).

Citoarhitektonske studije su pokazale da kaudalniji dijelovi orbitalne plohe čeonog režnja odudaraju od obilježja koje karakterizira asocijativna u odnosu na primarna i premotorička područja (131, 139, 140). Stražnji orbitalni dijelovi također imaju vrlo slabo izražen sloj IV (disgranularni korteks), a u najkaudalnijim dijelovima sloj nije moguće definirati (agranularni korteks). Ovo svojstvo omogućava da se polje i po citoarhitektonskim kriterijima definira homolognom prema odgovarajućem funkcionalnom polju u glodavaca koji nemaju granulirana polja u frontalnom dijelu, što je posebno značajno u komparativnim studijama organizacije neuralne mreže. Komparativna citoarhitektonska istraživanja pokazala su da (uz iznimku polja 47) kod čovjeka postoje jasni homolozi svih orbitalnih i medijalnih kortikalnih frontalnih polja definiranih u makaki majmuna (Slike 1-7 i 1-8). Uspoređujući rezultate istraživanja funkcionalne aktivnosti mozga i kliničko-patološke korelacije funkcionalnih ispada kod čovjeka s eksperimentalnim istraživanjima na makaki majmunima, može se zaključiti da citoarhitektonska svojstva također okvirno odražavaju i funkcionalnu homologiju između pojedinih polja.

Funkcija orbitalnog frontalnog korteksa se općenito može vezati uz donošenje odluka na temelju vrijednosnih sudova (136). Pri tome je aktivnost neurona ovog područja zabilježena kod dodjeljivanja vrijednosti određenom fenomenu, ažuriranja te vrijednosti ukoliko dođe do promijene u okolnostima, kodiranja procjene vremena do ostvarivanja cilja te uvjerenja u povoljan ishod (136). Ova vrsta procesuiranja se psihološki definira kao kognitivna fleksibilnost, što označava mogućnost procjene situacije te ažuriranja i promjene djelovanja u slučaju promjene okolnosti (141).

Orbitalni frontalni korteks (polja 11, 12, 13, 14) u širem smislu predstavlja dio koji zajedno s neuralnom mrežom medijalnih područja prefrontalnog korteksa čini jednu veću funkcionalnu cjelinu. Ova mreža kodira te dovodi u vezu pozitivne i negativne događaje, s tom razlikom da orbitalna mreža kodira emotivni odgovor na vanjske podražaje, dok medijalna mreža (uključujući tu i polje 14) kodira emotivni odgovor na unutarnje (mentalizirane) podražaje (136). Stoga se orbitalni prefrontalni korteks može definirati kao područje koje procesuira informacije potrebne za prilagodbu na promjene stanja u vanjskoj okolini (fleksibilnost), a medijalni dio prefrontalnog korteksa kao područje koje usmjerava naše djelovanje na temelju unutarnjeg stanja (motivacija).



Slika 1-10: Područja koja se definiraju kao prefrontalni korteks u štakora (A, B), te uključuje: frontalno polje 2 (FR2), medijalno (MO) i ventralno orbitalno polje (VO), prednje inzularno polje (AI), prednje cingularno (AC), prelimbičko (PL) i infralimbičko polje (IL). (C) Prijašnja klasifikacija razlikovala je samo premotoričko i cingularno područje, koje se smatralo jedinim potencijalnim korelatom prefrontalnih područja opisanih u primata. (D) Prikaz udjela prefrontalnog korteksa kod šest različitih vrsta. Modificirano (A-C) prema Uylings i sur. 2003, Behav Brain Res 146:3-17, (134) i (D) Fuster 2015, The Prefrontal Cortex, Academic Press (2).

Promatrajući koja bi homologna područja u štakora mogla odgovarati orbitalnom dijelu frontalnog režnja, treba spomenuti da postoje kontroverzna mišljena da li uopće postoji prefrontalni korteks u štakora,s obzirom da citoarhitektonski ne nalazimo niti granulirana niti magnocelularna (sloj III) područja u frontalnom režnju (134). Prema projekcijama iz mediodorzalne jezgre i prema funkcionalnim studijama, u štakora se mogu opisati područja koja bi bila homologna dijelu orbito-medijalnog prefrontalnog korteksa u primata (Slika 1-10). To su medio-orbitalno (MO), ventralno orbitalno (VO), lateralno orbitalno (LO), te ventrolateralno orbitalno polje (VLO) (135). Kao i kod primata, ovo područje ima dvije funkcionalne mreže, a poveznicu između njih zapravo čine regije MO i VO, gdje neuroni procesuiraju slične informacije kao neuroni gyrus rectus u primata (polje 14) (141). Medijalno orbitalno polje povezano je (a) sa susjednim područjima orbitalnog korteksa: VO (intenzivno), LO i VLO polje (slabije); (b) s frontalnim područjem 2 (Fr2), koje funkcionira istovremeno kao premotoričko, suplementarno motoričko polje te frontalno polje za pokrete očiju; (c) s inzulom (posebice dorzalnom korom inzule); (d) s temporalnim asocijativnim poljem; e) s hipokampusom (područje parasubikuluma, presubikuluma i postsubikuluma); (f) s multimodalnim korteksom stražnjeg parijetalnog / prednjeg dijela okcipitalnog polja 2L. Vrlo slične projekcije s ovim područjem ima u primata polje 14c, koje se projicira prema (a) susjednim regijama orbitalnog prefrontalnog korteksa (polja 11 i 13); (b) regijama dorzolateralnog prefrontalnog korteksa (polja 46 i 9); (c) inzulom; (d) polarnim korteksom temporalnog režnja; te ima (e) intenzivne veze za hipokampusom i presubikulumom (142, 143). Upravo ove obilne veze s hipokampusom predstavljaju glavno obilježje polja 14c i predstavljaju bitnu razliku prema projekcijama ostalih orbitalnih i medijalnih polja.

Stoga jasnu homologiju prema sva tri kriterija - citoarhitektonskom, funkcionalnom i projekcijskom između štakora i primata možemo u prefrontalnom korteksu definirati za polje MO i 14c.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da kalretininski neuroni u neokorteksu primata pokazuju, u usporedbi s glodavcima, specifična obilježja po udjelu u ukupnoj populaciji, morfologiji te laminarnoj distribuciji.

Hipoteza predmnijeva da se konzistentni podaci o povećanju udjela kortikalnih kalretininskih neurona kroz evoluciju sisavaca mogu dobiti samo usporedbom homolognih područja koristeći stereološku metodologiju.

Pretpostavlja se da dramatično povećanje udjela kalretininskih neurona dovodi do značajne strukturne reorganizacije neuralne mreže kore velikoga mozga čovjeka i suštinskih promjena funkcionalnih karakteristika koje za posljedicu imaju izrazito povećanje kapaciteta procesuiranja.

3. CILJEVI RADA

Opći cilj istraživanja bio je dobiti te usporediti podatke o udjelu, laminarnoj raspodjeli i morfološkim obilježjima kalretininskih interneurona u neokorteksu čovjeka, eksperimentalnog primata (Macaca fascicularis) i eksperimentalnog glodavca (Wistar štakor).

Specifični ciljevi istraživanja uključivali su kvantitativnu analizu homolognih multimodalnih asocijativnih područja frontalnog režnja uspoređujući štakora (medio-orbitalno polje), majmuna i čovjeka (polje 14c) koristeći citoarhitektonske i funkcionalne kriterije te kriterije povezanosti s drugim strukturama.

U svakoj životinjskoj vrsti cilj je bio imunocitokemijskim metodama serijski obraditi tri mozga kako bi se analizirala ekspresija proteina neuralne jezgre (NeuN) kojim su obilježeni svi neuroni i kalcij vežućeg proteina kalretinina kojim je obilježena jedna od populacija GABA-ergičkih neurona.

Stereološkom analizom cilj je bio dobiti podatke o volumenu sloja, te podatke o broju i gustoći neurona te udjelu kalretininskih neurona po slojevima.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Uzorak korišten u histološkoj analizi

U stereološkom dijelu ove studije korišteno je moždano tkivo tri odrasla Wistar štakora, tri odrasla cinomolgus majmuna (macaca fascicularis) te postmortalni materijal moždanog tkiva tri odrasle osobe. Eksperimentalni postupci na štakorima (oznake R529, R530, R531) i majmunima (oznake MV, MVI, MVII) provedeni su na Medicinskom fakultetu La Timone Sveučilišta Aix Marseille (Institut de Neurosciences des Systèmes - INSERM UMR 1106), a ljudsko tkivo potječe iz Zagrebačke neuroembriološke zbirke, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (144, 145).

Na mozgovima osoba analiziranih u ovoj studiji nisu uočene nikakve abnormalnosti niti patološke promjene, a prema informacijama dobivenih od obitelji i provjerom medicinske dokumentacije niti kod jedne od navedenih osoba nisu zabilježeni znakovi psihičkih i neuroloških bolesti. U analizu je uključen sljedeći materijal:

- ČO376: žensko, 60 godina, smrt nastupila zbog iskrvarenja kod laringealnog karcinoma, postmortalno vrijeme 10 sati;
- ČO378: muško, 35 godina, smrt nastupila gušenjem, postmortalno vrijeme 11 sati;
- ČO379: muško, 46 godina, nagla srčana smrt, postmortalno vrijeme 6 sati.

Svi eksperimentalni postupci na životinjama provedeni su u skladu s protokolima odobrenima od strane Savjeta Europske zajednice (European Communities Council 86/609/EEC), Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Sveučilišta Aix-Marseille te Povjerenstva za istraživanje na životinjama francuskog Državnog primatološkog centra.

Štakori korišteni u ovoj studiji uzgojeni su u nastambama za životinje Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Medicinskog fakulteta La Timone Sveučilišta Aix-Marseille.

Majmuni korišteni u ovoj studiji uzgojeni su za znanstvena istraživanja u kontroliranim i standardiziranim uvjetima Odjela za primatologiju Državnog centra za znanstvena istraživanja, Francuska (Station de Primatology Centre National de la Recherche Scientific), gdje se vodi pojedinačna evidencija o povijesti njihovog uzgoja te zdravstvenom stanju. Svi postupci nad životinjama izvedeni su u općoj anesteziji.

Ljudsko tkivo prikupljeno je uz dozvolu ovlaštenog patologa tijekom redovitih obdukcija na Zavodu za patologiju i Zavodu za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Zagrebu, u skladu s hrvatskim zakonima, te uz dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2 Priprema tkiva za histološku analizu

Štakori su duboko anestezirani injekcijom natrijevog pentobarbitala (60mg/kg intra peritonealno) te potom perfundirani intra-kardijalno 4% otopinom paraformaldehida u 0.12 molarnom puferu natrijevog fosfata (PB, pH= 7,4). Količina fiksativa iznosila je 300ml/100g tjelesne mase štakora. Nakon perfundiranja mozak je odstranjen iz lubanje, dodatno fiksiran jedan sat na sobnoj temperaturi, a zatim ispiran u 0,12 molarnom puferu natrijevog fosfata u trajanju 1,5 sati.

Majmuni su duboko anestezirani ketaminom-HCl, nakon čega su perfundirani intra-kardijalno hladnom otopinom 4% formaldehida u 0,12 molarnom puferu natrijevog fosfata. Mozak je odstranjen te je u koronarnoj ravnini razrezan na veće blokove. Najrostralniji, frontalni blok, sadržavao je polje 14c koje je analizirano u ovoj studiji.

Sve osobe analizirane u ovoj studiji umrle su naglom smrću bez pre-agonalnog stanja te vrijeme od smrti do uzimanja uzorka (postmortalno vrijeme) predstavlja vrijeme od trenutka smrti neurona. Izdvojen je cjelokupan gyrus rectus (rezovi su učinjeni najmanje 2cm od vijuge), koji je zatim koronarnim rezom prepolovljen, tako da je kaudalni blok sadržavao cjelokupno polje 14c. Blokovi su zatim ostavljeni u 4% otopinom paraformaldehida u 0,12 molarnom puferu natrijevog fosfata u trajanju od 24 sata.

4.3 Histološki i imunohistokemijski postupak

Blokovi tkiva (kod štakora cijeli mozak) su nakon fiksacije i ispiranja preko noći na 4°C krioprotektirani u otopini 20% saharoze u fosfatnom puferu. Nakon toga tkivo je brzo smrznuto pomoću suhog leda te koronarno izrezano na kriostatu. Debljina rezova bila je 40µm kod štakora i majmuna te 60µm kod čovjeka.

Rezovi su isprani u 0,01 molarnoj otopini fosfatnog pufera te prikupljani jedan za drugim u za to priređene posudice s krioprotekcijskom otopinom na bazi etilen-glikola (146, 147) i pohranjeni na -20°C. Prije uporabe, otopina fosfatnog pufera i krioprotekcijska otopina su obrađene s 0,05% dietilpirokarbonatom i autoklavirane kako bi se inaktivirala aktivnost RNAaza.

Odabrani rezovi su obrađeni Nissl metodom, jednostrukim imunohistokemijskim bojanjem na kalretinin (CR) te na neuralni nuklearni antigen (NeuN). Pomoću tablice slučajnih brojeva odabran je jedan od prvih deset rezova tkiva, gdje je taj rez obrađen Nissl metodom. Susjedni rez u nizu je imunohistokemijski obrađen protutijelom na kalretinin, a sljedeći u nizu na NeuN. Kod majmuna i čovjeka nizovi od tri susjedna reza obrađeni su na isti način: svakih 10 rezova od prvog obrađenog reza, dok je kod štakora isto napravljeno

nakon svakih 5 rezova. Rezovi obrađeni Nissl metodom su prvo dva puta po 10 minuta uronjeni u 95% alkohol, nakon čega su na 15 minuta uronjeni u otopinu kloroform-etera, a zatim ponovno obrađeni u alkoholu s padajućim postotkom etanola (95%, 85%, 75%; svaka izmjena po dvije minute). Nakon kratkog ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi, rezovi su na 10 minuta stavljeni u krezil-violet na temperaturi 60°C. Nakon drugog kratkog ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi, rezovi su (za svaku otopinu po 2 minute) uronjeni u seriju alkohola s povećavajućom koncentracijom etanola (80%, dva puta u 90%, dva puta u 100%). Konačno, rezovi su tri puta po dvije minute uronjeni u Histomount (National Diagnostics, Atlanta, USA), a nakon toga prekriveni Eukittom (Fisher Scientific, Electron Microscopy Sciences, Washington, USA) i pokrovnim stakalcem.

Jednostruko bojanje na kalretinin i NeuN izvršeno je s neoznačenim primarnim protutijelom te standardnom metodom kompleksa avidin-biotin-peroksidaza (ABC) (Vectastatin Elite ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Rezovi obrađeni na kalretinin inkubirani su 1 sat na sobnoj temperaturi u otopini kalijevog fosfatnog pufera (KPBS) s 0,3% otopinom triton X-100 (KPBS-triton) i 3% normalnim kozjim serumom (NGS, eng. „normal goat serum“) (Vector Laboratories) te inkubirani preko noći na sobnoj temperaturi u KPBS-triton otopini s kalretininskim protutijelom (Swant, Anti-kalretinin protutijelo razvijeno u zecu, kataloški broj 7699/3H) razrijeđenim 1:5000 uz 1% normalnog kozjeg seruma. Rezovi obrađeni na NeuN inkubirani su 1 sat na sobnoj temperaturi u KPBS-triton otopini s 3% normalnog konjskog seruma (NHS, eng. „normal horse serum“) (Vector Laboratories), te ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi u KPBS-triton otopini s NeuN protutijelom (Chemicon, Anti-NeuN protutijelo razvijeno u zecu, kataloški broj AB5060) razrijeđenim 1:8000 uz 1% normalnog konjskog seruma.

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu rezovi su isprani tri puta po 30 minuta u KPBS otopini te inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u otopini sekundarnog protutijela; biotinilirano protutijelo protiv zečjeg IgG razvijeno u koze za kalretininske rezove te biotinilirano protutijelo protiv IgG miša razvijeno u konja (Vector Laboratories). Razrjeđenje sekundarnih protutijela bilo je 1:200 u KPBS-u s 3% normalnog kozjeg (kalretinin) ili normalnog konjskog seruma (NeuN). Nakon toga rezovi su ponovo isprani u KPBS otopini (tri puta po 30 minuta), te inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u otopini avidina (10µL na 1mL) i biotina (10µL na 1mL), pripremljenoj 30 minuta prije upotrebe (Vector Laboratories).

Nakon ispiranja u KPBS otopini, rezovi su procesuirani na 10 minuta u 0,04% otopini 3-3-diaminobenzidina-HCl (DAB) i 0,006% otopini vodikovog peroksida (bidestilirana voda). Nakon toga rezovi su ponovo isprani u KPBS otopini, položeni na želatinizirana stakla,

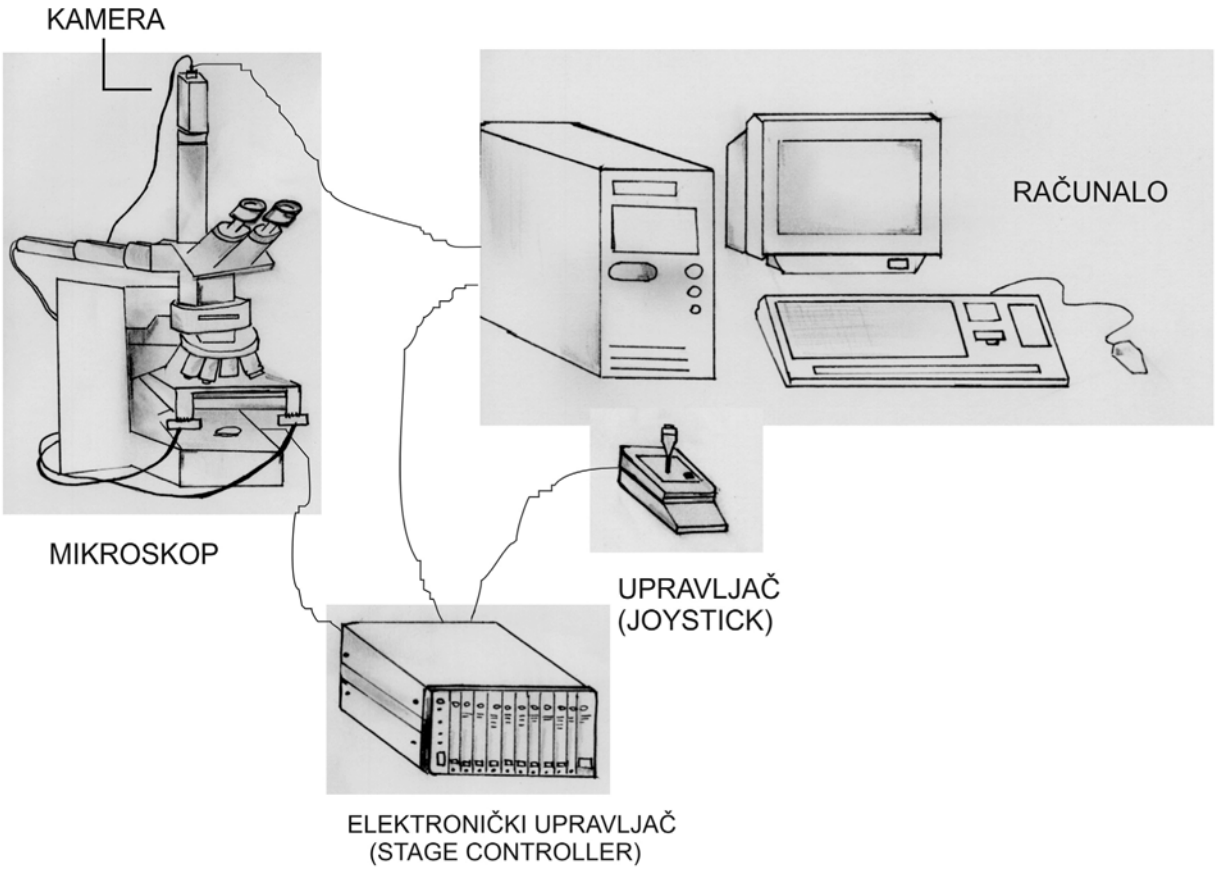
osušeni, dehidrirani te prekriveni Permount-om (Fisher Scientific, Electron Microscopy Sciences, Washington, PA), te nakon toga pokrovnim stakalcem.

4.4 Stereološki postupak

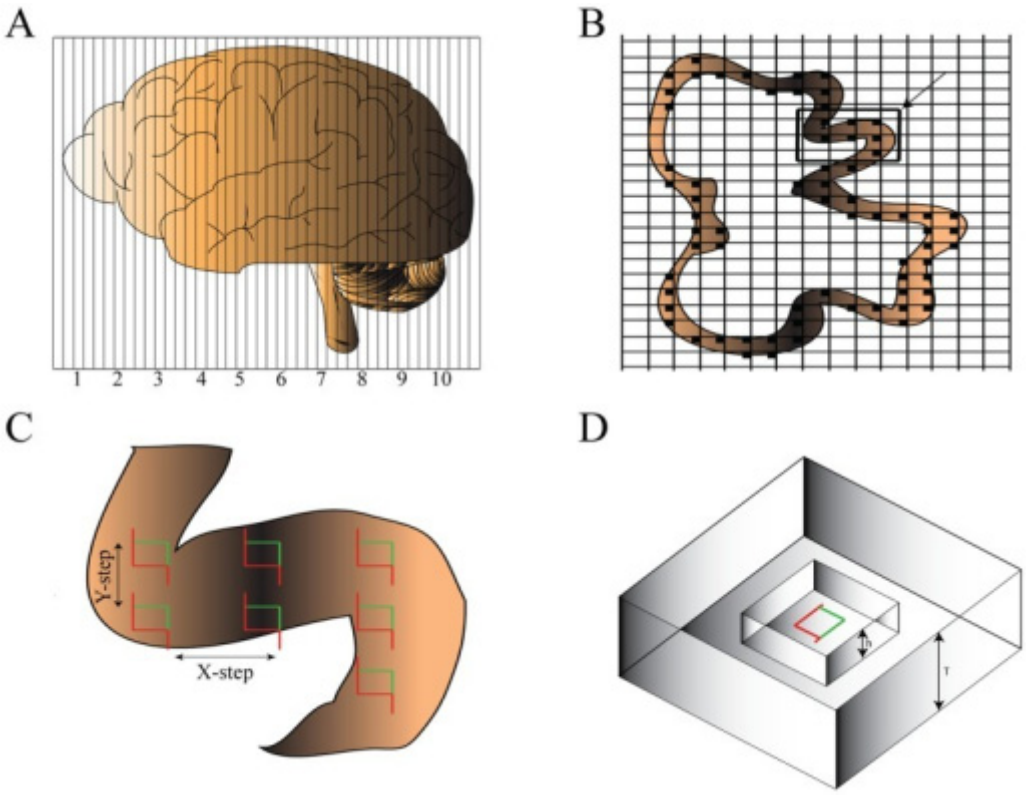
U analizi rezova korištena je metoda optičkog frakcionatora kako bi se odredio ukupan broj neurona u medijalnom orbitalnom polju štakora i kaudalnom dijelu polja 14c. Nakon što su određene granice polja, ocrtane su granice slojeva I, II/III, V, VI, te je procijenjen ukupan broj kalretininskih i NeuN pozitivnih neurona.

Analiza rezova provedena je na mikroskopsko-računalnom sustavu koristeći računalni program Stereo Investigator (MicroBrightfield, Baltimore, MD) (Slika 4-1). Sustav korišten u Marseillu sastoji se od računala povezanog na digitalnu video kameru (DEI-470, Optronics, Santa Barbara, CA) povezanim s Nikon mikroskopom (Optiphot, Nikon, Melville, NY). Mikroskop je opremljen motoriziranim stolićem (MAC 2000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY) te sustavom linearnog kodiranja fokusa sa točnošću od 0,25µm u odnosu na apsolutnu točku fokusiranja (Heidenhein Corp, Schamburg IL) što osigurava točnu stereološku analizu na leći povećanja 100X. Sustav korišten u Zagrebu sastoji se od MBF-DV-46 digitalne kamere koja se nalazi na Olympus BX61 mikroskopu motoriziranom za kretanje u dubinu te motoriziranog stolića za pokretanje u x-y smjeru i koji je kontroliran MAC 5000 elektroničkim upravljačem (Ludl Electronic Products Ltd.).

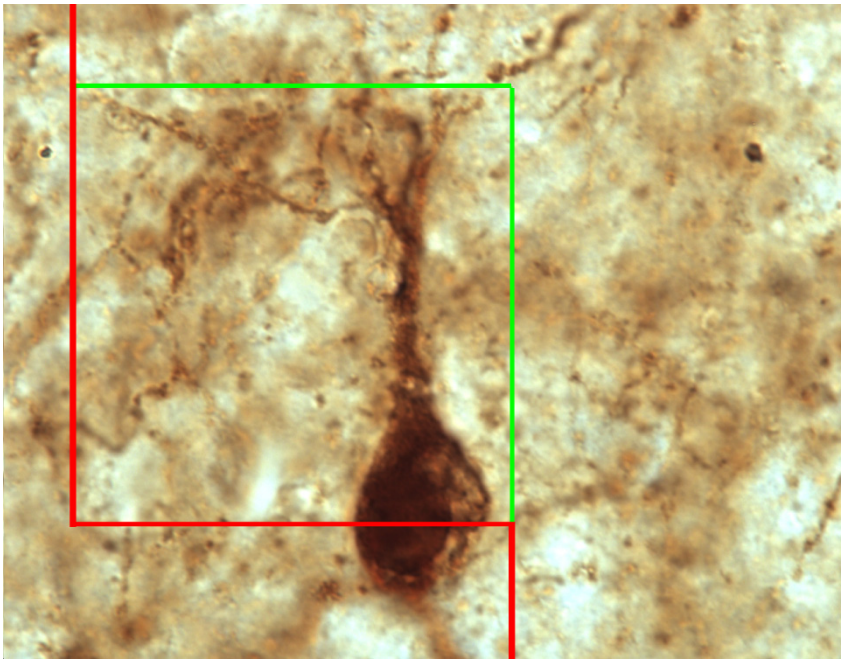
Brojanje neurona izvršeno je pomoću računalne trodimenzionalne probe definirane površinom 'okvira za brojanje' („counting frame“) (148) te odabranom visinom disektora (koja je u ovoj studiji varirala od 10–20µm) (Tablica 4-1, Slika 4-2). Visina disektora odabrana je prema realnoj debljini tkiva (14–23µm) od čega se oduzima 'sigurnosna zona' u debljini od 2µm sa svake strane reza, s obzirom na neravnine reza na rubovima. Stvarna debljina rezova rezultat je smanjenja debljine („shrinkage“) koja se dogodila tijekom histoloških bojenja, jer su debljine rezova iznosile 40µm za štakora i majmuna, te 60µm za čovjeka. Veličina okvira za brojanje kretala se između 45x45µm i 70x70µm, ovisno o analiziranoj vrsti i imunocitokemijskom bojanju. Označeni su samo oni neuroni kojima je tijelo bilo u potpunosti unutar okvira za brojanje ili se preklapalo sa gornjom ili desnom granicom okvira te neuronima kojima je tijelo došlo u fokus prilikom kretanja od vrha do dna disektorske probe (Slika 4-3). Neuroni kojima je tijelo dodirivalo crvene, isključujuće granice (lijevu te donju) ili kojima je tijelo dolazilo u fokus tek ispod donje/gornje granice disektorske probe, nisu označeni.



Slika 4-1: Shematski prikaz sustava za stereološku analizu. Računalni program upravlja mikroskopom koristeći elektronički upravljač. Preko digitalne kamere visoke rezolucije slika se projicira u program koji je prikazuje na monitor, a u kojemu se provodi stereološko označavanje.



Slika 4-2: Prikaz temeljnih koraka u stereološkoj studiji: (A) Serijsko izrezivanje cijele strukture na rezove jednake debljine; (B) Određivanje dimenzija mreže za uzorkovanje (učestalost okomitih i vodoravnih linija na čijim sjecištima se pozicioniraju okviri za prebrojavanje; (C) Prikaz nekoliko, pravilno i ujednačeno raspoređenih okvira za prebrojavanje; (D) Visina okvira za prebrojavanje se odabire tako da bude manja od izmjerene debljine tkiva nakon završenog bojenja.
Slika preuzeta iz Hou i sur. 2012, PLoS One 7:e43556 (148).



Slika 4-3: Realni okvir za prebrojavanje kako je vidljiv na povećanju od 100x. Prikazane su linije uključivanja (zeleno) i isključivanja (crveno). Na fotografiji je kalretininski interneuron koji presijeca crvenu liniju isključivanja te se stoga ne bilježi.

Preciznost procjene kontrolirana je pomoću 'koeficijenta greške' (CE) (149, 150). Vrijednost CE je bila 0,08 (8%) ili manja za procijenjene vrijednosti NeuN-a, dok se za kalretininske rezove kretala od 0,07 do 0,21, ovisno o vrsti i sloju (Tablica 4-1). Za dobivanje procjene ukupnog broja NeuN i kalretininskih neurona po pojedinom sloju korišten je Stereo Investigator program (MicroBrightField, Williston, USA). Nakon toga je izračunata srednja vrijednost procjene ukupnog broja neurona, zajedno sa standardnom devijacijom.

4.5 Statistička analiza

Brojčani podaci su statistički analizirani jednosmjernom analizom varijanci koristeći Student-Newman-Keuls test, a p vrijednosti ispod 0,05 označene su kao statistički značajne razlike.

Kvantitativno su analizirani:

1. Ukupan volumen polja, kao i volumen svakog pojedinog sloja;
2. Na preparatima obojenim NeuN-protutijelom koje obilježava sve neurone i onima obojenim protutijelom koje obilježava samo kalretininske neurone, pojedinačno i po slojevima analizirani su sljedeći parametri:
    a. Ukupan broj neurona,
    b. Ukupan broj kalretinskih neurona;
    c. Gustoća neurona;
    d. Gustoća kalretininskih neurona.

Na temelju ovih podataka analizirani se sljedeći parametri:

3. Udio neurona u pojedinom sloju u odnosu na ukupan broj neurona;
4. Udio kalretininskih neurona u ukupnom broju neurona, po pojedinom sloju i ukupno kroz sve slojeve;
5. Udio kalretininskih neurona u pojedinom sloju u odnosu na ukupan broj kalretininskih neurona.

Za usporedbu između vrsta analizirani su sljedeći parametri

Po slojevima i ukupno za cijelo polje analizirani su:

1. Ukupan volumen;
2. Ukupan broja neurona;
3. Ukupan broj kalretininskih neurona;
4. Udio kalretininskih neurona u ukupnom broju neurona;

Zatim su analizirani:

5. Udio ukupnog broja neurona po pojedinom sloju u odnosu na ukupan broj neurona;
6. Udio kalretininskih neurona po pojedinom sloju u odnosu na ukupan broj kalretininskih neurona;

Između svake vrste po pojedinim sloju i ukupno analizirani su sljedeći parametri:

7. Stopa promjene volumena;
8. Stopa promjene udjela volumena;
9. Stopa promjene ukupnog broja neurona;
10. Stopa promjene udjela neurona prema ukupnom broju neurona;
11. Stopa promjene ukupnog broja kalretininskih neurona;
12. Stopa promjene udjela kalretininskih neurona u ukupnom broju neurona;
13. Stopa promjene udjela kalretininskih neurona u ukupnom broju kalretininskih neurona.

Na kraju su analizirane i ukupne razlike između slojeva u obrascu promjena između štakora i majmuna te majmuna i čovjeka.

Tablica 4-1A – Prikaz stereoloških parametara korištenih u analizi tkiva: veličina okvira za prebrojavanje te dimenzije mreže za uzorkovanje.

.

Parametri stereološke analize 1

Tkivo obrađeno NeuN

Kortikalni sloj	Veličina okvira za prebrojavanje (µm)							Dimenzije mreže za uzorkovanje tkiva (µm)						
	Štakor	**Rhesus**			**Čovjek**			**Štakor**	**Rhesus**			**Čovjek**		
		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379
I	65 x 65	45 x 45	45 x 45	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	75 x 75	130 x 130	130 x 130	240 x 300	285 x 180	500 x 500	300 x 300
II	65 x 65	45 x 45	45 x 45	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	155 x 155	200 x 200	200 x 200	425 x 575	640 x 495	1000 x 1000	480 x 460
III	65 x 65							170 x 170						
V	65 x 65	45 x 45	45 x 45	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	190 x 150	200 x 200	200 x 200	285 x 500	370 x 315	800 x 1000	290 x270
VI	65 x 65	45 x 45	45 x 45	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	90 x 100	200 x 200	200 x 200	250 x 250	335 x 345	800 x 1000	160 x 150

Tkivo obrađeno na kalretinin

Kortikalni sloj	Veličina okvira za prebrojavanje (µm)							Dimenzije mreže za uzorkovanje tkiva (µm)						
	Štakor	**Rhesus**			**Čovjek**			**Štakor**	**Rhesus**			**Čovjek**		
		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379
I	65 x 65	70 x 70	70 x 70	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	65 x 65	120 x 85	120 x 85	125 x 195	195 x 210	325 x 310	150 x 150
II	65 x 65	70 x 70	70 x 70	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	65 x 65	140 x 100	140 x 100	165 x 275	310 x 325	400 x 380	240 x 230
III	65 x 65							65 x 65						
V	65 x 65	70 x 70	70 x 70	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	65 x 65	100 x 110	100 x 110	100 x 220	160 x 110	210 x 190	145 x135
VI	65 x 65	70 x 70	70 x 70	50 x 50	50 x 50	70 x 70	70 x 70	65 x 65	90 x 125	90 x 125	65 x 190	170 x 95	150 x 140	80 x 75

Tablica 4-1B – Prikaz stereoloških parametara korištenih u analizi tkiva: visina disektora te debljina rezova.

Parametri stereološke analize 2														
Tkivo obrađeno na NeuN														
Kortikalni sloj	Visina disektora (µm)							Debljina reza (µm)						
	Štakor	**Rhesus**			**Čovjek**			**Štakor**	**Rhesus**			**Čovjek**		
		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379
I	14	14	14	10	15	10	10	20	20	20	14	17	20	19
II	14	14	14	10	15	17	14	20	20	20	14	20	24	22
III	14							20						
V	14	14	14	10	15	20	20	20	20	20	15	22	27	23
VI	14	14	14	10	15	20	20	20	20	20	16	23	29	24
Tkivo obrađeno na kalretinin														
Kortikalni sloj	Visina disektora (µm)							Debljina reza (µm)						
	Štakor	**Rhesus**			**Čovjek**			**Štakor**	**Rhesus**			**Čovjek**		
		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379		Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379
I	14	14	14	10	14	10	10	20	20	16	16	17	19	19
II	14	14	14	10	14	14	14	20	18	20	15	18	22	22
III	14							20						
V	14	14	14	10	14	17	20	20	18	17	15	19	24	23
VI	14	14	14	10	14	20	20	20	18	16	16	21	25	24

Tablica 4-2: Prikaz vrijednosti Gundersenovog koeficijenta greške (N/A – nije analiziran).

Kortikalni sloj	CE Gundersen (m=1), za NeuN								
	Štakor			**Rhesus**			**Čovjek**		
	R 529	R 530	R 531	Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379
I	0,07	0,06	0,06	0,06	N/A	0,08	0,10	0,06	0,06
II	0,04	0,03	0,03	0,03	N/A	0,05	0,11	0,05	0,05
III	0,04	0,04	0,05						
V	0,04	0,04	0,04	0,04	N/A	0,06	0,10	0,05	0,05
VI	0,04	0,03	0,04	0,05	N/A	0,06	0,11	0,06	0,06
Kortikalni sloj	CE Gundersen (m=1), za CR								
	Štakor			Rhesus			Čovjek		
	R 529	R 530	R 531	Majmun V	Majmun VI	Majmun VII	ČO 376	ČO 378	ČO 379
I	0,09	0,13	0,11	0,05	N/A	0,06	0,12	0,06	0,08
II	0,07	0,07	0,07	0,03	N/A	0,05	0,13	0,04	0,08
III	0,08	0,1	0,1						
V	0,1	0,15	0,12	0,05	N/A	0,09	0,15	0,04	0,1
VI	0,22	0,24	0,21	0,08	N/A	0,07	0,19	0,05	0,1

4.6 Postupak ubrizgavanja i identifikacije virusa bjesnoće

Virus bjesnoće (151, 152) koristio se za identifikaciju neurona koji pružaju projekcije u medio-orbitalno polje štakora. Eksperiment je proveden u laboratoriju sigurnosne razine L2L u Institutu de Neuroscience La Timone Marseille (uz nadzor voditelja laboratorija Dr. Patrice Coulon). Upotrijebljen je imortalizirani soj virusa bjesnoće 'Challenge Virus Standard' (151, 153, 154). Virusna zaliha, kao supernatant stanične kulture u minimalnom esencijalnom mediju (s infektivnom koncentracijom virusa od 4107 infektivnih čestica u mililitru) čuva se smrznuta na -80°C sve do uporabe.

Pet Wistar štakora anestezirano je klor-hidratom, nakon čega su pričvršćeni u stereotaksijski uređaj te je napravljen mali otvor na lubanji. Igla je stereotaksijski uvedena koristeći Paxinos i Watson atlas (155) pod sljedećim koordinatama; naprijed 3–4mm od bregme, lateralno 0.4–1mm od mediosagitalne linije, dubina 2–4mm od kortikalne površine. Virus bjesnoće (otopina 200nL) ubrizgan je korištenjem ultra-mikro-pumpe UMPII i Micro4 kontrolera (World Precision Instruments Inc, Sarasota, FL). Nakon postupka igla je odstranjena te je koža sašivena. Na mjestu zahvata primijenjen je lokalni anestetik te su životinje vraćene u svoje kaveze i čuvane u laboratoriju 42 sata. To je vrijeme potrebno da virus retrogradno trans-sinaptički putuje kroz aksone i u dovoljnoj količini se nakupi u tijelu i dendritima kako bi se omogući identifikacija (151).

Nakon 42 sata životinje su eutanazirane i mozak obrađen kao i za histološku analizu. Identifikacija virusa izvršiti će se imunocitokemijski korištenjem monoklonalnog protutijela razvijenog u laboratoriju (P. Coulon) po proceduri opisanoj u poglavlju 4.3 (154). U tri štakora bilo je jasno identificirano kako je igla bila točno u medio-orbitalnom polju, te je opis aferentnih projekcija medio-orbitalnog područja temeljen na obilježenim neuronima kod ovih životinja.

5. REZULTATI

5.1 KVALITATIVNA ANALIZA

5.1.1 Citoarhitektonska obilježja i delineacija polja za kvantitativnu analizu

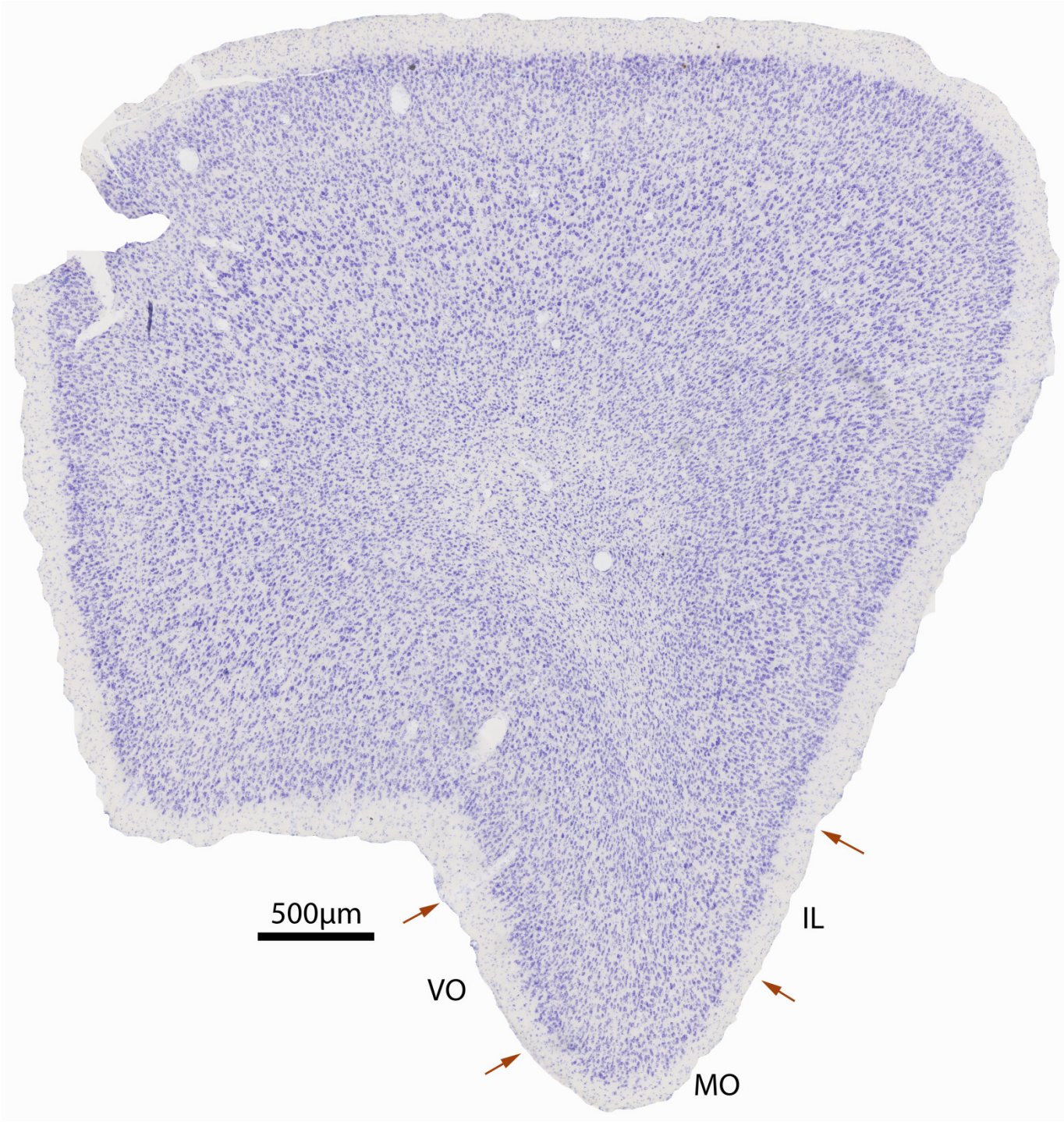
5.1.1.1 Medio-orbitalno polje u štakora

Medio-orbitalno (MO) polje nalazi se na granici medijalne i orbitalne plohe štakorskog čeonog režnja (Slika 5-1, 5-2, 5-3). Za citoarhitektonsku identifikaciju MO polja korišteni su kriteriji opisani u radu Van De Werd i Uylings (2008) (135). Glavne odlike MO polja su: a) smještaj na ventro-medijalnoj granici čeonog režnja štakorskog mozga; b) nemogućnost jasnog definiranja sloja IV, agranularni korteks; c) sloj II je moguće jasno identificirati i dobro ograničiti od slojeva I i III; d) sloj V ima neurone organizirane u stupiće.

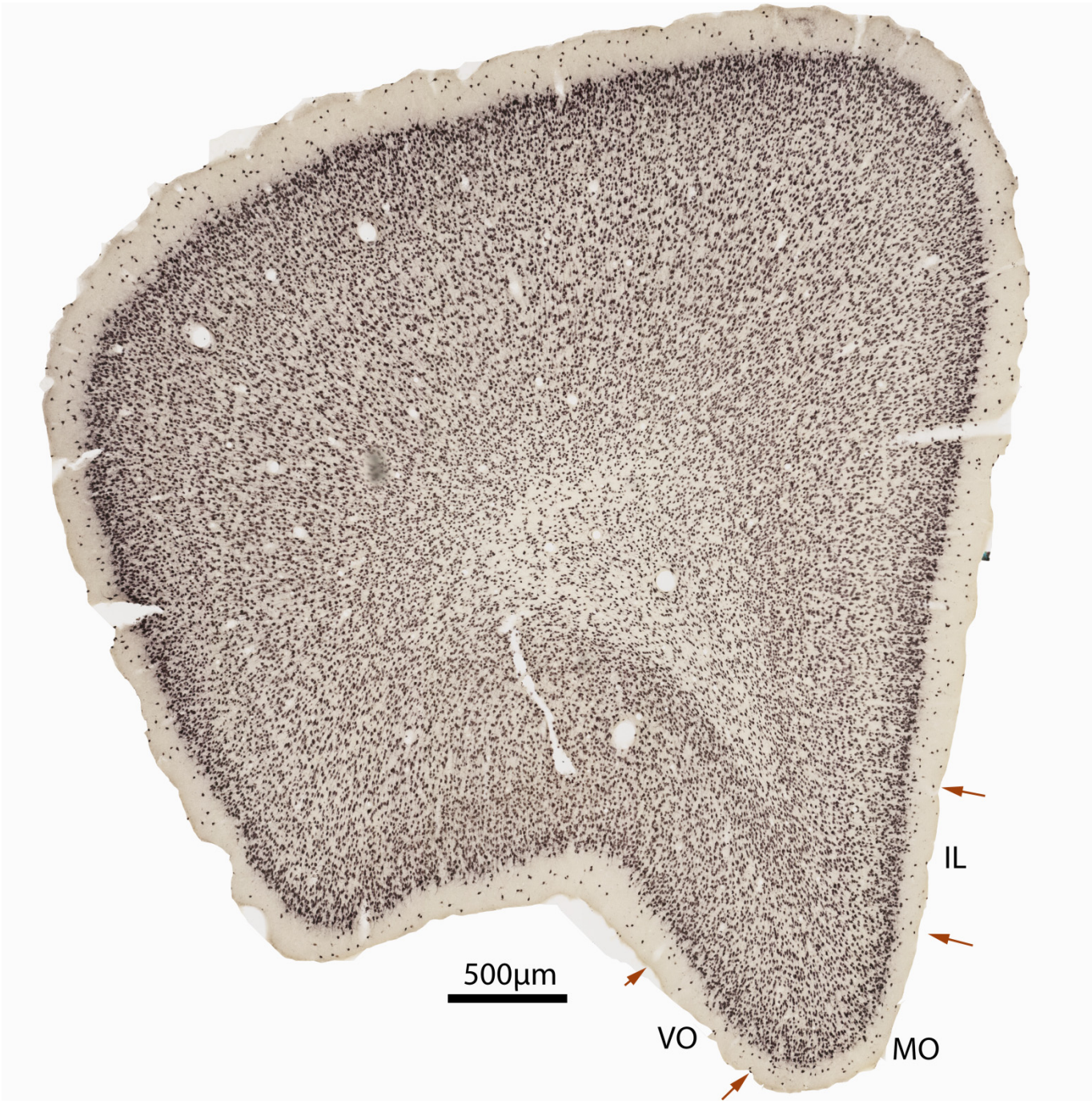
Neposredno lateralno od MO je ventro–orbitalno (VO) polje. Citoarhitektonska granica je jasno vidljiva na Nissl i NeuN preparatima, jer MO polje ima oštriju granicu prema sloju III, dok je granica sloja II prema sloju III manje izražena u VO polju, a gustoća neurona u sloju III manja je u MO nego u VO polju. Također, stanice sloja V MO polja organizirane su u vertikalne stupiće, dok to svojstvo nema VO polje.

MO polje medijalno graniči s dva kortikalna polja – prelimbičkim (PL) poljem kranijalno te infralimbičkim (IL) poljem kaudalno. Citoarhitektonska razlika prema PL polju je jasno vidljiva jer stanice sloja III imaju slabije bojanje po Nisslu. Zbog toga je na malom povećanju sloj III svjetliji, što za razliku od MO polja omogućava postavljanje jasnih granica i prema sloju II i prema sloju V. Također, PL polje nema vertikalne stupiće stanica u sloju V.

Kaudalnije je MO polje s medijalne strane ograničeno s IL poljem, od kojeg se najupečatljivije razlikuje po nejasnoj granici između slojeva I i II u IL polju, dok je ta granica u MO polju jasno izražena.



Slika 5-1: Mikrofotografija koronalnog reza kroz čeoni režanj štakora obojanog Nissl metodom. Strelice označavaju granice medio-orbitalnog (MO), ventro-orbitalnog (VO) i infralimbičkog (IL) polja.



Slika 5-2: Mikrofotografija koronalnog reza kroz čeoni režanj štakora obojanog imunohistokemijski na NeuN. Strelice označavaju granice medio-orbitalnog (MO), ventro-orbitalnog (VO) i infralimbičkog (IL) polja.

Slika 5-3: Mikrofotografija koronalnog reza kroz čeoni režanj štakora obojanog imunohistokemijski na kalretinin. Strelice označavaju granice medio-orbitalnog (MO), ventro-orbitalnog (VO) i infralimbičkog (IL) polja.

5.1.1.2 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u majmuna

Brodmannovo polje 14 zauzima veći dio gyrus rectus (139). Prema Carmichael i Price (1994) (132) glavne odlike Brodmannovog polja 14 kaudalno (14c) u makaki majmuna su: a) smještaj na ventro-medijalnoj granici čeonog režnja majmuna; b) agranularnost korteksa jer nije moguće jasno definirati sloj IV (Slika 5-4); c) sloj II također nije moguće jasno ograničiti od sloja III; d) posjeduje debela mijelinizirani aksoni u sloju I koji imaju intenzivnu reaktivnost na acetil-kolin-esterazu u slojevima I, III te V.

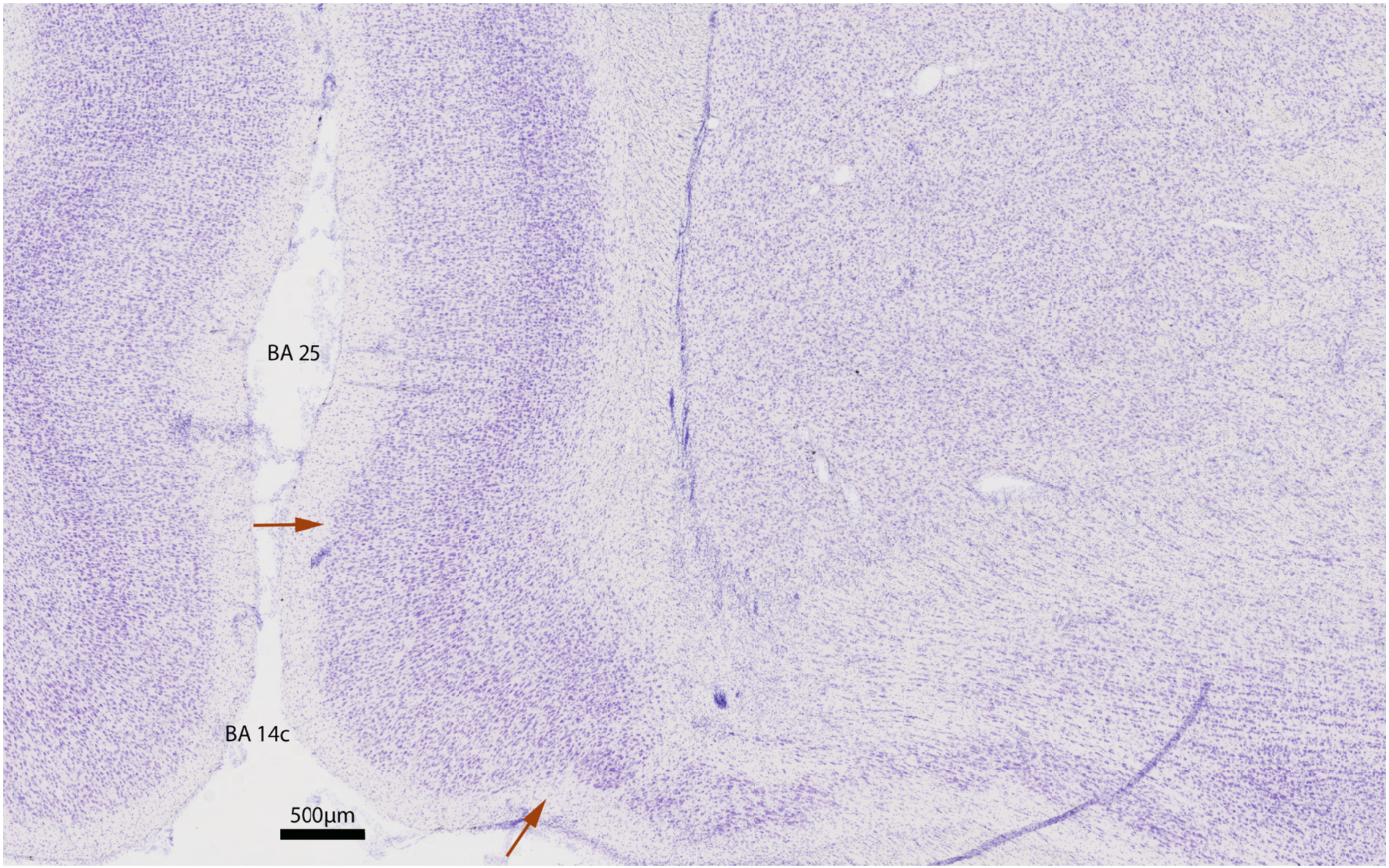
Polje 14 dijeli se na rostralni (14r) i kaudalni dio (14c). Glavna citoarhitektonska razlika polja 14c u odnosnu na rostralni dio (14r) je nemogućnost da se polju 14c identificira sloj IV (agranularni korteks), dok je u rostralnom dijelu sloj IV diskretan, ali jasno prepoznatljiv i razgraničen prema susjednim slojevima (disgranularni korteks). Osim izostanka sloja IV, polje 14c ima vrlo slabo razvijen sloj II, čiju granicu prema sloju III nije moguće jasno odrediti. Zanimljivo je kako je u MO polju štakora moguće jasno razgraničiti sloj II od sloja III, te je to najizraženija citoarhitektonska razlika u odnosu na polje 14c u primata. Zbog nemogućnosti jasnog definiranja granice između sloja II i III, za potrebe kvantitativne analize podaci iz ova dva sloja skupno su prikazani.

Na medijalnoj strani, polje 14c graniči s poljem 25 (Slika 5-4, 5-5, 5-6), osim u svom najrostralnijem gdje graniči s poljem 10 medijalno (10m). Polje 25 je također agranularno, s nejasno izraženim slojem II. Jasnu granicu između ova dva polja moguće je ipak vrlo lako postaviti jer je sloj VI u polju 25 izrazito tanak, te naglo zadeblja u polju 14c.

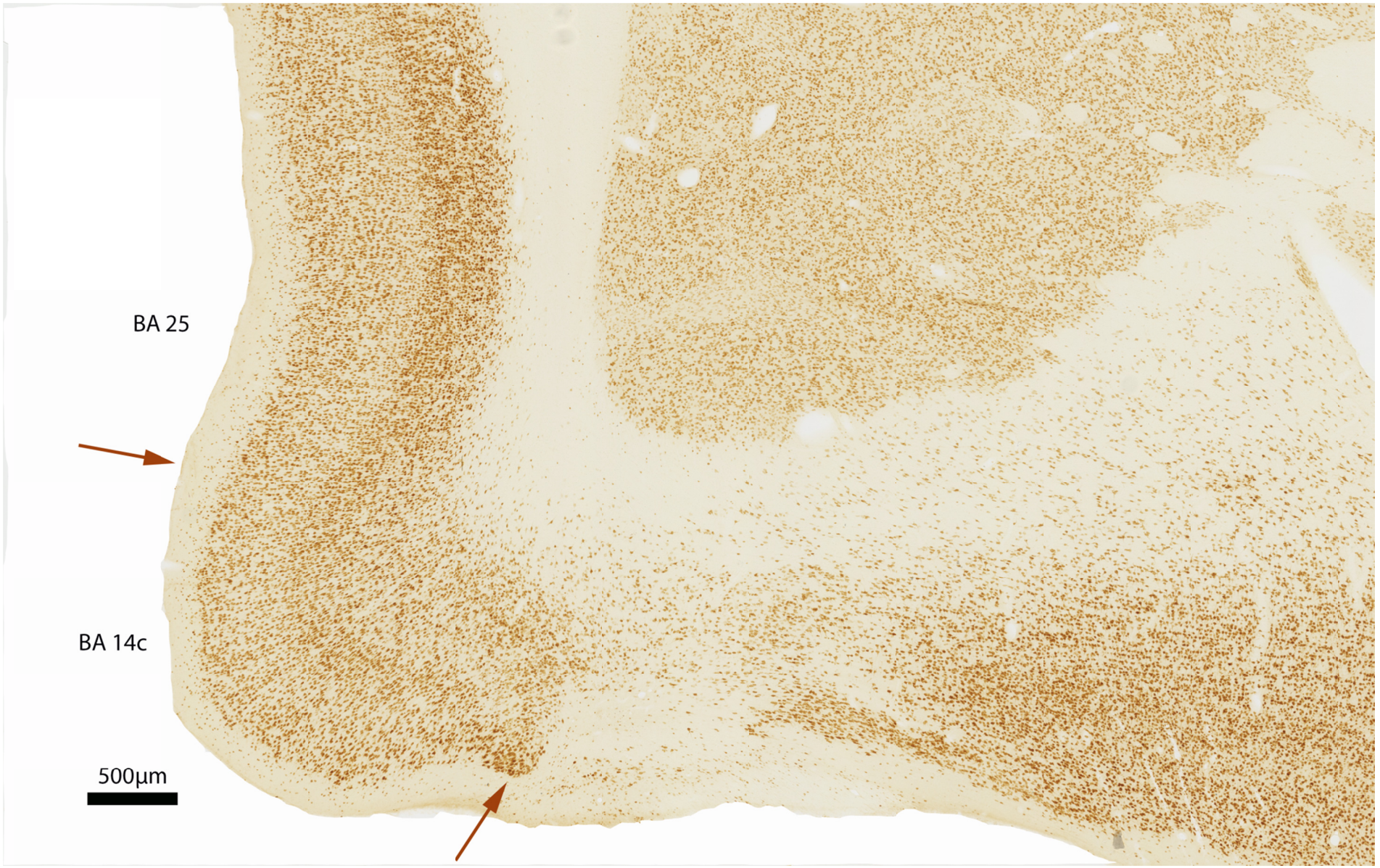
U prednjem dijelu polje 14c jasno je razgraničeno od polja 10m jer je ono dobro razvijeni granularni korteks s tri jasna podsloja u sloju III.

Lateralno od polja 14c je polje 13a, gdje sloj V postaje širi i pokazuje dva podsloja u kojima su piramidne stanice organizirane u obliku otočića. Rostralno je polje 14r, koje se od polja 14 c razlikuje po pojavi diskretnog sloja IV i jasno ograničenog sloja II.

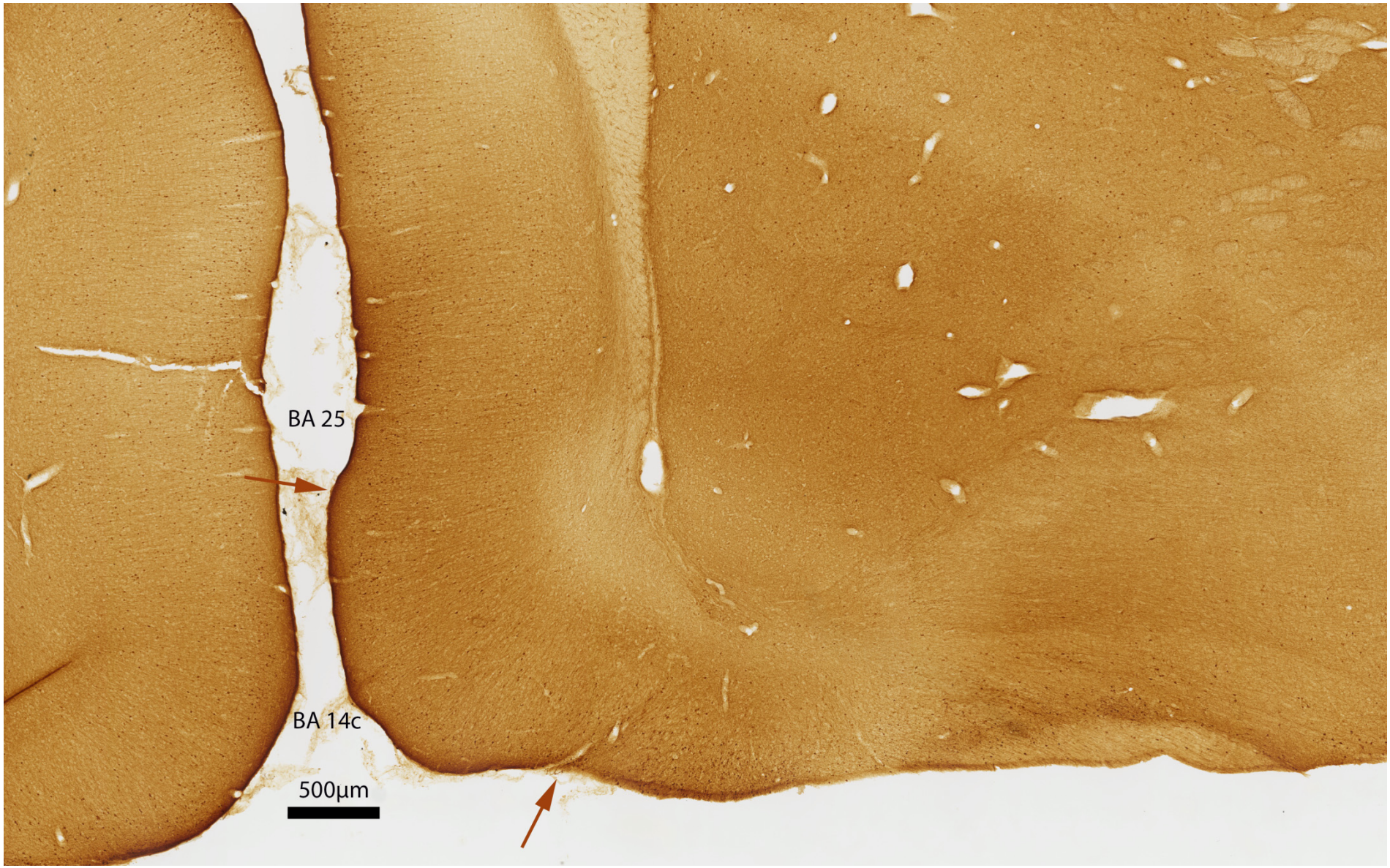
Kaudalnu granicu polja 14c čini zapravo olfaktorni tuberkul. To je citoarhitektonski bitno različita struktura koja ima samo tri sloja, površni pleksiformni, stanični srednji sloj te duboki sloj. U ovom polju u svim slojevima dominiraju ograničene gusto zbijene nakupine neurona, Calleja otočići.



Slika 5-4: Mikrofotografija koronalnog reza kroz čeoni režanj majmuna obojanog Nissl metodom. Strelice označavaju granice Brodmannovog polja (BA) 14 kaudalno (c). Polje 25 nalazi se na medijalnoj plohi iznad polja 14c.



Slika 5-5: Mikrofotografija koronalnog reza kroz čeoni režanj majmuna obojanog imunohistokemijski na NeuN. Strelice označavaju granice Brodmannovog polja (BA) 14 kaudalno (c). Polje 25 nalazi se na medijalnoj plohi iznad polja 14c.



Slika 5-6: Mikrofotografija koronalnog reza kroz čeoni režanj majmuna obojanog imunohistokemijski na kalretinin. Strelice označavaju granice Brodmannovog polja (BA) 14 kaudalno (c). Polje 25 nalazi se na medijalnoj plohi iznad polja 14c.

5.1.1.3 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u čovjeka

Polje 14 nalazi se unutar gyrus rectus te u izvornom Brodmannovom opisu (139) ljudskog korteksa nije bilo definirano. Brodmann je zaključio kako u ljudskom mozgu ne postoji korelat područja 14 kojega je definirao kod majmuna, no kasnija su istraživanja pokazala da ovo područje ima kod čovjeka ipak jasan korelat (133). Na Brodmannovoj mapi orbitalna ploha čeonog režnja označena je kao polje 11, i u krajnjem lateralnom području kao polje 47.

Beck je 1949. godine označila gyrus rectus kao polje 14 i opisala disgranularni korteks u kaudalnom dijelu orbitofrontalne kore koji rostralno postaje granularan (153, 156). Komparativnom citoarhitektonskom studijom Petrides i Pandya (1994) (157) su u čovjeka i majmuna ograničili polje 14 na ventro-medijalni konveksitet, polje 13 u medijalni, polje 47/12 u lateralni, te polje 11 u prednji dio orbitofrontalne kore. Ongur i Price u čovjeka prema istim kriterijima definiraju i podjelu polja 14 (133) kao što su Carmichael i Price (1994) (132) definirali u makaki majmuna; dijele ga na rostralni disgranularni te kaudalni agranularni dio. Ipak je upečatljivo da se debljina korteksa kod čovjeka gotovo udvostručila, uz izrazito smanjenje gustoće neurona.

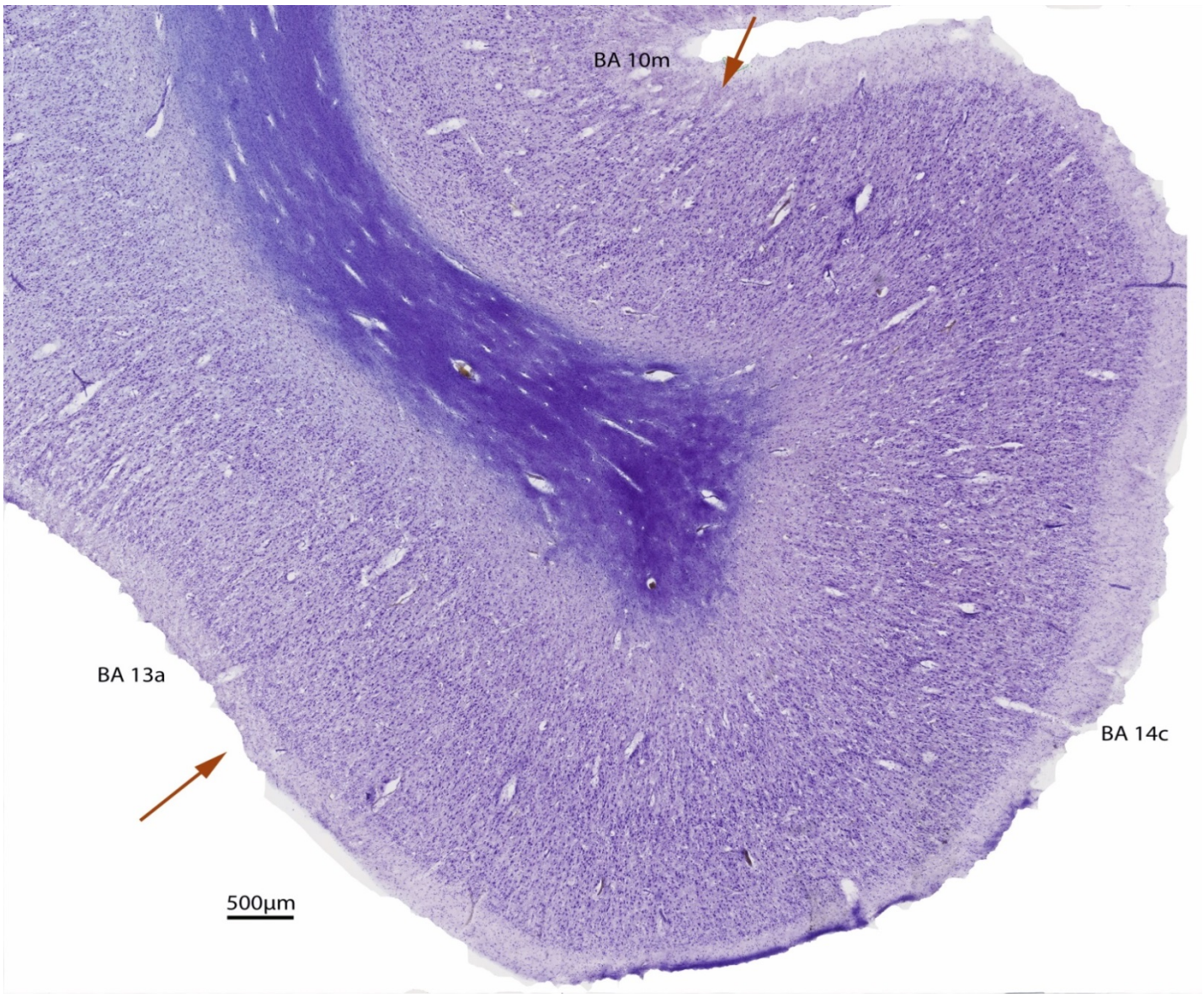
Kod čovjeka ovo polje ne zauzima cijeli gyrus rectus (Slika 5-7, 5-8, 5-9), već se u lateralnom dijelu uz olfaktorni sulkus kaudalno nalazi polje 13a, a rostralno polje 13b.

Na medijalnoj strani od kaudalno prema rostralno polje 14c graniči s poljima 25, 32-prelimbičko (pl) te 10-medijalno (m). Granice prema poljima 10m, 13a i 25 jasne su i određene prema kriterijima korištenim kod majmuna, jer u usporedbi s čovjekom nema nikakvih razlika u citoarhitektonskim obilježjima ovih polja.

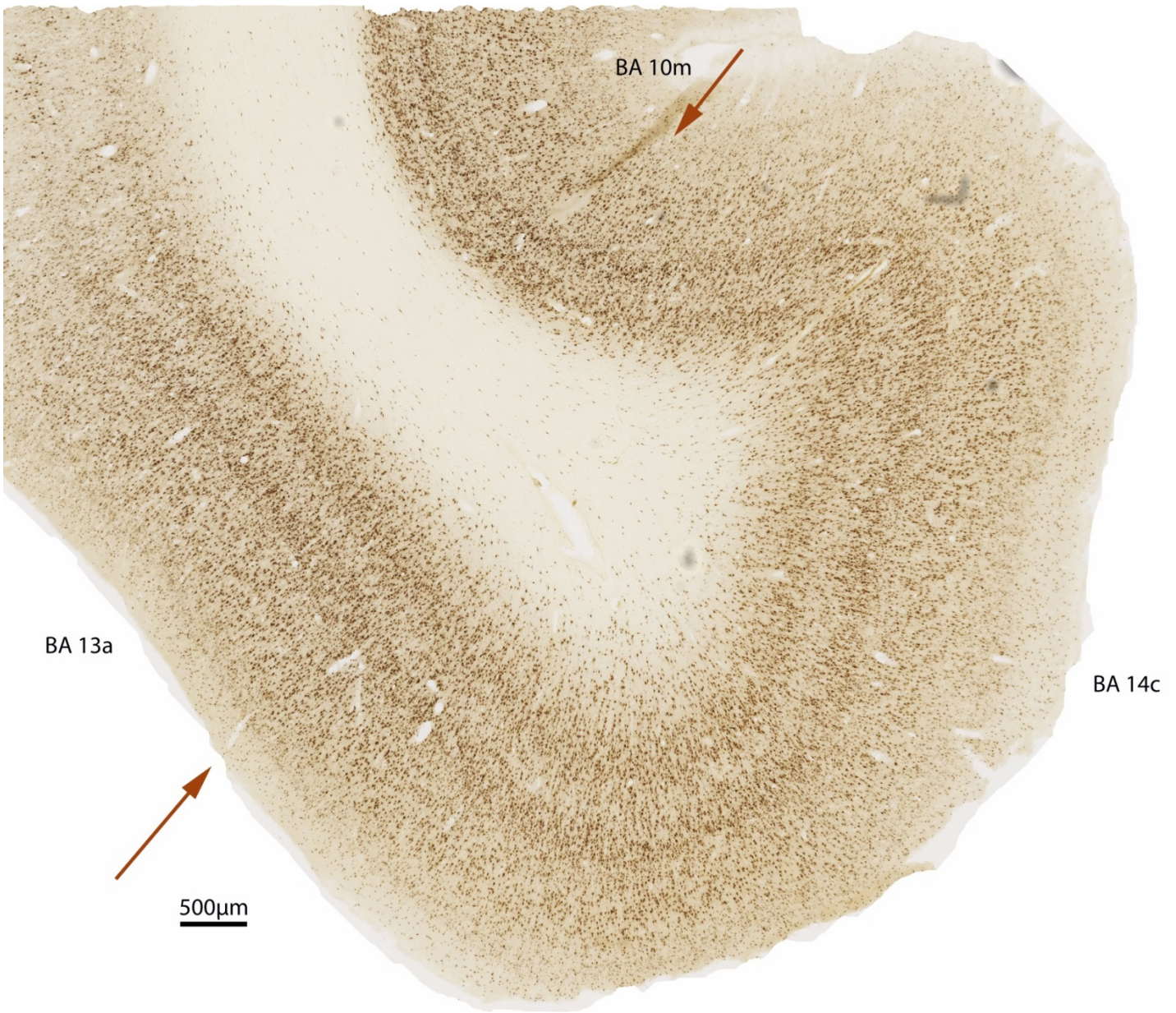
Tako je granicu prema polju 25 još i lakše definirati nego u majmuna, jer kod čovjeka u polju 25 nije moguće razgraničiti sloj II od sloja III, niti sloj V od sloja VI.

Granica prema polju 32pl također je jasna, jer kao i polje 13 ima jasno izražena dva podsloja unutar sloja VI.

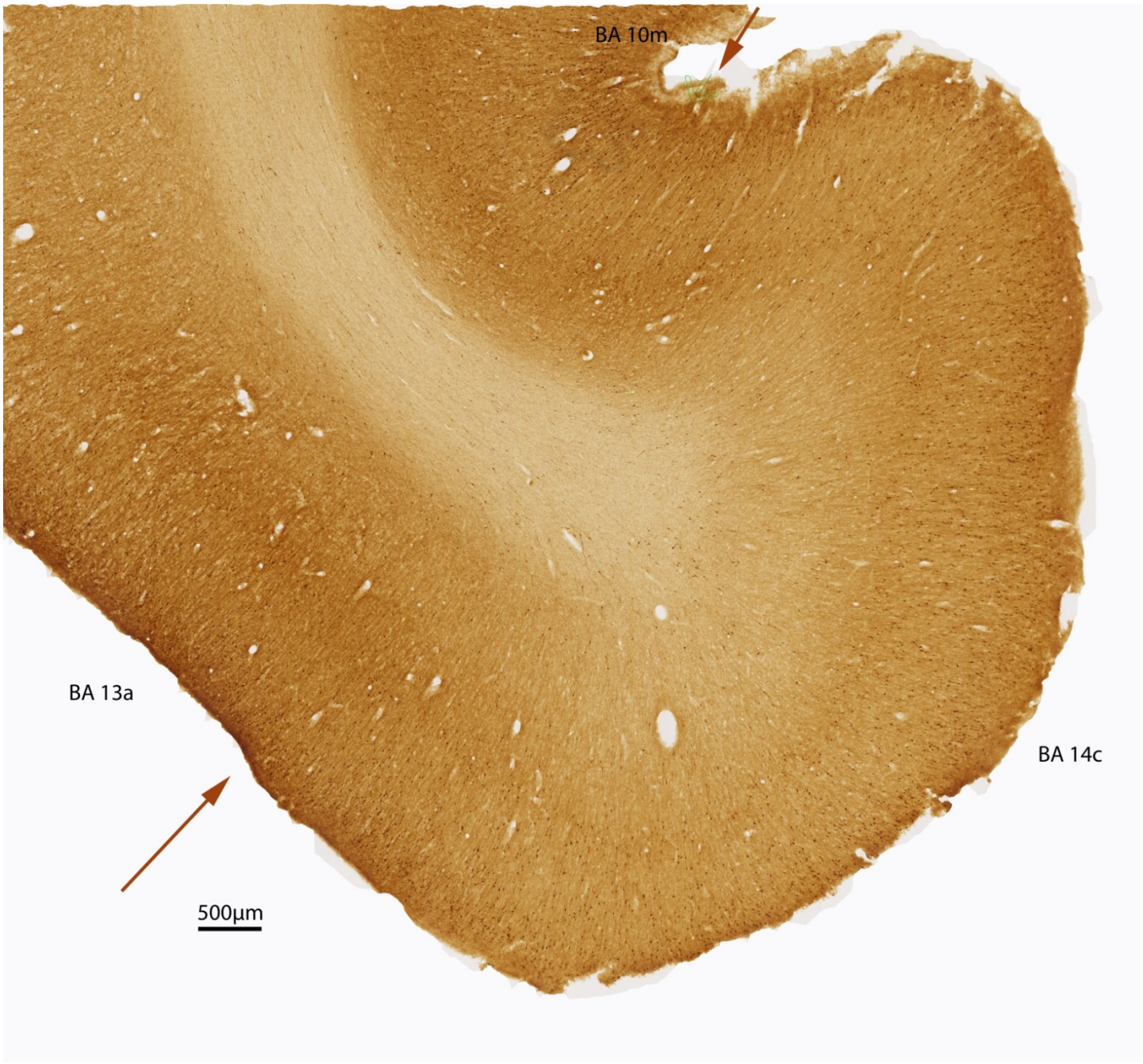
Prednja granica polja 14c je polje 14r koje se prepoznajemo po pojavi sloja IV, te jasnije izraženoj sublaminaciji sloja V na Nissl rezovima.



Slika 5-7: Mikrofotografija koronalnog reza kroz gyrus rectus čovjeka obojanog Nissl metodom. Označene su granice polja – Brodmannovo polje (BA) 14 kaudalno (c), polje 10 medijalno (m) te polje 13a u olfaktornom žlijebu.



Slika 5-8: Mikrofotografija koronarnog reza kroz Gyrus rectus čovjeka obojanog imunohistokemijski na NeuN. Označene su granice polja – Brodmannovo polje (BA) 14 kaudalno (c), polje 10 medijalno (m) te polje 13a u olfaktornom žlijebu.



Slika 5-9: Mikrofotografija koronarnog reza kroz Gyrus rectus čovjeka obojanog imunohistokemijski na kalretinin. Označene su granice polja – Brodmannovo polje (BA) 14 kaudalno (c), polje 10 medijalno (m) te polje 13a u olfaktornom žlijebu.

5.1.2 Obilježja aferentnih projekcija medio-orbitalnog polja u štakora

Kako su rezultati pokazali jasnu homologiju u citoarhitektonskim obilježjima između polja 14c kod majmuna i čovjeka s medio-orbitalnim (MO) poljem u štakora, cilj je bio potvrditi da postoji i homologija u aferentnim projekcijama ovih polja.

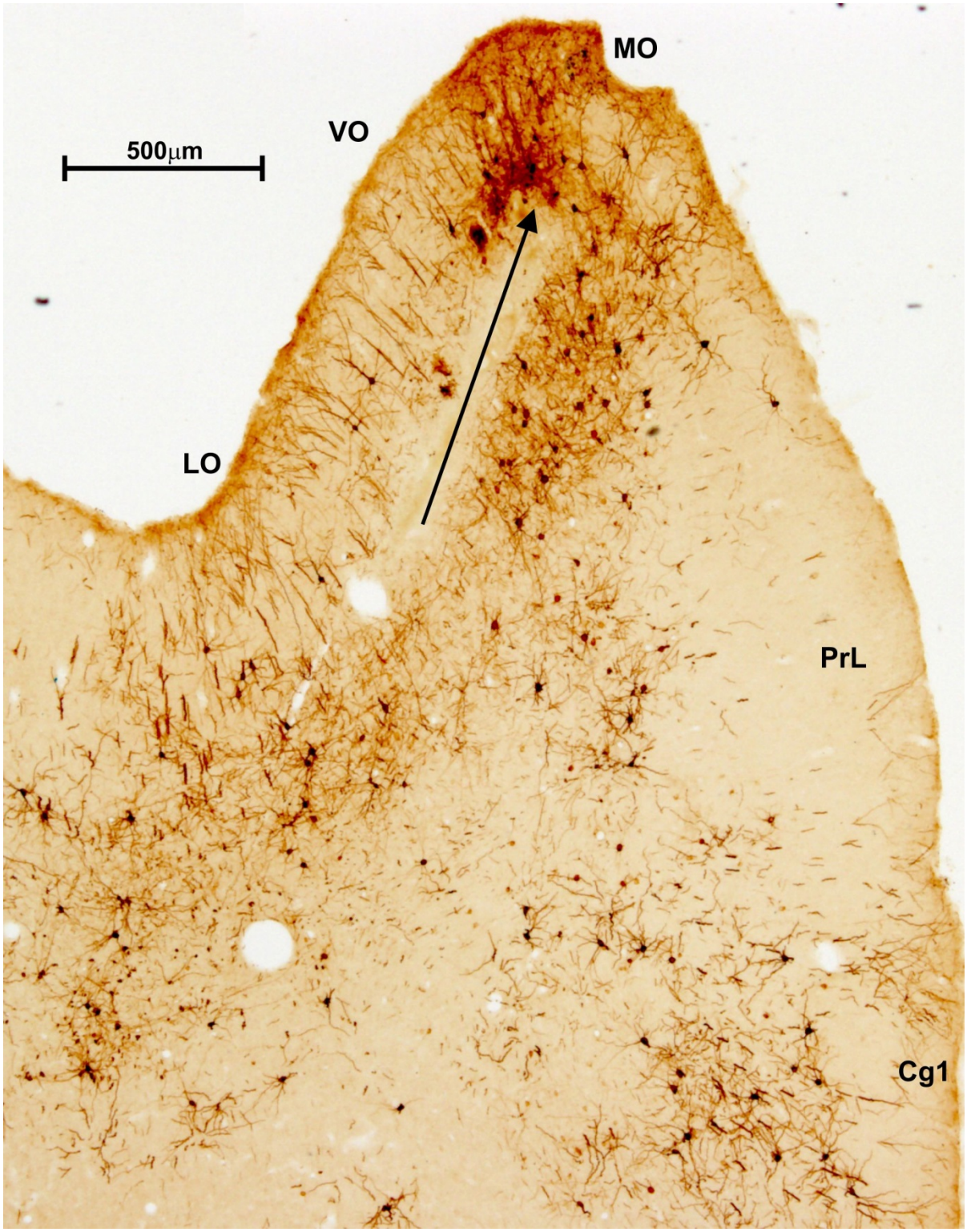
Koristeći metodu retrogradnog aksonskog prijenosa virusa bjesnoće u mozgu štakora analizirana je distribucija stanica pozitivnih na virus bjesnoće.

Distribucija neurona analizirana je samo u onih životinja u kojih je jasno bilo vidljivo da je virus ubrizgan u vrh korteksa koji dijeli orbitalnu od medijalne površine (Slika 5-10, 5-11, 5-12).

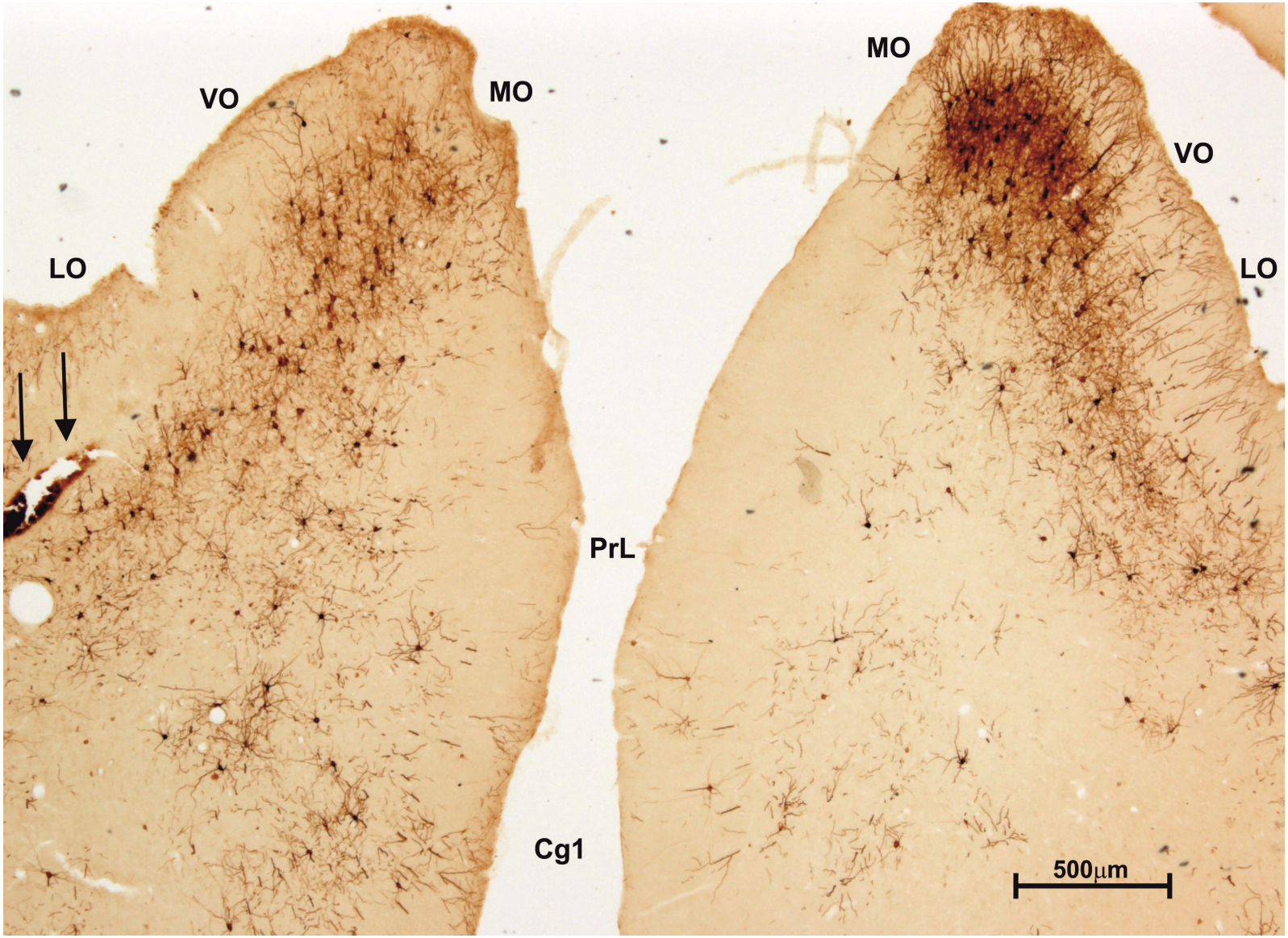
MO polje gusto je popunjeno obojenim neuronima, ali također da je izrazita gustoća neurona (+++) prisutna u MO polju suprotne strane (Slika 5-11), a nešto manja u ventro-orbitalnom (VO) polju iste i suprotne strane (++).

U latero-orbitalnom (LO) polju su samo sporadično uočeni obojeni neuroni, obostrano (+/0). Zanimljivo je da u medijalnom prelimbičkom polju (PrL) nisu prisutni pozitivni neuroni, ali da dorzalno u susjednom cingularnom (Cg) polju postoji jasna reaktivnost na istoj strani (+), a samo vrlo sporadična na suprotnoj (+/00).

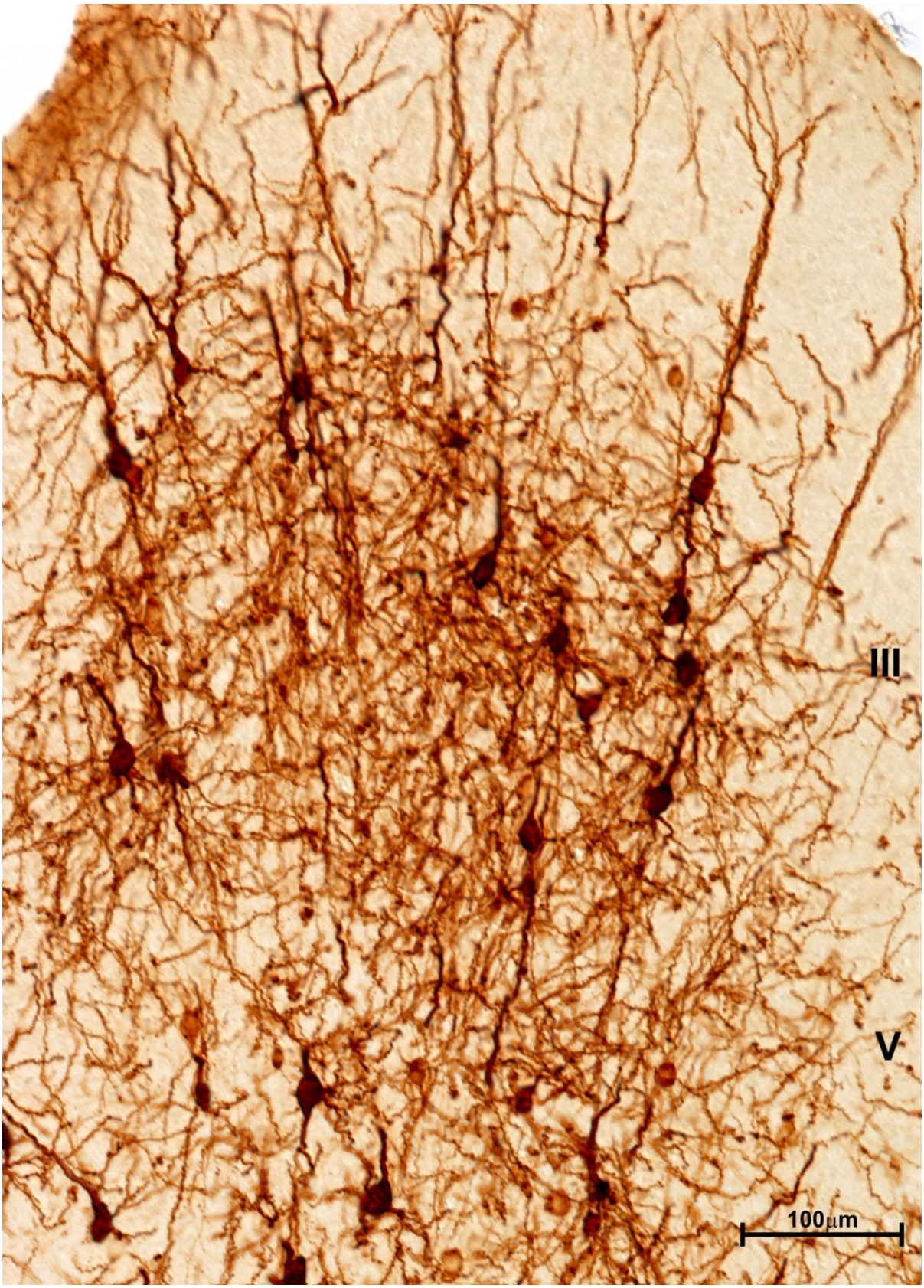
Istostrana aktivnost, ali ne s previše gusto postavljenim neuronima vidljiva je i u dorzalnom septalnom dijelu (+) (Slika 5-13, 5-14) i preoptičkom području (diagonalna Brocina jezgra) (+) (Slika 5-15). Intenzivna reaktivnost vidljiva je i u endopedunkularnoj jezgri (ispod piriformnog korteksa) (++), a koja se nastavlja prema bazalnim dijelovima amigdaloidne jezgre (+/++) (Slika 5-16, 5-17).



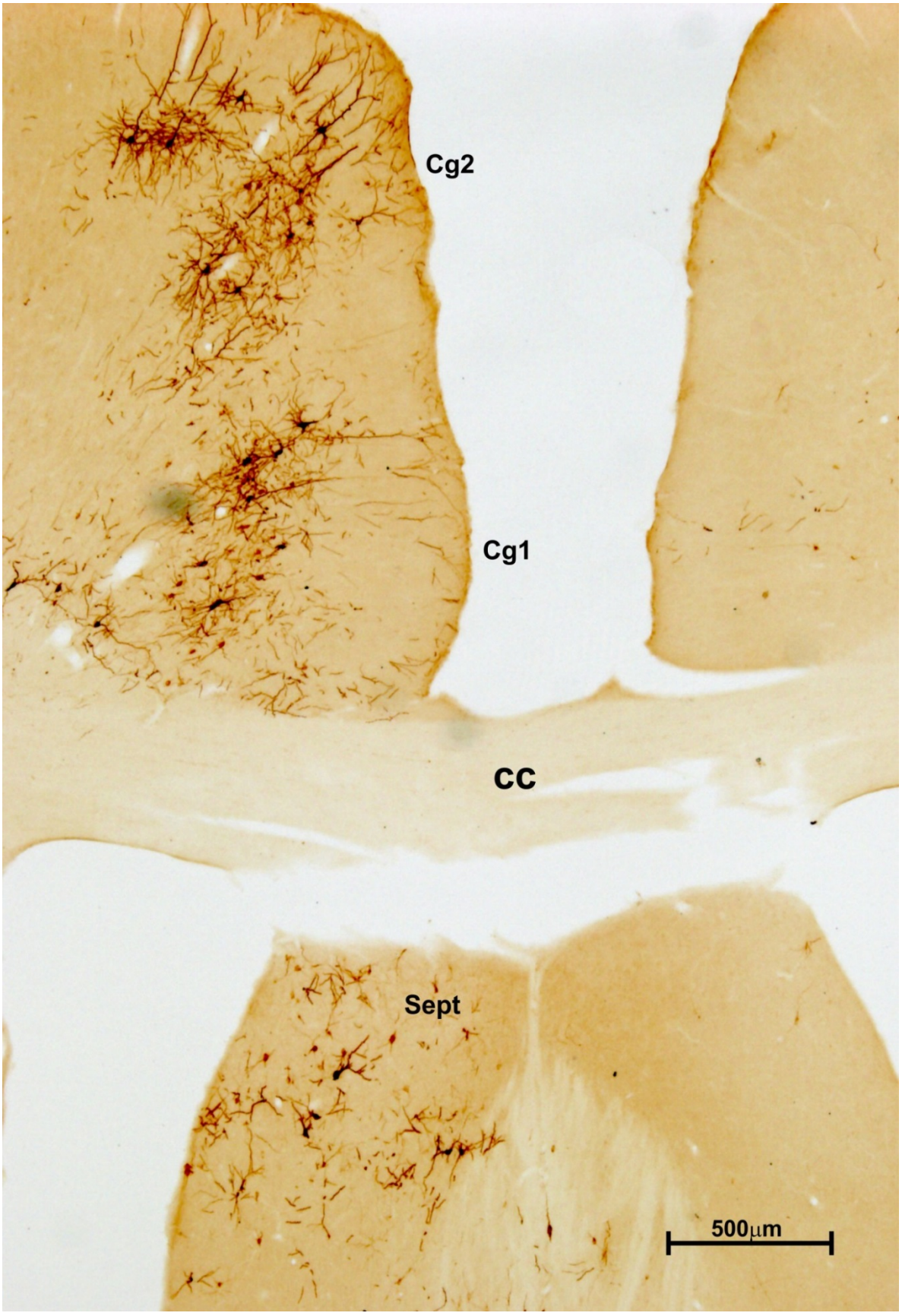
Slika 5-10: Mikrofotografija koronalnog reza kroz rostralni dio mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Strelica prikazuje mjesto prolaska elektrode, a vrh strelice pokazuje na mjesto ubrizganja virusa. Vidljivo je kako je ono izvršeno u medio-orbitalnom (MO) polju koje zauzima cjelokupno područje donjeg medijalnog ruba u rostralnom dijelu telencefalona. Lateralno se nastavlja ventro-orbitalno (VO) i latero-orbitalno (LO) polje, a gdje su vidljivi reaktivni neuroni. Po medijalnoj površini se nastavlja pre-limbičko (PrL) polje u kojemu nisu prisutni pozitivni neuroni, a iznad kojega se nalazi cingularno (Cg) polje 1 gdje su vidljivi reaktivni neuroni.



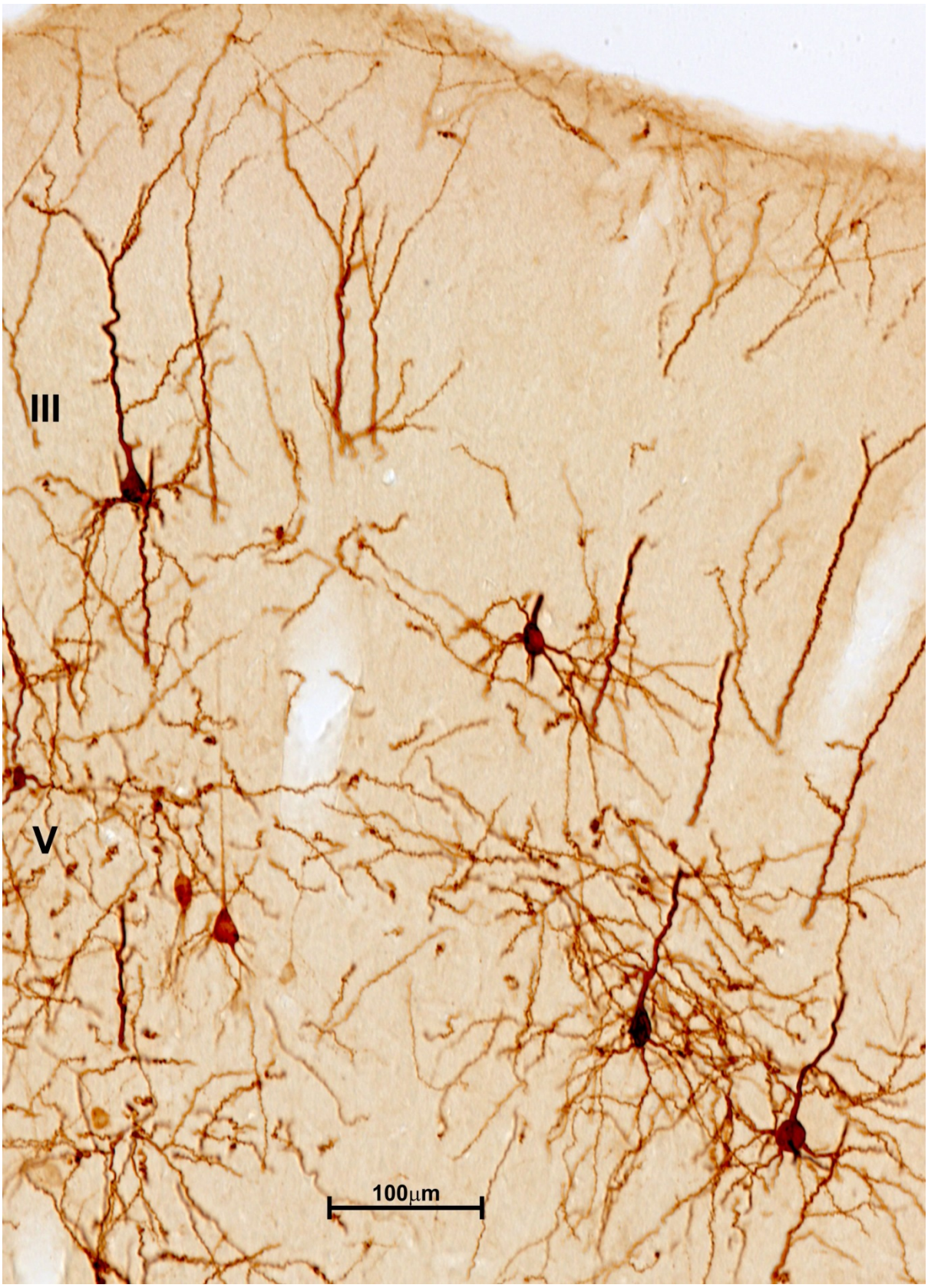
Slika 5-11: Mikrofotografija koronalnog reza kroz rostralni dio mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Ovo je rez nešto kaudalnije od reza sa slike 5-10 (strelica pokazuje oštećenje i ostatak krvarenja na mjestu prolaska elektrode). Prikazane su obje hemisfere, te je vidljivo kako je reaktivnost u medio-orbitalnom (MO) polju veća na suprotnoj strani, dok su u ventro-orbitalnom (VO) i latero-orbitalnom (LO) polju ne vide razlike između hemisfera. Za razliku od toga, reaktivnost u cingularnom (Cg) polju 1 samo je sporadična na suprotnoj stani, dok u pre-limbičko (PrL) polju nisu vidljivi neuroni.



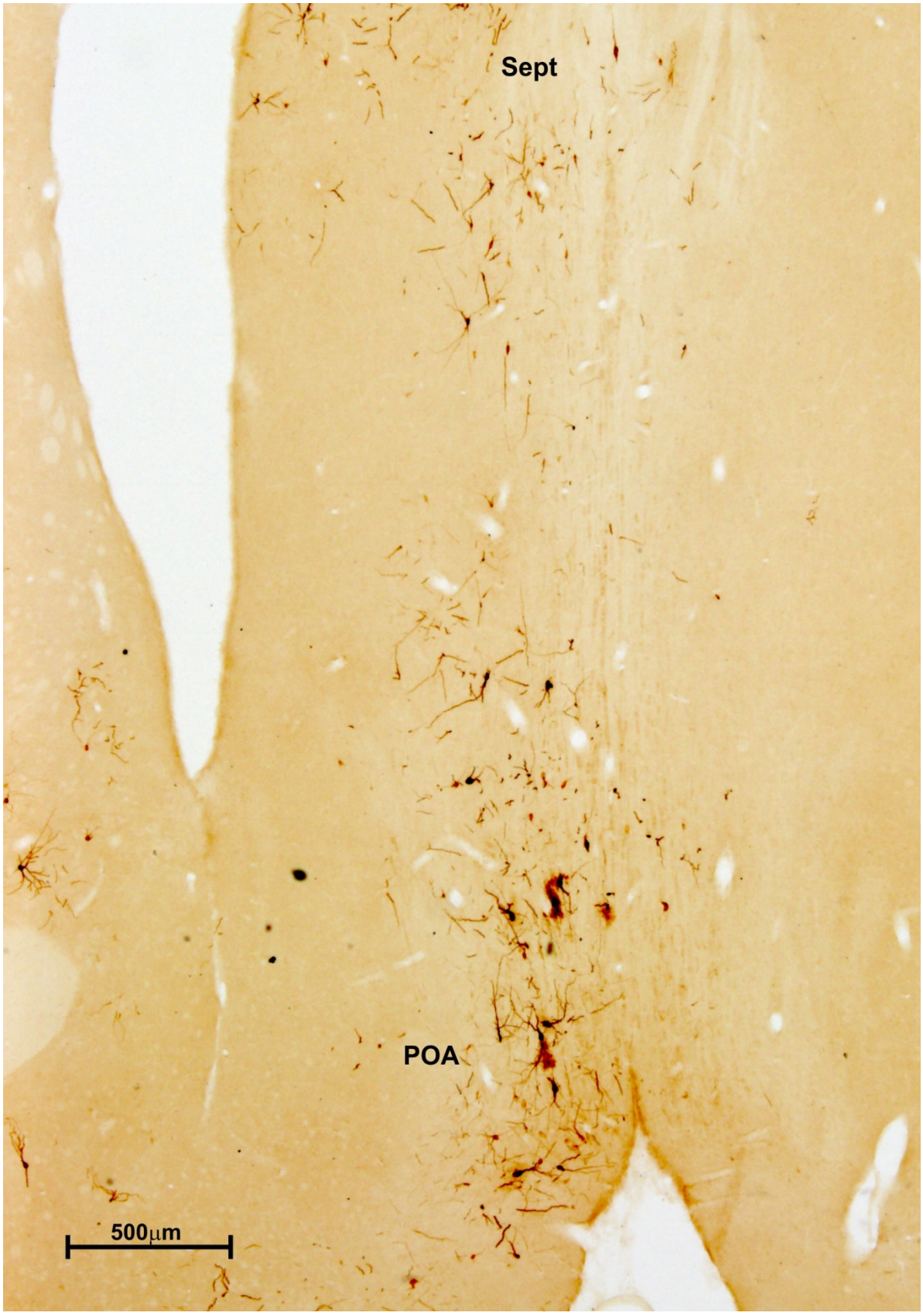
Slika 5-12: Mikrofotografija reaktivnih neurona u medio-orbitalnom (MO) polju mozga štakora u koje je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Veće povećanje sa slike 5-11 iz hemisfere u koju je ubrizgan virus.



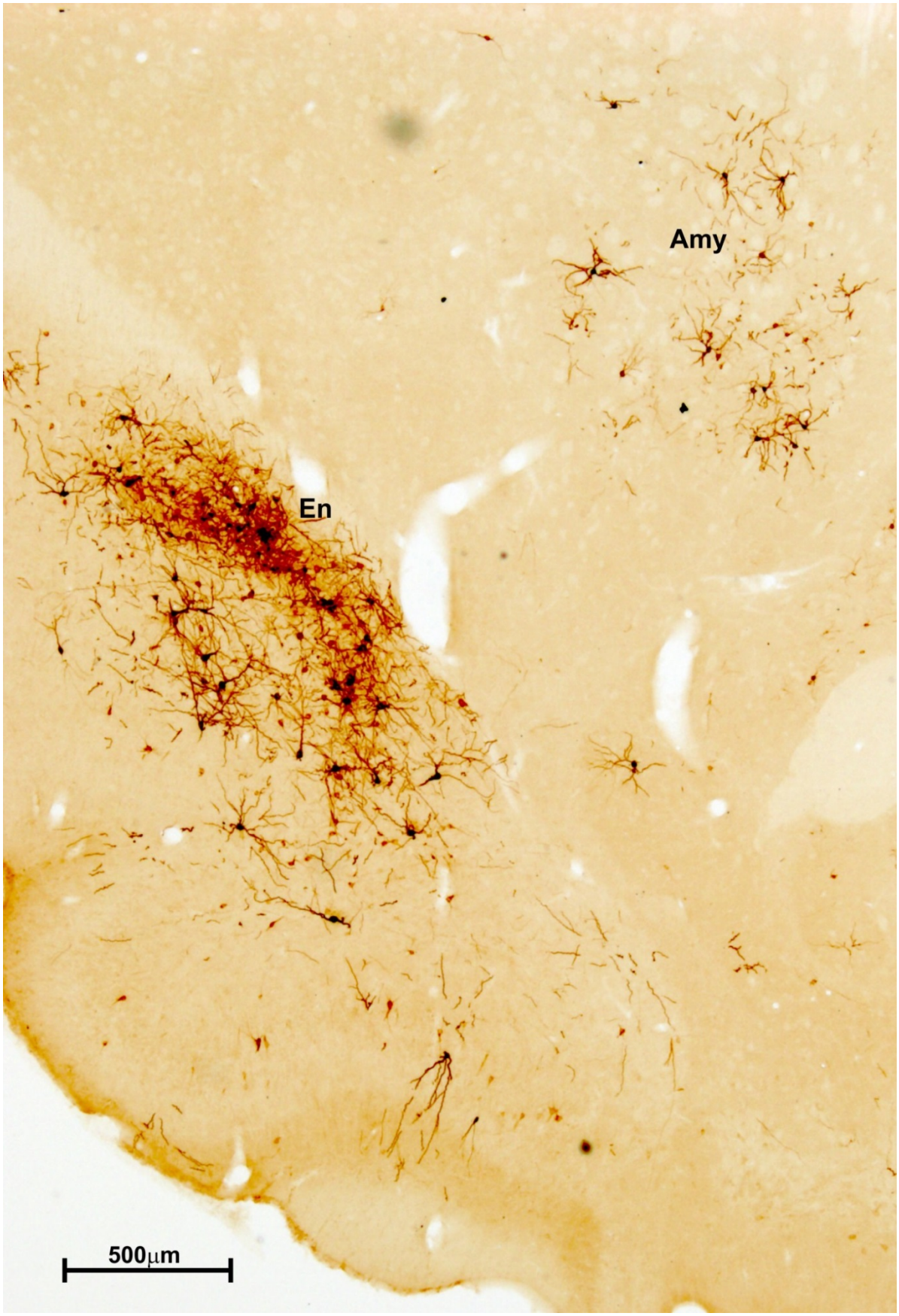
Slika 5-13: Mikrofotografija koronalnog reza kroz središnji dio mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus bjesnoće. Iznad korpus kalozuma (CC) nalaze se singularna (Cg) polja 1 i 2 u kojima se nalaze brojni reaktivni neuroni. Ispod korpus kalozuma vide se neuroni obojeni u septalnom području (Sept).



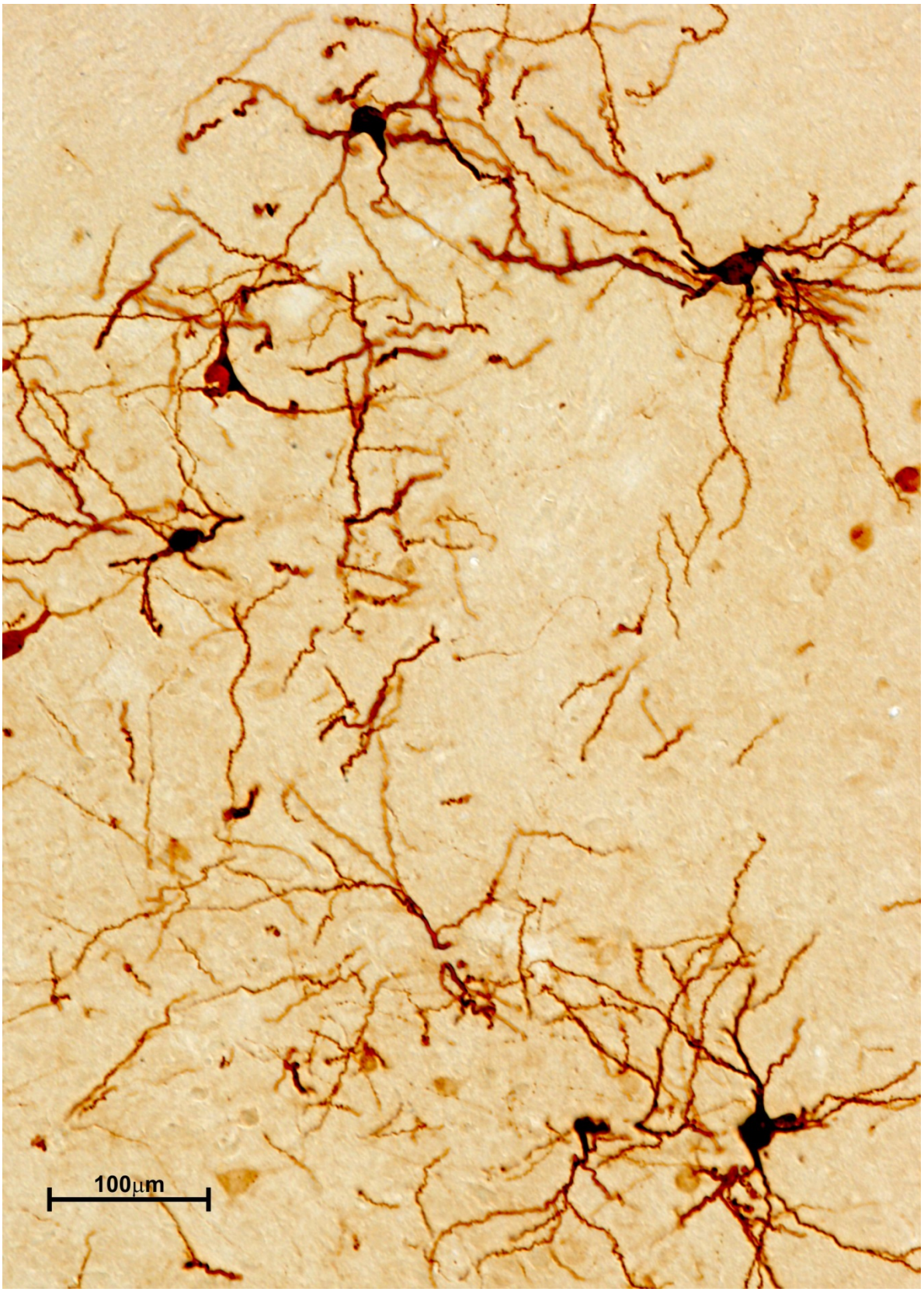
Slika 5-14: Mikrofotografija reaktivnih neurona sloja III cingularnog (Cg) polja mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Veće povećanje sa slike 5-13.



Slika 5-15: Mikrofotografija koronalnog reza kroz središnji dio mozga štakora (prikazan i na slici 5-13) u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Obojeni neuroni vidljivi su u dorzalnom dijelu unutar septalne jezgre (Sept), a u ventralnom dijelu vidljivi su neuroni preoptičkog područja (POA) obojeni unutar dijagonalne jezgre.



Slika 5-16: Mikrofotografija koronalnog reza prikazuje temporalni režanj mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Intenzivna reaktivnost s gusto postavljenim neuronima vidljiva je u endopedunkularnoj (En) jezgri i dubokim dijelovima piriformnog korteksa, te u bazalnim dijelovima amigdale (Amy).



Slika 5-17: Mikrofotografija reaktivnih neurona sloja bazalnog dijela amigdaloidne (Amy) jezgre mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Veće povećanje sa slike 5-16.

Posebna karakteristika polja 14c u majmuna i čovjeka je povezanost sa CA1 područjem hipokampusa (158), a jasna reaktivnost na virus bjesnoće zabilježena je u ovom području i kod štakora (+/++) (Slika 5-18, 5-19).

U lateralnom korteksu (Slika 5-20) samo sporadično se mogu vidjeti reaktivni neuroni (00/+), iako su iznimno dobro prikazani (Slika 5-21), a zanimljivo je da su prisutni kroz sve slojeve. Nešto veći broj se može zapaziti u ventralnijim dijelovima, u području inzularnog i piriformnog korteksa (+/0).

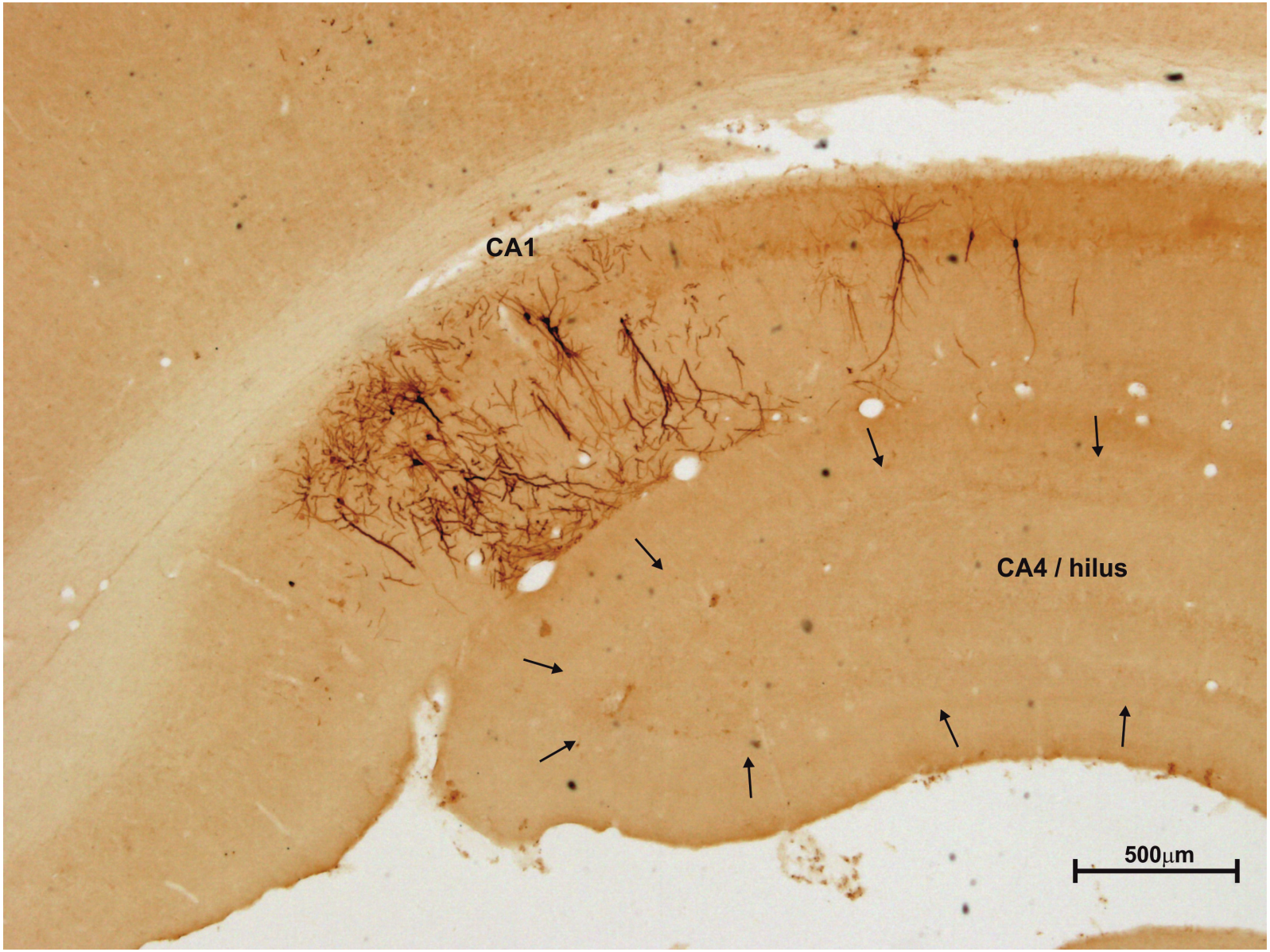
U talamusu je vidljivo izrazito nakupljanje neurona u medio-dorzalnoj jezgri (+++) (Slika 5-22), a visoka reaktivnost prisutna je u neuronima koji se nastavljaju od donjeg ruba jezgre i usmjereni su u horizontalnoj ravnini prema medijalno. Iako je gustoća ovih neurona manja (++) njihovo cjelokupno dendritičko stablo je izrazito dobro obojeno, te se radi o neuronima centro-medijalne (CM) jezgre (Slika 5-23).

U talamusu su visoko-reaktivni, ali manje gusto postavljeni neuroni prisutni u ventro-anteriornoj (VA) jezgri (+) (Slika 5-22).

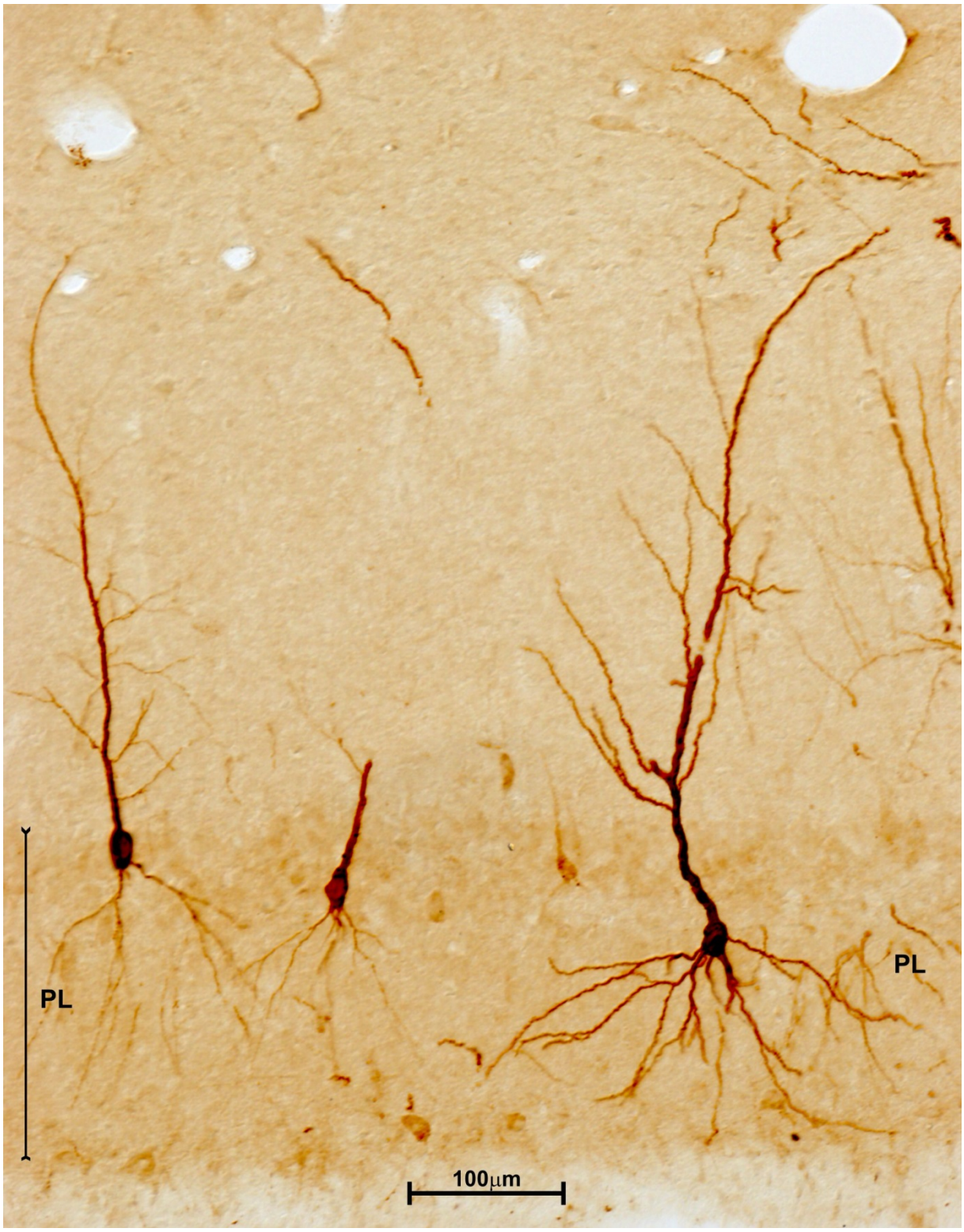
Od diencefaličkih struktura izrazito intenzivno i gusto bojanje vidljivo je u prednjem hipotalamusu (++) (Slika 5-24).

Sva diencefalička reaktivnost prisutna je na istoj strani.

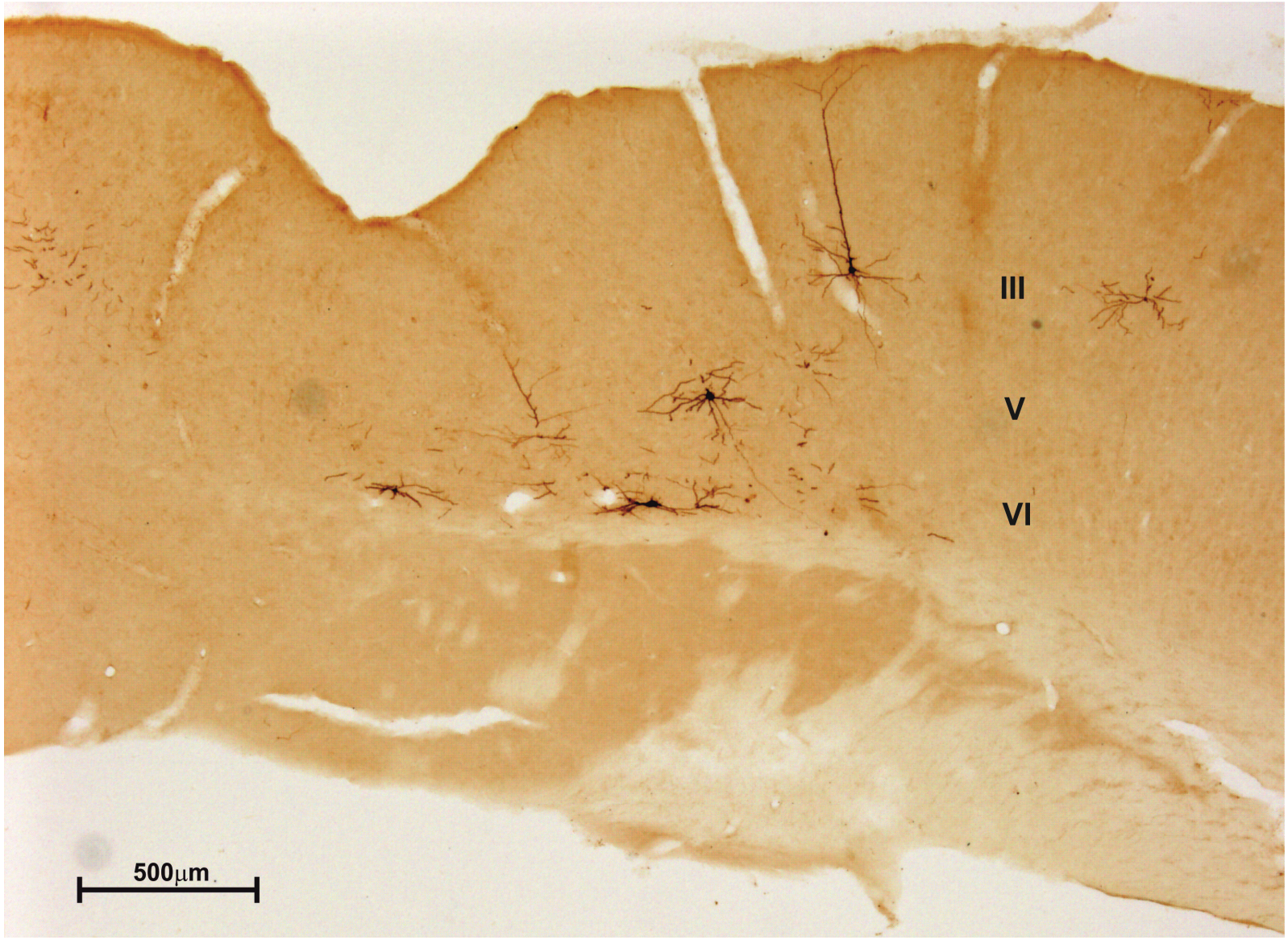
Slabija, ali jasna reaktivnost prisutna je u području mezodiencefaličke granice (Slika 5-25), gdje su najgušće poredani neuroni ventralne tegmentalne areje VTA), sporadično uz vrlo jasan i kompletan prikaz neurona u nucleus niger (Slika 5-26), te pojedinih neurona u periakveduktalnoj sivoj tvari (PAG) (+).



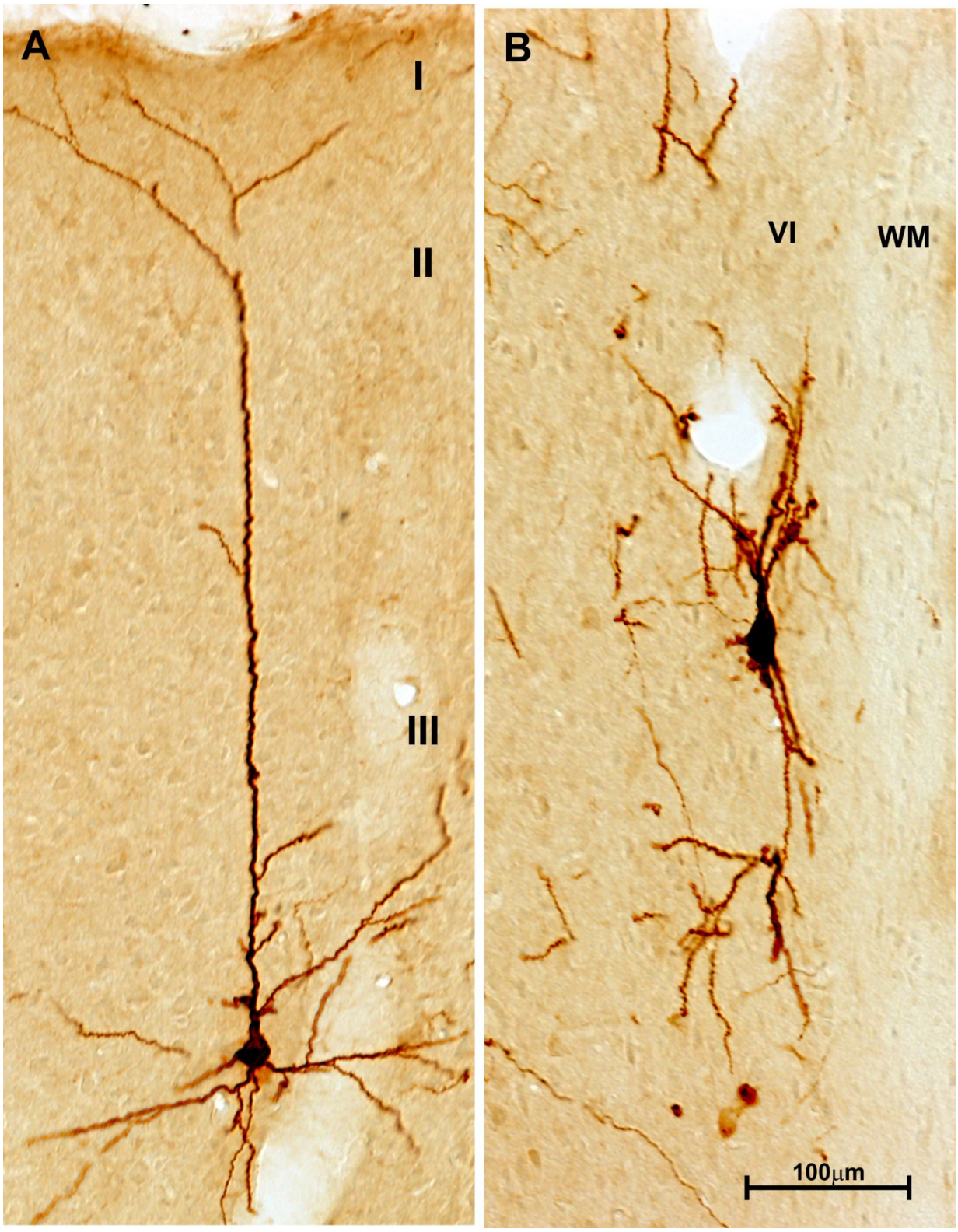
Slika 5-18: Mikrofotografija koronalnog reza s prikazanim hipokampusom mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Specifično obilježje medio-orbitalnog polja štakora, kao i 14c polja primata, je recipročna povezanost s CA1 poljem hipokampusa. Strelice prikazuju gornji rub zrnatog sloja dentatusa koji okružuje hilus.



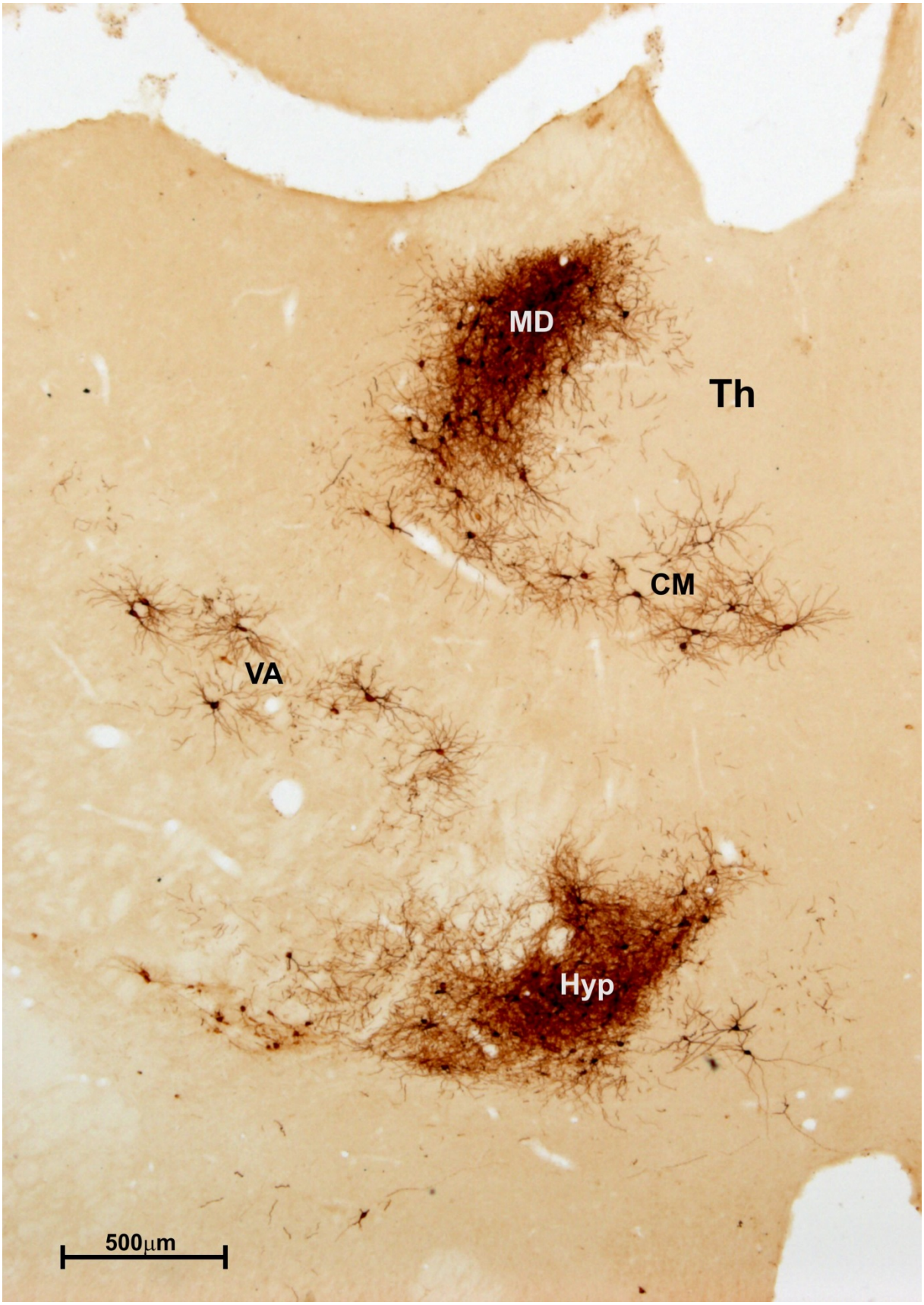
Slika 5-19: Mikrofotografija na virus bjesnoće reaktivnih neurona CA1 polja hipokampusa smještenih u piramidalnom sloju (PL). Veće povećanje sa slike 5-18.



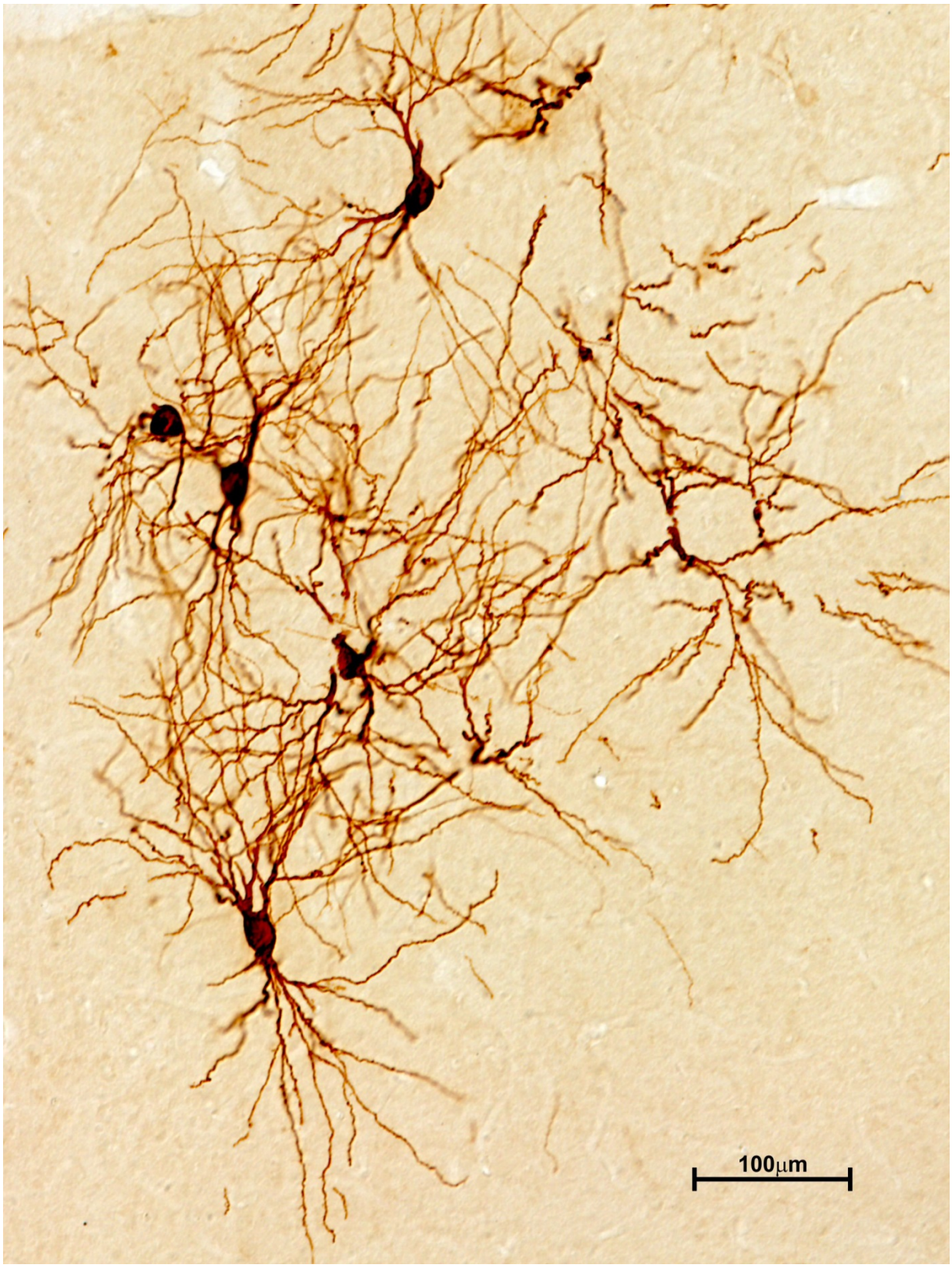
Slika 5-20: Mikrofotografija koronalnog reza s prikazanim neokorteksom mozga štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. U neokorteksu su samo sporadično vidljivi reaktivni neuroni, no jasne morfologije i distribuirani kroz različite slojeve.



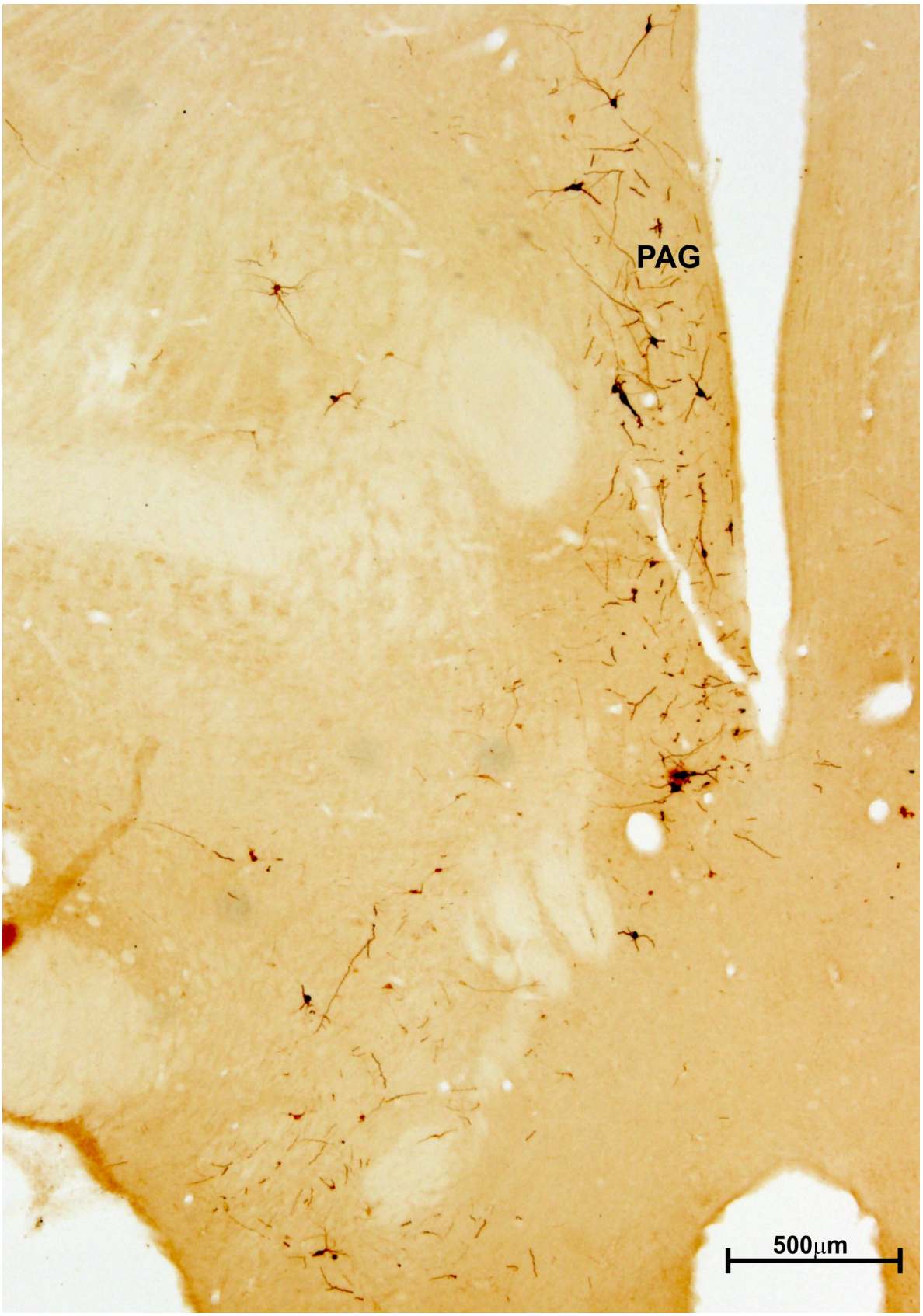
Slika 5-21: Mikrofotografija na virus bjesnoće reaktivnih neurona u neokorteksu. (A) Piramidni neuron dubokog dijela sloja III, te (B) multipolarni neuron sloja VI smješten neposredno uz bijelu tvar (WM). Veće povećanje sa slike 5-20.



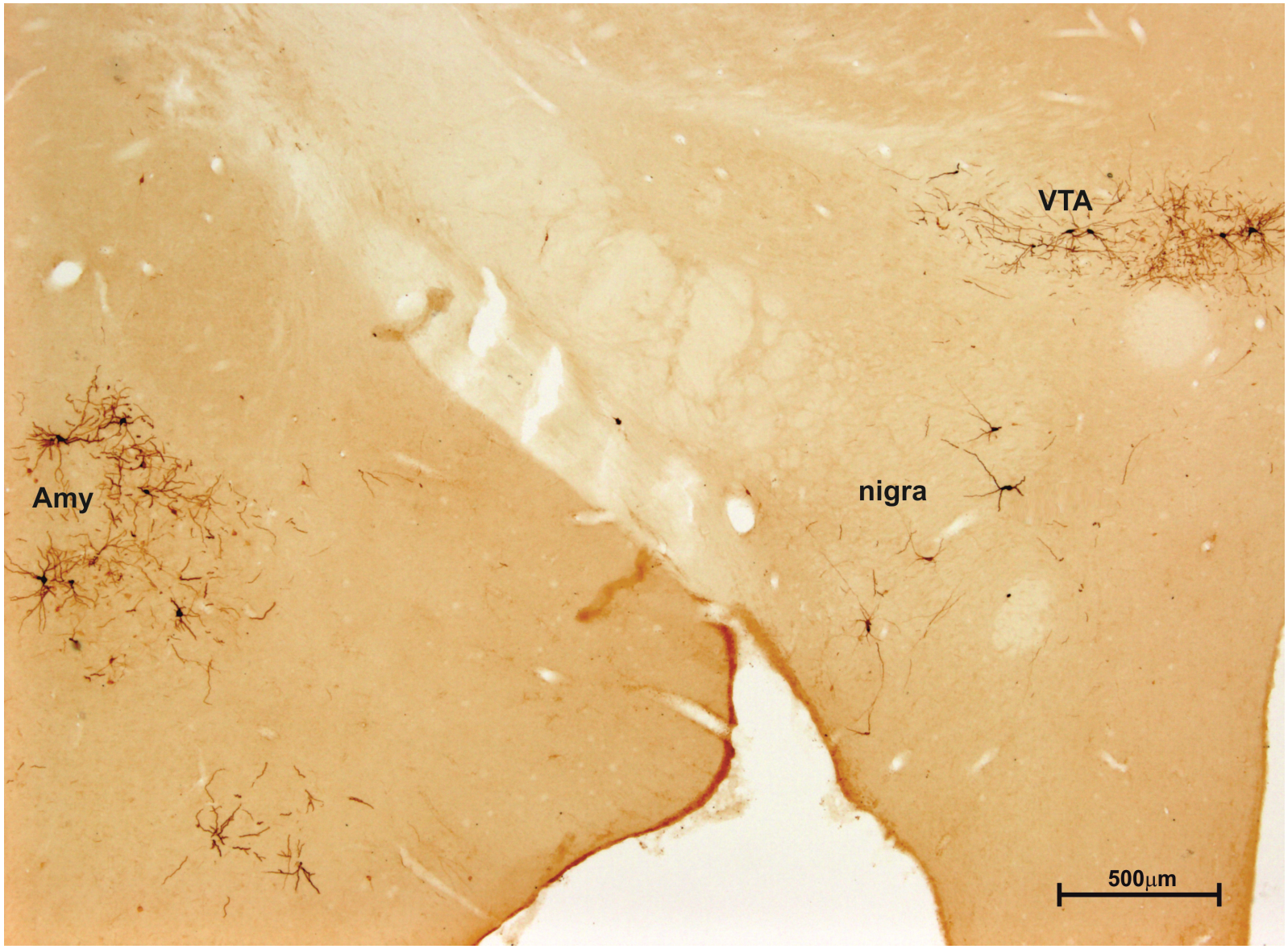
Slika 5-22: Mikrofotografija koronalnog reza kroz diencefalon štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Obilježje koje je glavno za definiranje polja kao dijela prefrontalnog korteksa jesu projekcije medio-dorzalne talamičke jezgre (MD). Visoka reaktivnost prisutna je u pojedinim neuronima centro-medijalne (CM) jezgre, a visoko-reaktivni, ali manje gusto postavljeni neuroni prisutni u ventro-anteriornoj (VA) jezgri talamusa (Th). Izrazito intenzivno i gusto bojanje vidljivo je u prednjem hipotalamusu (Hyp).



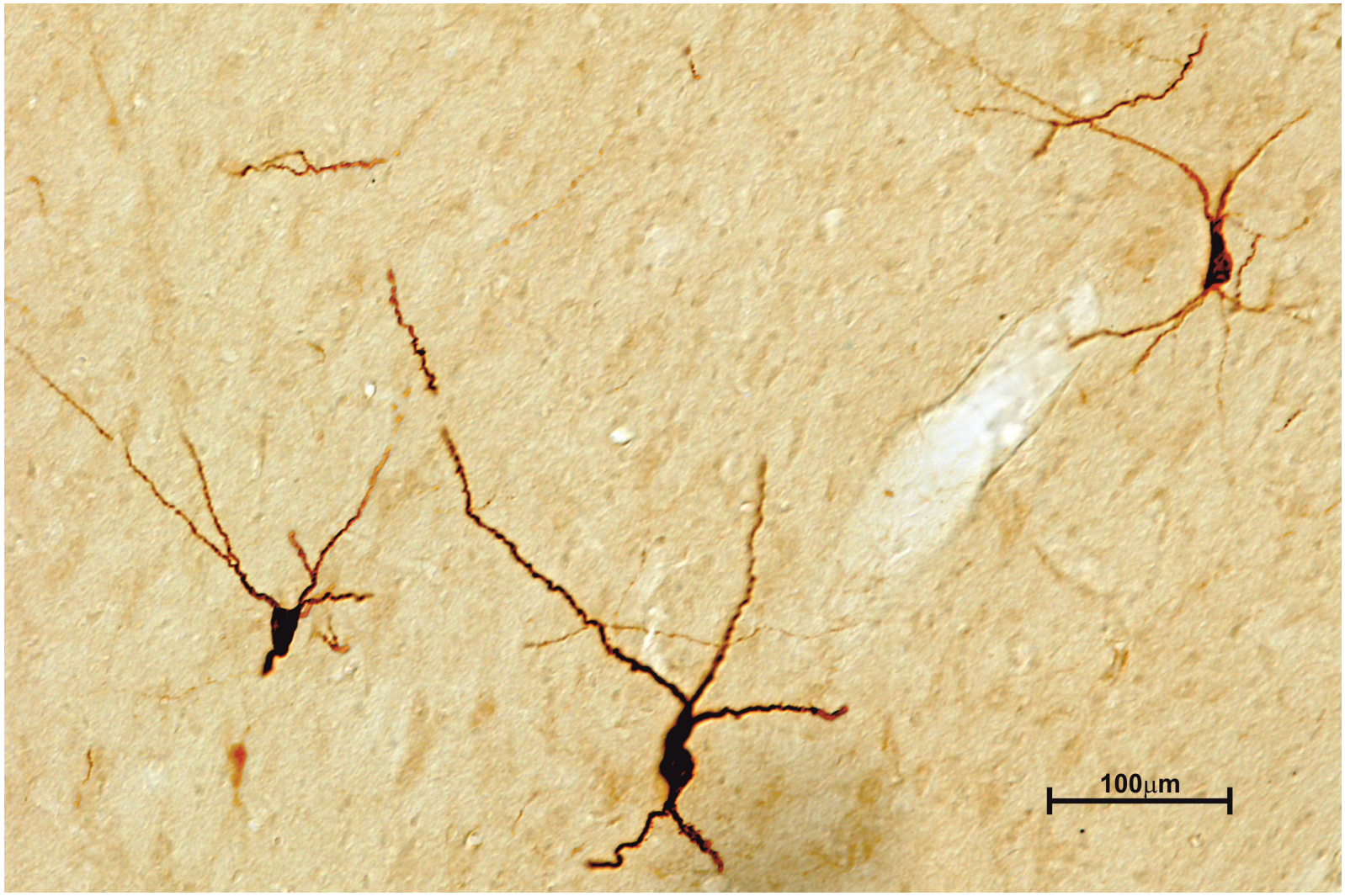
Slika 5-23: Mikrofotografija na virus bjesnoće reaktivnih neurona centro-medijalne (CM) jezgre. Veće povećanje sa slike 5-22.



Slika 5-24: Mikrofotografija koronalnog reza na prijelazu diencefalona u mezencefalon štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Reaktivnost je vidljiva u središnjoj liniji oko akvedukta gdje su obojani pojedini neuroni preriakveduktalne sive tvari (PAG).



Slika 5-25: Mikrofotografija koronalnog reza na prijelazu diencefalona u mezencefalon štakora u kojega je ubrizgan virus bjesnoće, obrađenog imunohistokemijski kako bi se prikazali neuroni koji su nakupili virus. Reaktivnost je vidljiva u području ventralne tegmentalne areje (VTA), a intenzivno su obojeni pojedini neuroni nucleus niger (nigra). U telencefalonu se vide reaktivni neuroni bazalnog dijela amigdala (Amy).



Slika 5-26: Mikrofotografija na virus bjesnoće reaktivnih neurona u nucleus niger. Veće povećanje sa slike 5-25.

5.1.3 Stanična organizacija kortikalnih polja

5.1.3.1 Medio-orbitalno polje u štakora

Medio-orbitalno (MO) polje (Slika 5-27) debljine je 800-1000μm (Tablica 5-1).

Sloj I ima debljinu 100–150μm i slabo je ispunjen neuronima. Sloj II debljine je oko 150μm, gusto ispunjen stanicama i intenzivno obojen s jasnom granicom prema slojevima I i III.

Sloj III ima debljinu između 150–200μm i slabijeg je intenziteta bojenja u odnosu na sloj II.

U sloju V koji ima debljinu 200-300μm jasno se razaznaju dva podsloja, gornji Va te donji Vb. U ovom sloju neuroni su organizirani u male vertikalne stupiće, a što je posebno izraženo u rostralnim dijelovima polja.

Sloj VI ima debljinu između 100–150μm i gusto je ispunjen stanicama te jasno razgraničen od sloja Vb i bijele tvari. Slojevi V i VI (300-450μm) u prosjeku su nešto deblji od slojeva II i III (300-350μm).

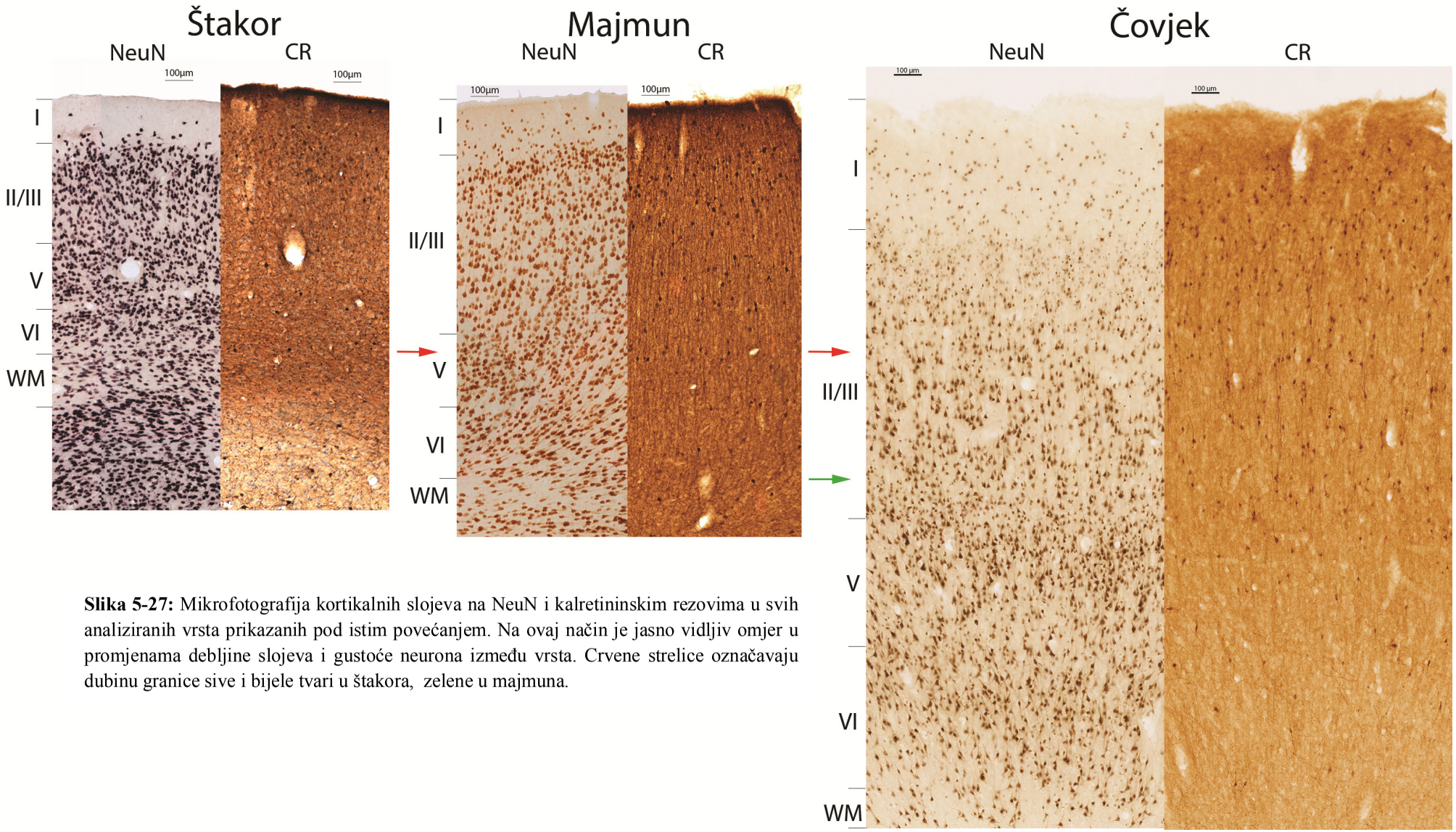
Neuroni pozitivni na kalretinin prisutni su u svim slojevima, kao i u bijeloj tvari, ali ipak s većom gustoćom u slojevima I – III.

Najčešće imaju ovalna tijela promjera 7–9μm te bipolarnu organizaciju dendritičkog stabla (Slika 5-28). Iz svakog kraja tijela izlaze dva izražena primarna radijalno orijentirana dendrita koji se dalje radijalno granaju.

Dio bipolarnih neurona smještenih u sloju I ne pokazuje radijalnu već horizontalnu orijentaciju, s dendritima koji se granaju paralelno s površinom mozga (Slika 5-29).

Nešto rjeđi morfološki tip su stanice s dva čuperka (eng. „bitufted cells“), gdje se dva primarna dendrita kao „buketić“ vrlo brzo granaju na veći broj tanjih ogranaka (Slika 5-30).

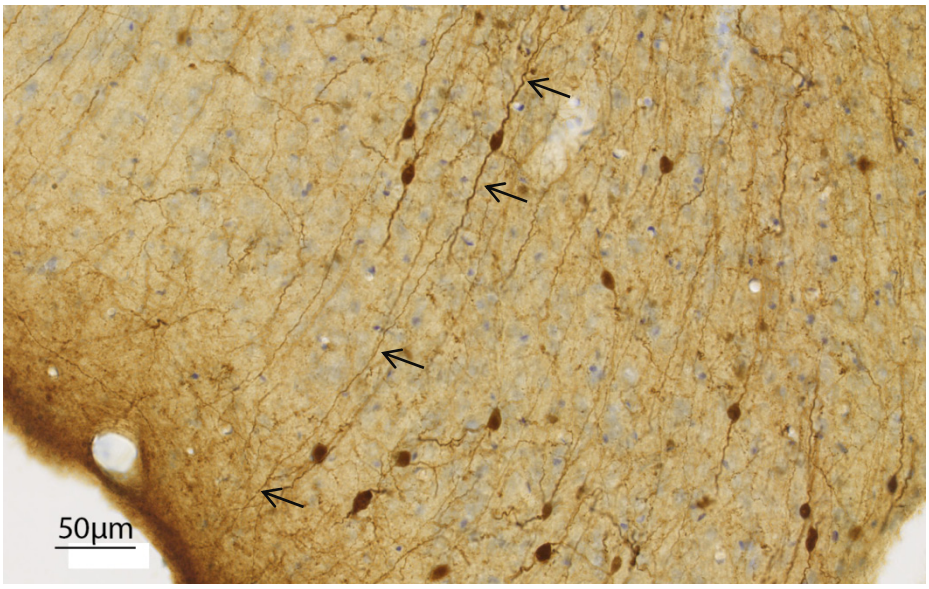
Još rjeđe nailazimo na multipolarne kalretininske neurone koji imaju 3-5 izraženija primarna dendrita (Slika 5-31).



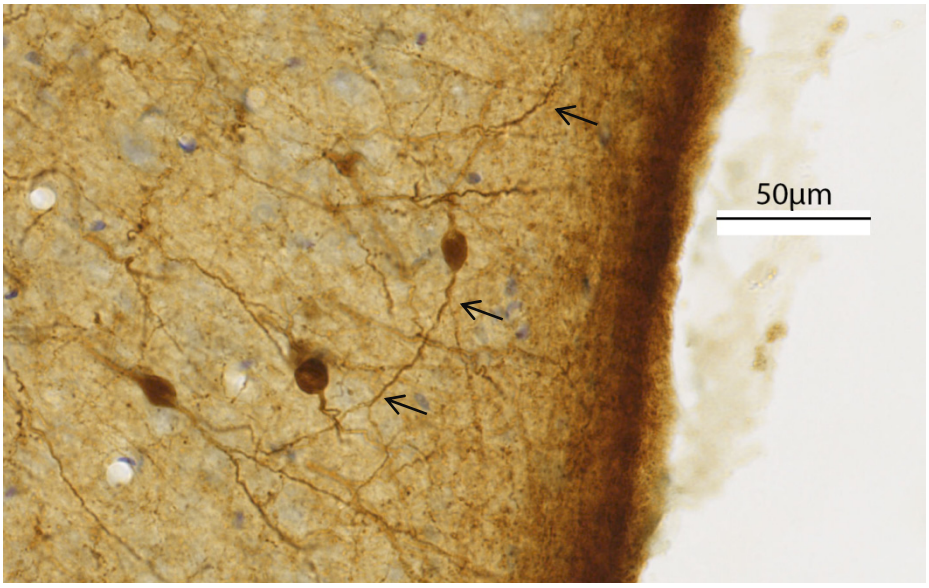
Slika 5-27: Mikrofotografija kortikalnih slojeva na NeuN i kalretininskim rezovima u svih analiziranih vrsta prikazanih pod istim povećanjem. Na ovaj način je jasno vidljiv omjer u promjenama debljine slojeva i gustoće neurona između vrsta. Crvene strelice označavaju dubinu granice sive i bijele tvari u štakora, zelene u majmuna.

Tablica 5-1: Tablica pokazuje debljinu kore mozga u medio-orbitalnom (MO) polju štakora i polju 14c majmuna i čovjeka.

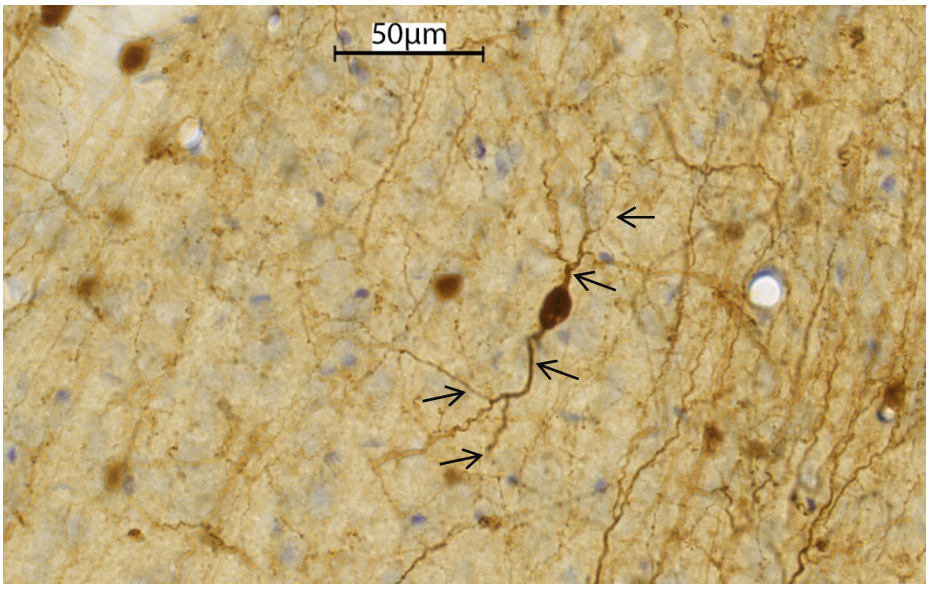
Debljina korteksa	**Štakor**	**Majmun**	**Čovjek**
Ukupno	**800-1000µm**	**1200-1400µm**	**1800-2100µm**
Sloj I	100–150µm	150–200µm	350-450µm
Sloj II/III	300-350µm	500–550µm	650-800µm
Sloj V	200-300µm	250-350µm	300-400µm
Sloj VI	100–150µm	250–350µm	350-450µm



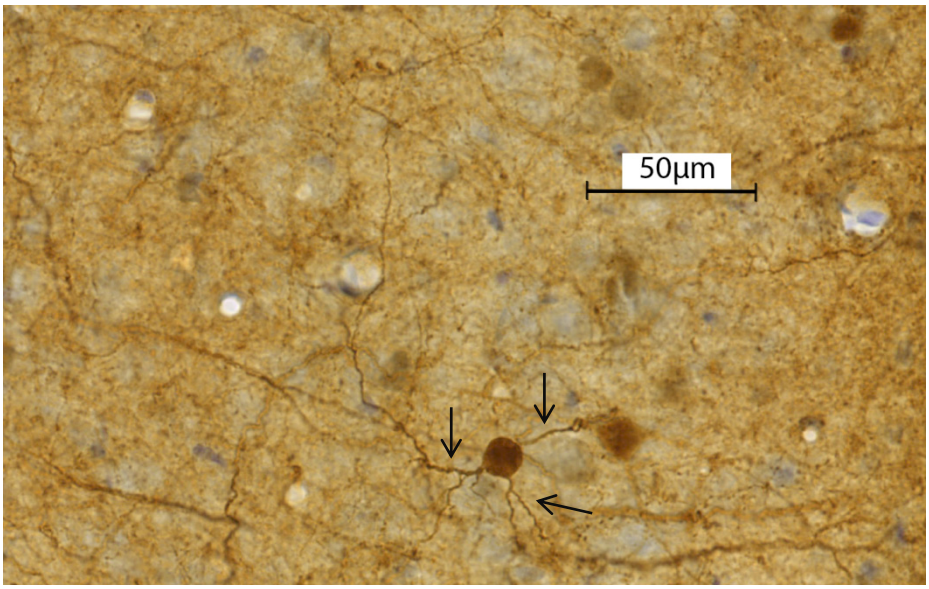
Slika 5-28: Mikrofotografija pokazuje bipolarni kalretininski neuron smješten duboko u sloju III medio-orbitalnog polja u štakora. Dva primarna dendrita protežu se cijelim putem do sloja I i duboko u sloj V (strelice).



Slika 5-29: Mikrofotografija bipolarnog horizontalno orijentiranog kalretininskog neurona u sloju I medio-orbitalnog polja u štakora. Strelice pokazuju na dendrite.



Slika 5-30: Mikrofotografija kalretininskog neurona s dendritima koji se granaju kao dva čuperka („buketića“, eng. „bitufted cells“) u medio-orbitalnom polju štakora (strelice).



Slika 5-31: Mikrofotografija multipolarnog kalretininskog neurona medio-orbitalnog polja u štakora. Strelice pokazuju na tri primarna dendrita koji polaze od tijela neurona.

5.1.3.2 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u majmuna

Ukupna debljina kore velikoga mozga u polju 14c kod makaki majmuna (Slika 5-27) debljine je 1,2-1,4mm (Tablica 5-1).

Na Nissl obojenim rezovima sloj II i III čine homogenu cjelinu bez jasne granice, dok je na NeuN rezovima sloj II ipak moguće razlikovati od sloja III.

Sloj I ima debljinu 150–200μm i slabo je ispunjen neuronima.

U slojevima II/III koji su debljine 500–550μm jasno je primjetan gradijent smanjenja gustoće od površine prema dubini, tako da je granica prema sloju V vrlo jasna jer su u gornjem dijelu sloja V neuroni vrlo gusto poredani i intenzivno obojani.

U sloju V debljine 250-300μm mogu se prepoznati dva podsloja koja su jasnije vidljiva na NeuN nego na Nissl rezovima. Podsloj Va je gušći i intenzivnije obojan, dok podsloj Vb ima manju gustoću neurona.

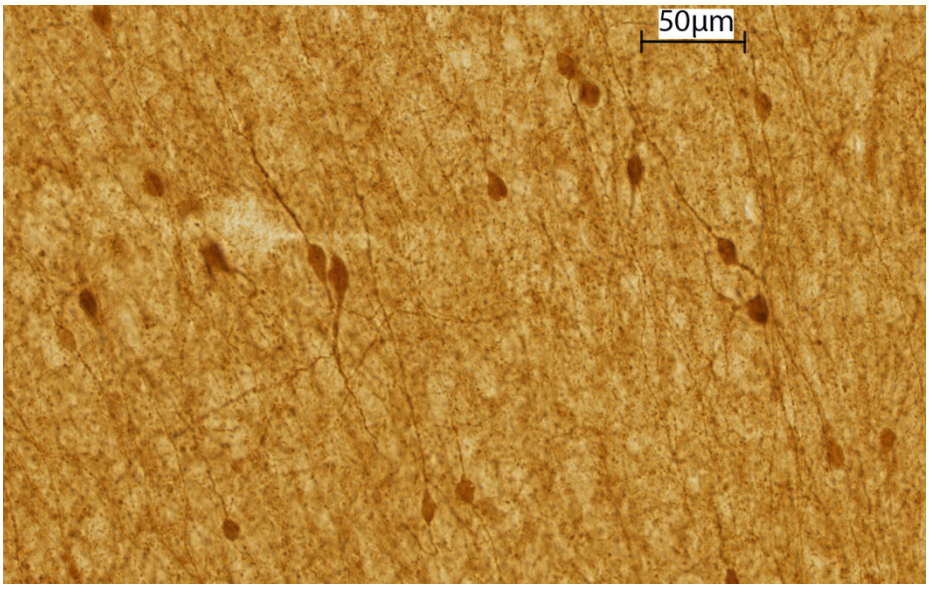
Sloj VI je otprilike jednake debljine kao i sloj V. Jasno je razgraničen od sloja Vb, dok granica prema bijeloj tvari nije toliko jasno izražena.

Za razliku od štakora, debljina slojeva Vi VI približno je jednaka debljini slojeva II i III. U odnosu na štakora debljina korteksa povećava se za 40-50%, s time što nema značajnijeg povećanja u debljini sloja V, dok se posebno povećava debljina sloja VI. Povećanje debljine prati i smanjenje gustoće neurona.

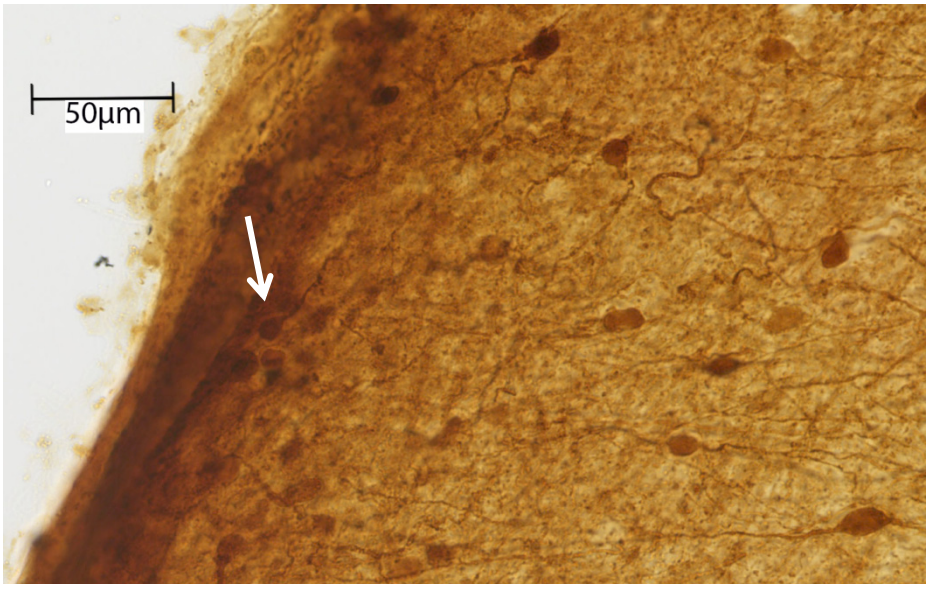
Izuzev sloja I, stanice se grupiraju u vertikalne stupiće koji se protežu kroz sve slojeve, što je nešto više izraženo na NeuN u odnosu na Nissl rezove. Ova razlika je najizraženija u sloju VI, gdje se na Nissl preparatima ne može uočiti vertikalna organizacija neurona.

Distribucija i morfologija kalretininskih neurona slična je onom u štakora. Kalretininski neuroni prisutni su u svim slojevima, te također u bijeloj tvari.

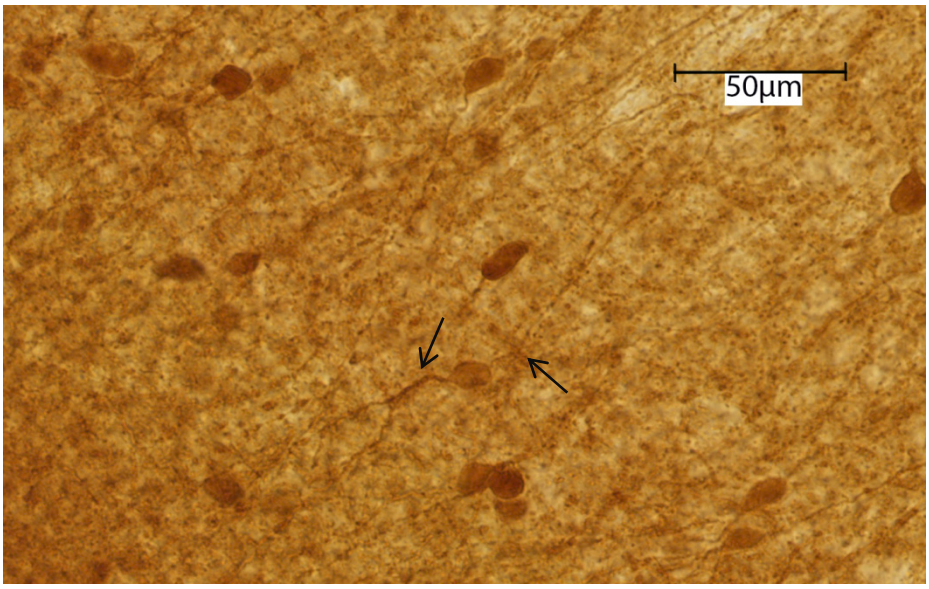
Najveća gustoća je u slojevima II/III, gdje se najjasnije može zapaziti i povećanje njihove gustoće. Povećanje gustoće kalretininskih neurona vidljivo je u svim slojevima. Dojam je da nema razlika niti u raspodjeli različitih morfoloških oblika kalretininskih neurona, pa su tako najčešći bipolarni (Slika 5-32, 5-33) nakon kojih slijede neuroni s dva čuperka (Slika 5-34), a najrjeđe nalazimo multipolarne neurone (Slika 5-35). Veličina tijela neurona čini se većom nego u štakora, promjera između 8–12μm.



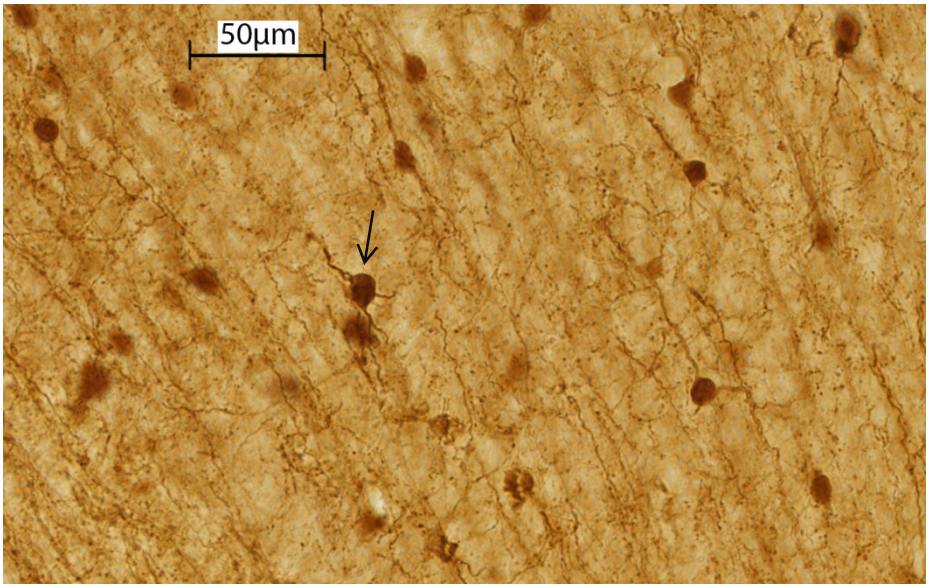
Slika 5-32: Mikrofotografija prikazuje skupinu bipolarnih kalretininskih neurona u polju 14c u majmuna.



Slika 5-33: Mikrofotografija bipolarnog kalretininskog neurona s horizontalno orijentiranim dendritima u sloju I polja 14c u majmuna.



Slika 5-34: Mikrofotografija kalretininskog neurona sa dendritima koji se granaju u obliku dva čuperka (strelice) u polju 14c u majmuna.



Slika 5-35: Mikrofotografija multipolarnog kalretininskog neurona u polju 14c u majmuna.

5.1.3.3 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u čovjeka

Ukupna debljina kore velikoga mozga u polju 14c kod čovjeka (Slika 5-27) iznosi oko 2mm (Tablica 5-1). Slojeve II i III nije moguće jasno razgraničiti, kako na Nissl, tako i na NeuN rezovima.

Sloj I ima debljinu 350-450μm, te je dvostruko deblji u usporedbi s majmunom, a gotovo trostruko u usporedbi s štakorom. U sloju I gustoća neurona je mala, ali su oni homogeno distribuirani. Sloj I je jasno razgraničen od sloja II.

Debljina slojeva II/III je 650-800μm, te postoji jasno izražen gradijent smanjenja gustoće od površine prema dubini. Također, neuroni progresivno pokazuju povećanje tijela, te stoga postoji i gradijent povećanja intenziteta bojenja od površine prema dubini. U odnosu na štakora debljina slojeva II/III se udvostručuje, a povećanje debljine jasno je uočljivo i u odnosu na majmuna.

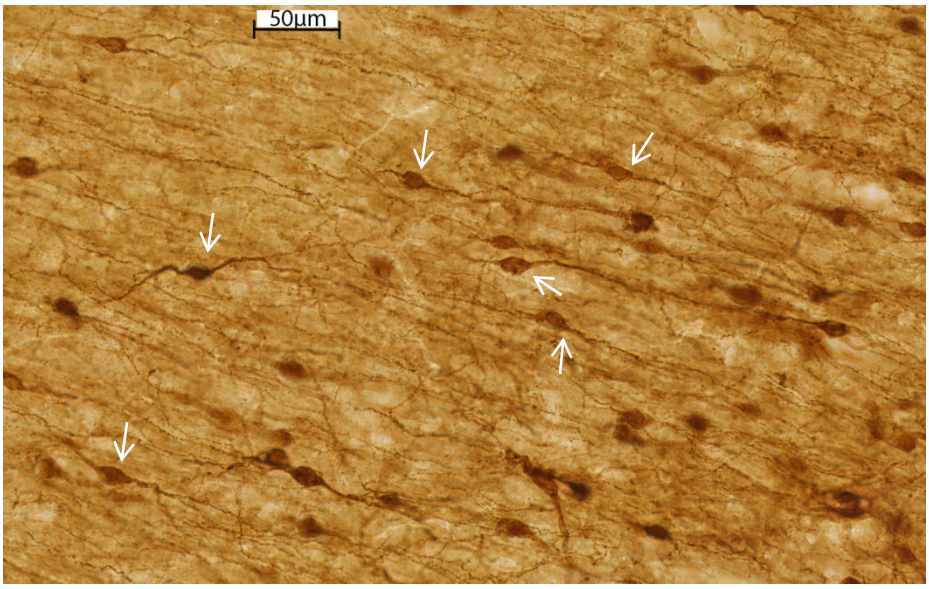
Sloj V ima debljinu 300-400μm, te u odnosu na majmuna nije moguće jasno zapaziti povećanje debljine, dok se u odnosu na štakora debljina malo povećava. Iako je na NeuN rezovima moguće uočiti blagu sublaminaciju na površniji dio s gušće poredanim neuronima (Va), te dublji dio s manjom gustoćom neurona (Vb), podjela u podslojeve nije tako izražena kao u majmuna i štakora.

Sloj VI ima debljinu 350-450μm, te je tri puta deblji u usporedbi sa štakorom, a povećanje debljine (za 30%) je jasno uočljivo i u odnosu na majmuna. Sloj VI jasno je razgraničen od sloja V, dok je granica prema bijeloj tvari još slabije izražena nego u majmuna; ovdje su neuroni nakupljeni u obliku grozdova.

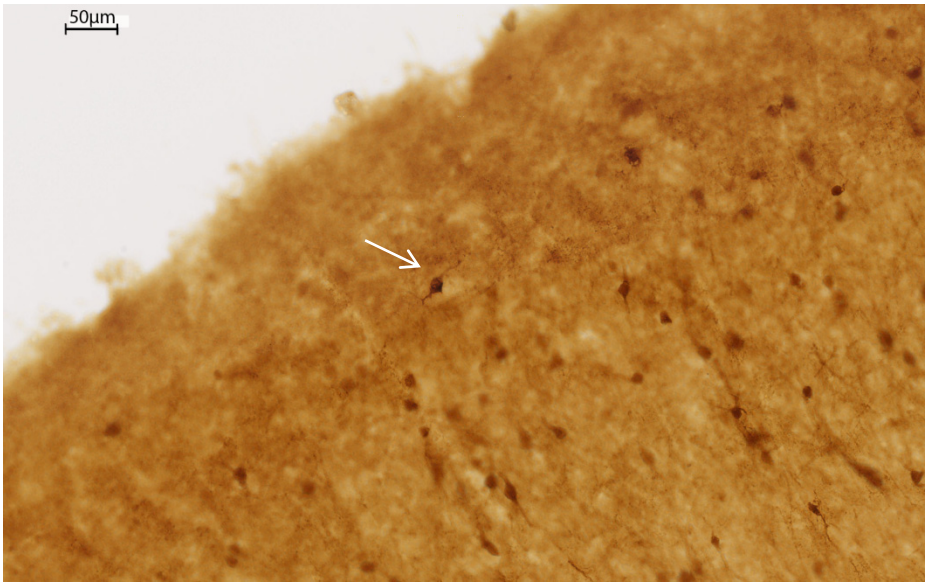
Kao i kod majmuna, stanice se grupiraju u vertikalne stupiće koji se protežu kroz sve slojeve, izuzev sloja I.

U odnosu na majmuna debljina korteksa povećava se za 50%, što je prvenstveno posljedica povećanja debljine slojeva I, II i III. U odnosu na štakora debljina korteksa se udvostručuje.

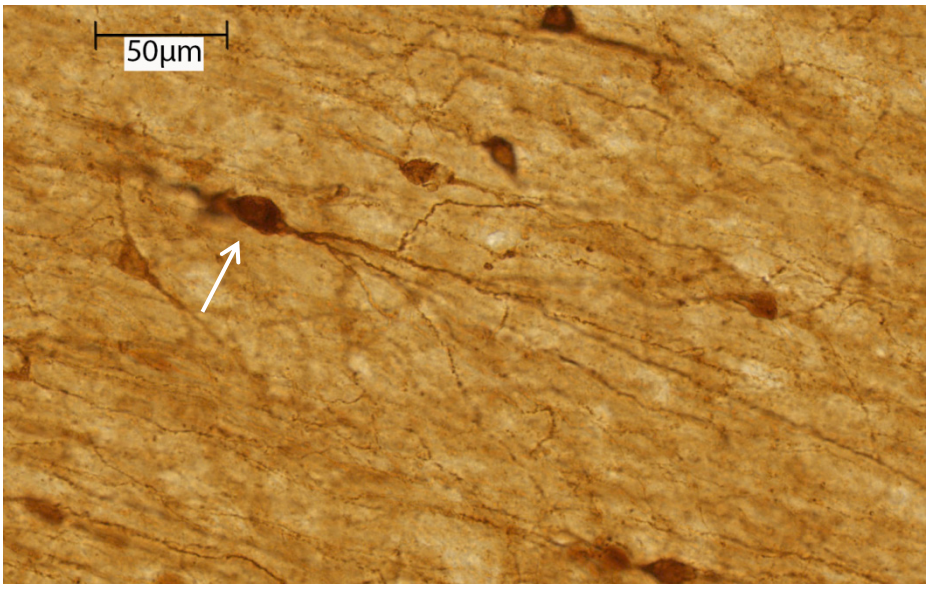
Posebno je upečatljivo smanjenje gustoće neurona, pa se stoga gustoća kalretininskih neurona smanjuje u odnosu na majmuna te je vrlo bliska gustoći koju nalazimo kod štakora.



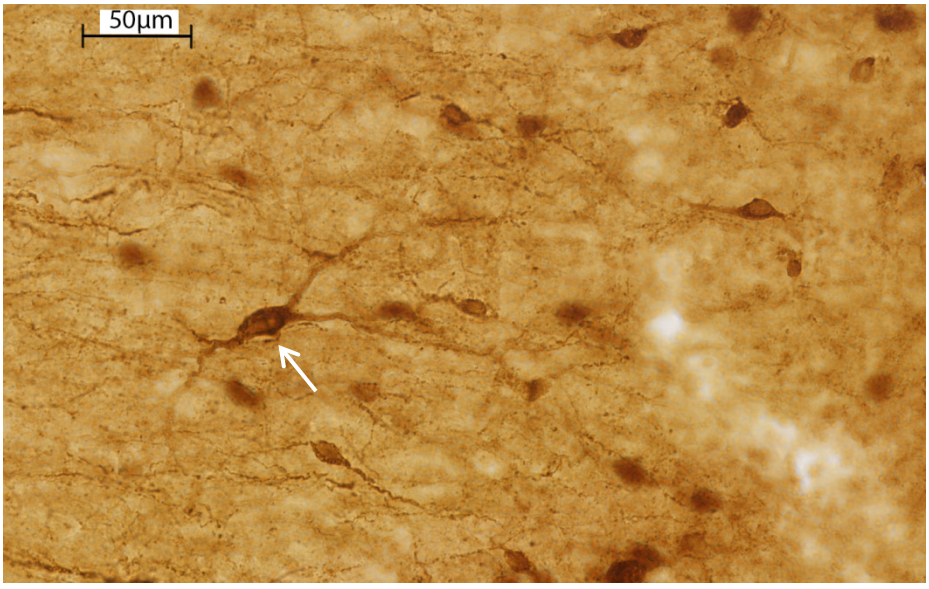
Slika 5-36: Mikrofotografija skupine bipolarnih kalretininskih neurona, označenih strelicama, u polju 14c u čovjeka.



Slika 5-37: Mikrofotografija horizontalno orijentiranog bipolarnog kalretininskog neurona u sloju I u polju 14c u čovjeka.



Slika 5-38: Mikrofotografija kalretininskog neurona s dva čuperka u polju 14c u čovjeka.



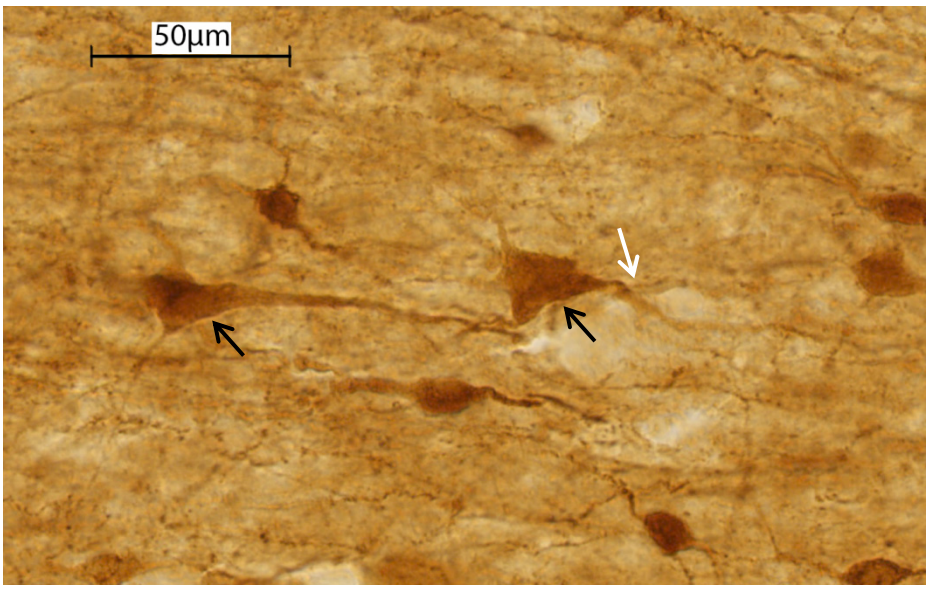
Slika 5-39: Mikrofotografija kalretininskog multipolarnog neurona u polju 14c u čovjeka.

Distribucija i morfologija kalretininskih neurona slična je onoj u štakora i majmuna. Kalretininski neuroni prisutni su u svim slojevima, te također u bijeloj tvari. Najveća gustoća je u slojevima II/III. Povećanje gustoće kalretininskih neurona vidljivo je u svim slojevima.

Veličina tijela neurona doimlje se jednaka onoj kao i u majmuna, te je veća nego u štakora, s promjerom između 8–12µm.

Dojam je također da nema dramatičnih razlika niti u raspodjeli različitih morfoloških oblika kalretininskih neurona, pa su tako najčešći bipolarni (Slika 5-36) nakon kojih slijede neuron s dva čuperka (Slika 5-38), a najrjeđe nalazimo multipolarne neurone (Slika 5-39).

Dojam je ipak da se neuroni s dva čuperka pronalaze češće nego u majmuna i štakora. Također, povremeno se mogu uočiti i kalretininski neuroni piramidalnog oblika (Slika 5-40), što nije bio slučaj u štakora i majmuna.



Slika 5-40: Mikrofotografija dvaju blisko postavljenih kalretininskih neurona piramidnog oblika (crna strelica) u polju 14c u čovjeka. 'Apikalni dendrit' vrlo se brzo grana (bijela strelica), što je odlika koja ih morfološki razlikuje od glutamatergičkih piramidnih stanica.

5.2 KVANTITATIVNA ANALIZA

5.2.1 Prikaz podataka po pojedinoj vrsti

5.2.1.1 Medio-orbitalno polje u štakora

Izvorni podaci po pojedinoj životinji, sa standardnim devijacijama i Gundersenovim koeficijentom greške prikazani su u tablicama 5-2, 5-3 i 5-4.

U medio-orbitalnom (MO) polju štakora (Slika 5-41) ukupan broj neurona prosječno iznosi oko 114.000 (Slika 5-41A). Više od polovice (60%) smješteno je u slojevima II/III (oko 68.000 neurona) (Slika 5-41D), nakon čega slijedi sloj V s oko 31.000 neurona. U ovim slojevima se nalazi gotovo 90% neurona MO polja. Većina preostalih neurona nalazi se u sloju VI (oko 12.000), dok se najmanje neurona (2,5%) nalazi u sloju I (manje od 3.000 neurona).

MO polje u štakora ima ukupni volumen koji prosječno iznosi oko 1,3mm^3 (Slika 5-41B). Najveći volumen imaju slojevi II/III (zajedno 0,63 mm^3), dok slojevi I i V imaju približno jednake volumene, pojedinačno oko 0,3 mm^3. Daleko najmanji volumen ima sloj VI (0,09 mm$^{3)}$.

Prosječna gustoća u MO polju štakora iznosi oko 87.000 neurona/mm^3 (Slika 5-41C). Očekivano, od prosjeka, gustoća najviše odstupa u sloju I, gdje je manja od 10.000 neurona/mm^3. U svim preostalim slojevima gustoća je iznad 100.000 neurona/mm^3, a najveća u sloju VI (oko 138.000 neurona/mm^3). U slojevima II-V gustoća je oko 25% manja i kreće se prosječno 106.000-109.000 neurona/mm^3.

Kalretininski neuroni (Slika 5-42) predstavljaju 2,6% od ukupnog broja neurona u MO polju štakora (Slika 5-42D) te ih prosječno ima oko 3000 (Slika 5-42A). Oko dvije trećine kalretininskih neurona smješteno je u slojevima II/III (~2.000), a od preostalog broja polovica se nalazi u sloju I, nešto manje u sloju V, dok se samo 4% kalretininskih neurona nalazi u sloju VI (Slika 5-42C),.

Najveća gustoća kalretininskih neurona je u slojevima II/III s približno 3.200 neurona/mm^3 (Slika 5-42B). Zanimljivo je kako prosječna gustoća kalretininskih neurona u sloju I, koji ima barem deset puna manju gustoću neurona od ostalih slojeva, iznosi 1.600 neurona/mm^3 te je veća od gustoće kalretininskih neurona u slojevima V i VI gdje se kreće između 1.400-1.500 neurona/mm^3. Stoga je i udio kalretininskih neurona u sloju I najveći i prosječno iznosi oko 17%, što je barem 15 puta više nego u slojevima V i VI. u U slojevima II/III udio kalretininskih neurona je 3%.

Tablica 5-2: Tablica prikazuje volumen (mm^3), ukupan broj neurona (NeuN) i ukupan broj kalretininskih (CR) neurona po slojevima u **medio-orbitalnom (MO) polju štakora**. CE označava koeficijent greške po Gundersenu. SD označava standardnu devijaciju.

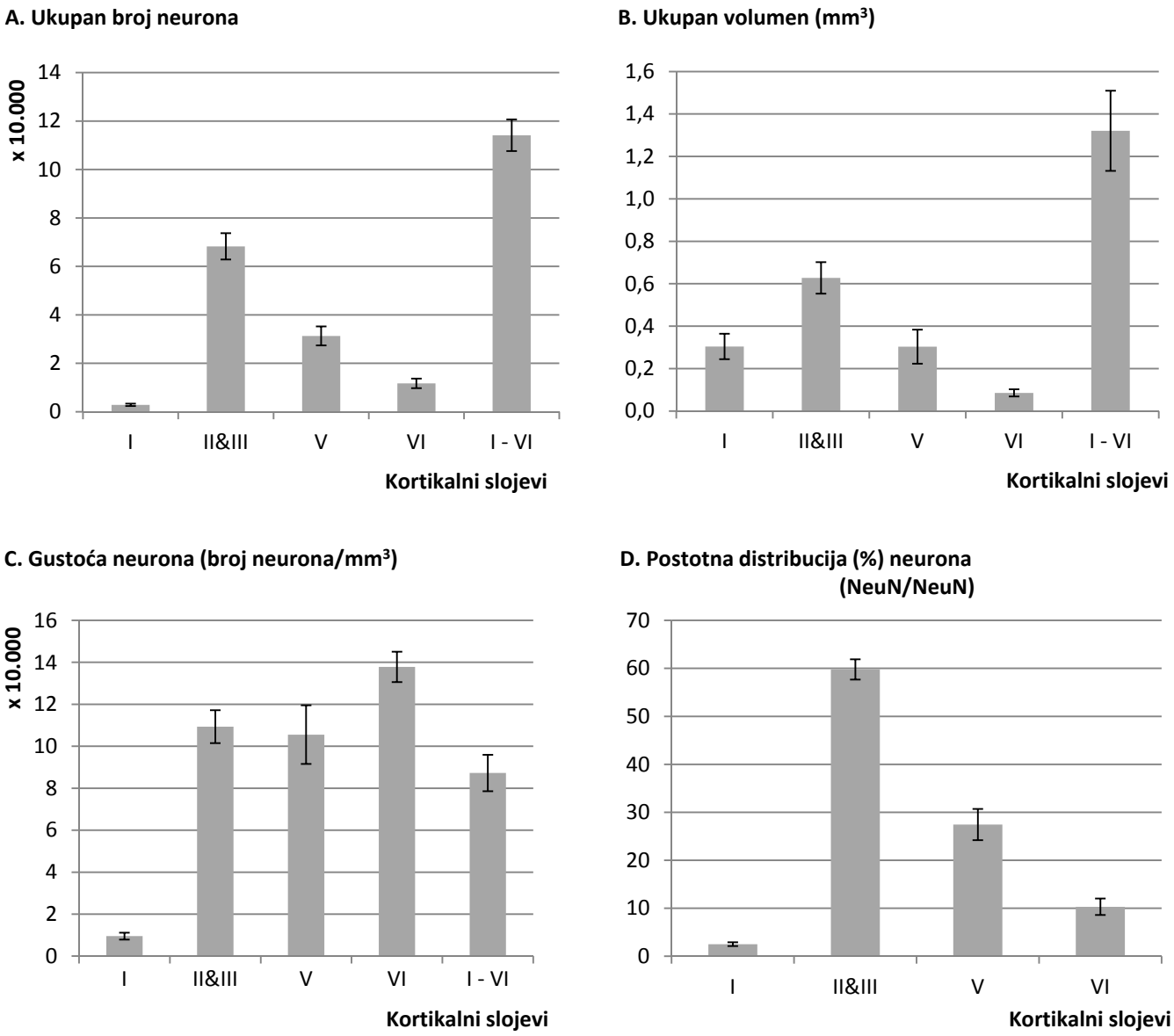
MO polje Štakor SLOJ	Volumen [mm3]	SD	Ukupan broj NeuN stanica	SD	CE	Ukupan broj CR stanica	SD	CE
I	0,30	0,06	2.853	503	0,06	476	112	0,11
II&III	0,63	0,07	68.277	5421	0,04	1.911	268	0,09
V	0,30	0,08	31.294	3924	0,04	423	112	0,12
VI	0,09	0,02	11.734	1969	0,04	121	3	0,22
Svi slojevi	1,32	0,19	114.158	6556	0,05	2931	445	0,14

Tablica 5-3: Tablica prikazuje ukupnu gustoću neurona (NeuN po mm^3), gustoću kalretininskih (CR po mm^3) neurona, udio (%) kalretininskih neurona u odnosu na ukupan broj neurona, postotnu distribucija ukupnog broja neurona (NeuN/NeuN) i kalretininskih (CR/CR) neurona po slojevima slojevima u **medio-orbitalnom (MO) polju štakora**. SD označava standardnu devijaciju.

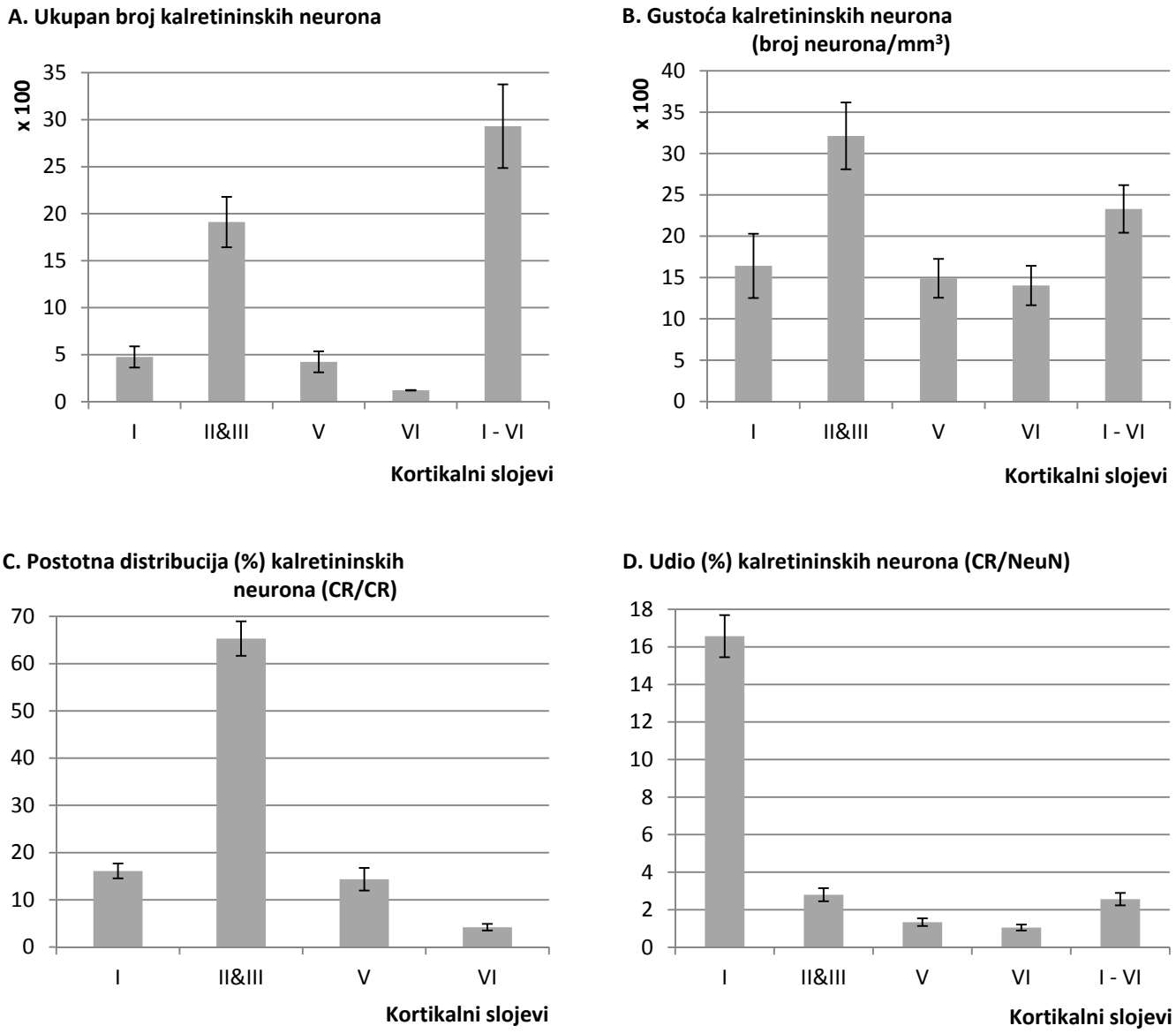
MO polje Štakor SLOJ	Gustoća neurona (NeuN/mm^3)	SD	Gustoća CR neurona (CR/mm^3)	SD	% CR/NeuN	SD	% NeuN/NeuN	SD	% CR/NeuN	SD
I	9.519	1.656	1.641	389	16,57	1,12	2,5	0,40	16,1	1,58
II&III	109.347	7.821	3.213	405	2,80	0,35	59,8	2,11	65,3	3,64
V	105.532	13.977	1.490	236	1,34	0,20	27,4	3,25	14,4	2,39
VI	137.843	7.229	1.403	238	1,05	0,16	10,3	1,71	4,2	0,70
Svi slojevi	87.257	8.663	2.329	288	2,57	0,33				

Tablica 5-4: Tablica prikazuje volumen (mm^3), ukupan broj neurona (NeuN) i ukupan broj kalretininskih (CR) neurona slojevima u **medio-orbitalnom (MO) polju štakora** po slojevima za svaku analiziranu životinju. CE označava koeficijent greške po Gundersenu.

	Štakor 1 (R 529)					Štakor 2 (R 530)					Štakor 3 (R 531)				
MO polje Štakor SLOJ	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**
I	0,33	3.426	0,07	605	0,09	0,35	2.652	0,06	409	0,13	0,24	2.482	0,06	413	0,11
II&III	0,66	67.175	0,04	2.153	0,08	0,68	74.165	0,04	1.957	0,09	0,54	63.492	0,04	1.623	0,09
V	0,39	35.822	0,04	546	0,10	0,27	29.150	0,04	327	0,15	0,24	28.909	0,04	396	0,12
VI	0,07	9.656	0,04	118	0,22	0,10	13.572	0,03	123	0,24	0,08	11.974	0,04	123	0,21
Svi slojevi	1,46	116.079	0,05	3.423	0,12	1,40	119.539	0,04	2.816	0,15	1,10	106.857	0,05	2555	0,13



Slika 5-41: Na grafovima su prikazani podaci dobiveni analizom **NeuN rezova medio-orbitalnog (MO) polja štakora**. (A) Ukupan broj neurona po pojedinom sloju; (B) Ukupan volumen pojedinih slojeva (mm^3); (C) Gustoća neurona u pojedinom sloju (broj neurona/mm^3); (D) Postotna distribucija (%) od ukupnog broja neurona po slojevima.



Slika 5-42: Na grafovima su prikazani podaci dobiveni analizom **kalretininskih rezova medio-orbitalnog (MO) polja štakora**. (A) Ukupan broj neurona po pojedinom sloju; (B) Gustoća neurona u pojedinom sloju (broj neurona/mm^3); (C) Postotna distribucija (%) od ukupnog broja kalretininskih neurona po slojevima; (D) Udio (%) kalretininskih neurona u pojedinom sloju.

5.2.1.2 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u majmuna

Izvorni podaci po pojedinoj životinji, sa standardnim devijacijama i Gundersenovim koeficijentom greške prikazani su u tablicama 5-5, 5-6 i 5-7.

U Brodmannovom polju 14c u majmuna (Slika 5-43) ukupan broj neurona prosječno iznosi oko 800.000 (Slika 5-43A), što je sedam puta više nego u štakora. Oko polovice neurona (50%) smješteno je u slojevima II/III, dok slojevi V i VI sadrže približno jednak broj neurona (145.000-182.000 neurona po sloju, približno 20% po sloju) (Slika 5-43D). U sloju I nalazi se prosječno 5,5% neurona (~40.000). Ovi podaci pokazuju kako u odnosu na štakora najveći porast u broju neurona imaju slojevi I i VI (12-15 puta).

Ukupan volumen u polju 14c prosječno iznosi oko 12mm^3 (Slika 5-43B), što je gotovo deseterostruko povećanje u odnosu na štakora. Kao i u štakora, najveći volumen imaju slojevi II/III (zajedno 5,6mm^3), dok ostali slojevi imaju približno jednake volumene u rasponu od 2-2,5mm^3 po pojedinom sloju. Ovdje treba naglasiti kako po ovom obilježju postoji jasna razlika u odnosu na štakora gdje sloj VI ima tri puta manji volumen u usporedbi sa slojem I i slojem V.

Prosječna gustoća neurona u polju 14c iznosi oko 63.000 neurona po mm^3 (Slika 5-43C), što je za 30% manje od gustoće neurona u štakora. Očekivano, od prosjeka najviše odstupa sloj I gdje gustoća iznosi oko 20.000 neurona/mm^3. U svim preostalim slojevima gustoća je približno jednaka i kreće se od 71.000-73.000 neurona/mm^3. Najveće smanjenje gustoće neurona je u sloju VI, gdje je u majmuna gustoća gotovo dvostruko manja nego u štakora. Zanimljivo je kako je u sloju I gustoća neurona kod majmuna dvostruko veća no u štakora.

Tablica 5-5: Tablica prikazuje volumen (mm^3), ukupan broj neurona (NeuN) i ukupan broj kalretininskih (CR) neurona po slojevima u **polju 14 kaudalno (14c) majmuna**. CE označava koeficijent greške po Gundersenu. SD označava standardnu devijaciju.

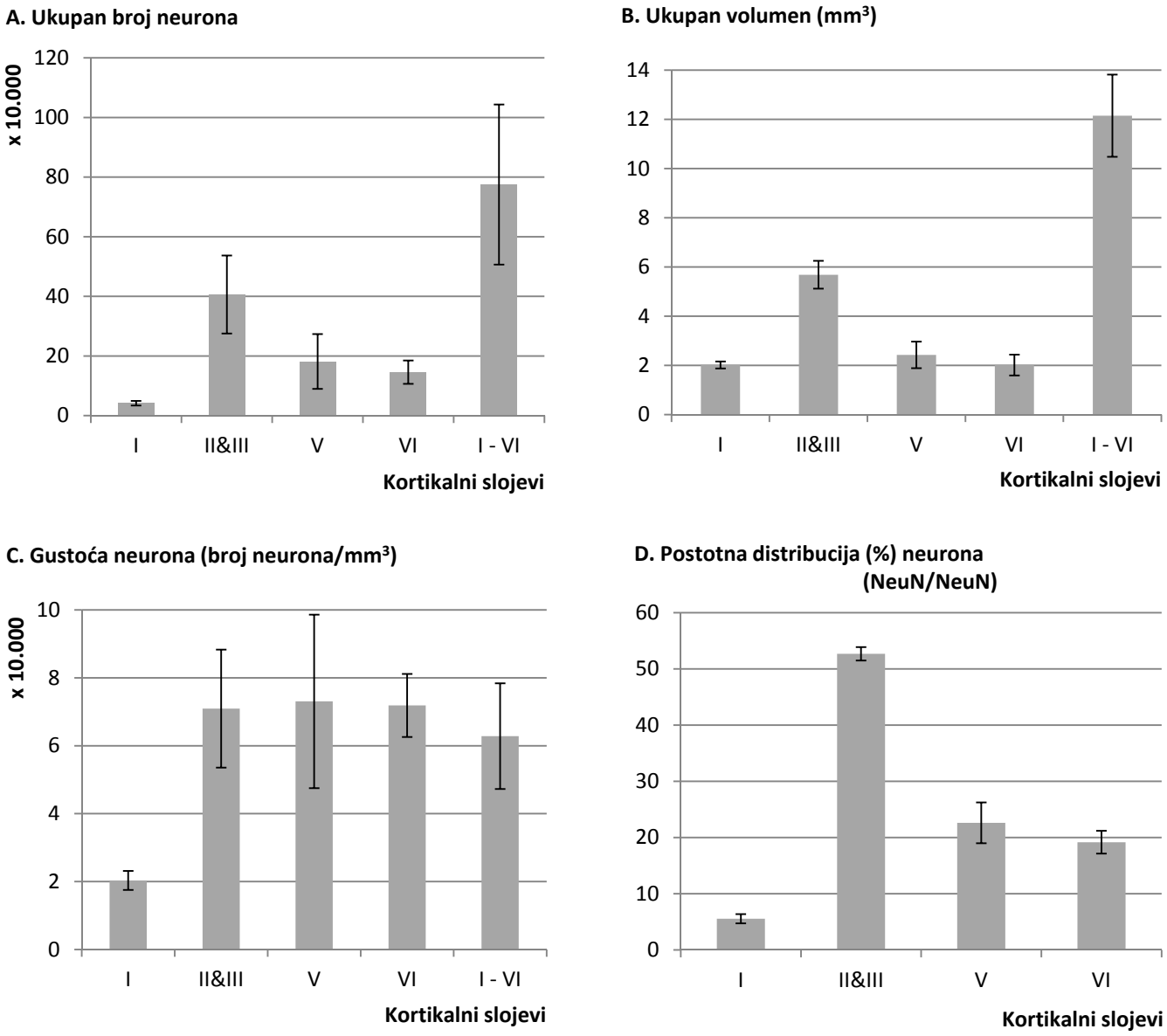
Polje 14c Majmun SLOJ	Volumen [mm^3]	SD	Ukupni broj NeuN stanica	SD	CE	Ukupni broj CR stanica	SD	CE
I	2,0	0,14	41.540	7.563	0,07	21.304	6.724	0,06
II&III	5,7	0,57	406.161	130.804	0,04	56.554	25.112	0,04
V	2,4	0,54	181.532	92.104	0,05	12.955	4.536	0,07
VI	2,0	0,43	145.731	39.062	0,06	7.757	3.570	0,08
Svi slojevi	12,1	1,67	774.965	268.669	0,05	98.571	38.484	0,06

Tablica 5-6: Tablica prikazuje ukupnu gustoću neurona (NeuN po mm^3), gustoću kalretininskih (CR po mm^3) neurona, udio (%) kalretininskih neurona u odnosu na ukupan broj neurona, postotnu distribucija ukupnog broja neurona (NeuN/NeuN) i kalretininskih (CR/CR) neurona po slojevima **u polju 14c u majmuna**. SD označava standardnu devijaciju.

Polje 14c Majmun SLOJ	Gustoća neurona (NeuN/mm^3)	SD	Gustoća CR neurona (CR/mm^3)	SD	% CR/NeuN	SD	% NeuN/NeuN	SD	% CR/NeuN	SD
I	20.316	2.802	10.482	3.122	50,5	9,1	5,5	0,82	22,1	1,9
II&III	70.937	17.379	9.893	3.880	13,6	2,9	52,7	1,19	56,5	3,4
V	73.070	25.547	5.254	904	7,6	1,7	22,6	3,63	13,7	3,6
VI	71.874	9.300	4.003	2.267	5,4	2,7	19,2	2,02	7,8	2,2
Svi slojevi	62.828	15.576	8.060	2.776	12,6	2,2				

Tablica 5-7: Tablica prikazuje volumen (mm^3), ukupan broj neurona (NeuN) i ukupan broj kalretininskih (CR) neurona **u polju 14c u majmuna** po slojevima za svaku analiziranu životinju. CE označava koeficijent greške po Gundersenu. N/A označava da koeficijent greške nije analiziran.

	Majmun 1 (Mon V)					Majmun 2 (Mon VI)					Majmun 3 (Mon VII)				
Polje 14c Majmun SLOJ	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**
I	2,2	49.776	0,06	27.214	0,05	2	34.908	N/A	13.987	N/A	1,9	39.935	0,08	22.709	0,06
II&III	6,2	554.497	0,03	81.958	0,03	5,7	307.357	N/A	31.745	N/A	5,1	356.630	0,05	55.960	0,05
V	3,0	285.714	0,04	18.190	0,05	2,4	110.930	N/A	10.504	N/A	1,9	147.952	0,06	10.172	0,09
VI	2,5	190.829	0,05	9.492	0,08	2	123.853	N/A	3.650	N/A	1,6	122.511	0,06	10.129	0,07
Svi slojevi	13,8	1.080.817	0,05	136.854	0,05	12,1	577.049	N/A	59.888	N/A	10,5	667.028	0,063	98.970	0,07

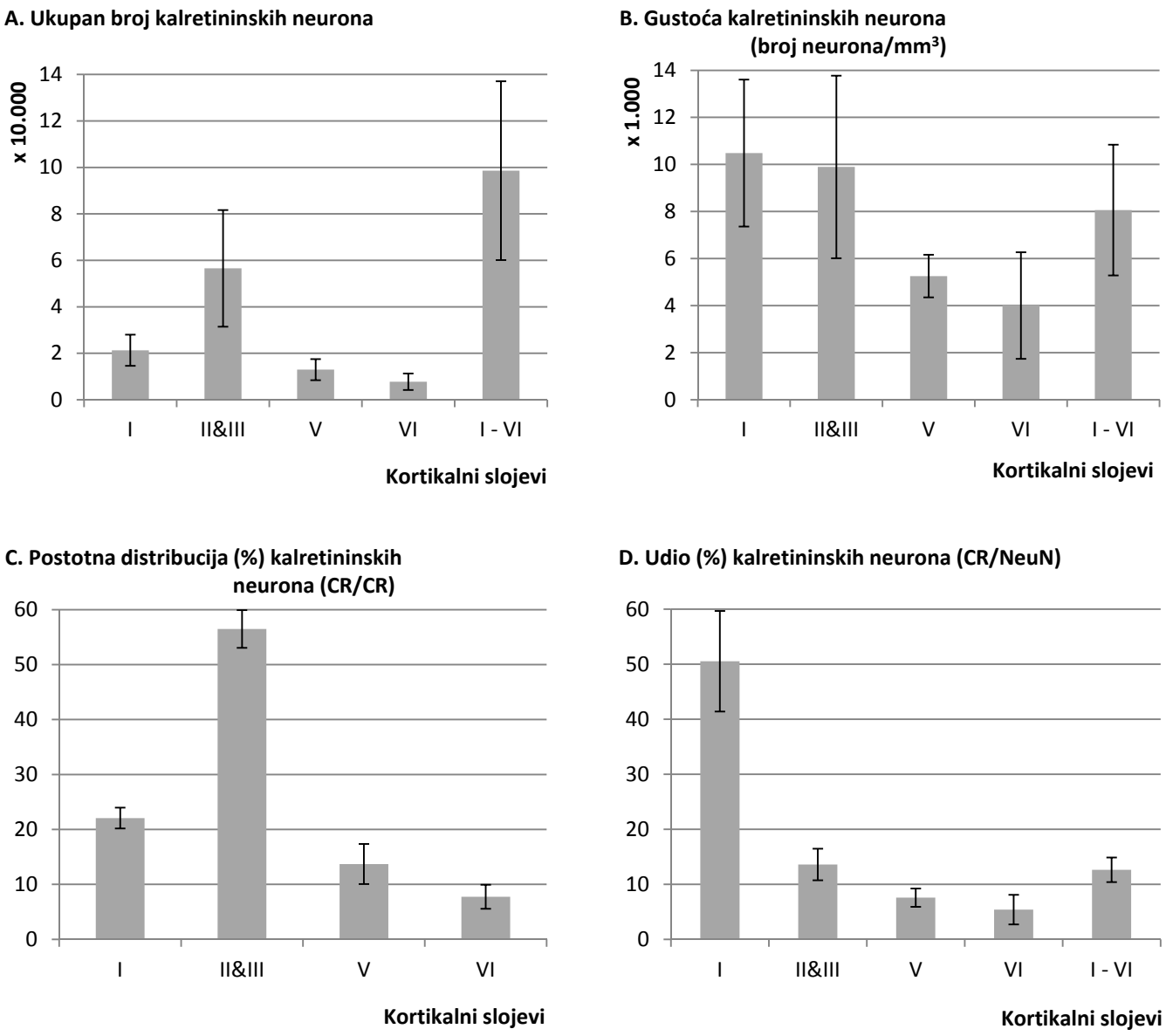


Slika 5-43: Na grafovima su prikazani podaci dobiveni analizom **NeuN rezova polja BA 14c majmuna**. (A) Ukupan broj neurona po pojedinom sloju; (B) Ukupan volumen pojedinih slojeva (mm^3); (C) Gustoća neurona u pojedinom sloju (broj neurona/mm^3); (D) Postotna distribucija (%) od ukupnog broja neurona po slojevima.

Kalretininski neuroni (Slika 5-44) predstavljaju 12,6% od ukupnog broja neurona u polju 14c kod majmuna (Slika 5-44D), što je gotovo šesterostruko povećanje u odnosu na štakora. Njihov ukupan broj povećanje se 33 puta i iznosi oko 100.000 neurona (Slika 5-44A).

Više od polovice kalretininskih neurona smješteno je u slojevima II/III (~56.000 neurona), a preostali su približno jednako raspodijeljeni između sloja I (~21.000 neurona) i slojeva V i VI (~21.000 neurona) (Slika 5-44C). Laminarna distribucija kalretininskih neurona pokazuje kako je kod majmuna u odnosu na štakora oko 10% kalretininskih neurona preraspodijeljeno između slojeva I i VI (gdje se njihov udio povećava), te slojeva II/III gdje se njihov udio smanjuje.

Najveća gustoća kalretininskih neurona je u sloju I, koji ima tri i pol puta manju gustoću neurona od ostalih slojeva i gdje ona iznosi nešto više od 10.000 neurona/mm^3. Slična gustoća je u slojevima II/III (nešto ispod 10.000 neurona/mm^3), a u slojevima V i VI je ona manja i kreće se između 4.000–5.200 neurona/mm^3 (Slika 5-44B). Povećanje gustoće kalretininskih neurona kod majmuna u odnosu na štakora iznosi oko tri puta za sve kortikalne slojeve, osim za sloj I gdje se njihova gustoća povećava šest puta. Stoga u sloju I kalretininski neuroni čine 50%, dok u sloju III čine 14% populacije. Najmanje kalretininskih neurona nalazimo u slojevima V (7,5%) i VI (5,5%).



Slika 5-44: Na grafovima su prikazani podaci dobiveni analizom **kalretininskih rezova polja BA 14c majmuna**. (A) Ukupan broj neurona po pojedinom sloju; (B) Gustoća neurona u pojedinom sloju (broj neurona/mm^3); (C) Postotna distribucija (%) od ukupnog broja kalretininskih neurona po slojevima; (D) Udio (%) kalretininskih neurona u pojedinom sloju.

5.2.1.3 Brodmannovo polje 14 kaudalno (14c) u čovjeka

Izvorni podaci po pojedinom subjektu, sa standardnim devijacijama te i Gundersenovim koeficijentom greške, prikazani su u tablicama 5-8, 5-9 te 5-10.

U Brodmannovom polju 14c u čovjeka (Slika 5-45) ukupan broj neurona prosječno iznosi blizu 4.700.000 (Slika 5-45A), što je šest puta više nego u majmuna. Trećina neurona (33%) nalazi se u sloju V, a nešto više neurona (~41%) smješteno je u slojevima II/III. U sloju VI se nalazi dvostruko manje neurona (19%), dok je najmanji broj neurona u sloju I (7%) (Slika 5-45D).

Ukupno povećanje broja neurona u čovjeka u odnosu na majmuna je oko šest puta, ali je ono nešto više izraženo u sloju I i V (oko osam puta), a nešto manje (oko pet puta) u slojevima II/III.

Povećanje u broju neurona tri puta je manje od povećanja volumena (Slika 5-45B), te dolazi do dramatičnog smanjenja gustoće neurona u odnosu na majmuna (prosječno oko tri puta). Prosječna gustoća neurona u polju 14c iznosi kod čovjeka oko 20.000 neurona/mm^3 (Slika 5-45C), što je gustoća koju ima „hipocelularni/hiponeuralni“ sloj I u majmuna.

Sloj I kod čovjeka ima gustoću oko 9.000 neurona/mm^3, što je dvostruko manje nego kod majmuna, a odgovara gustoći neurona u sloju I kod štakora. Najveća gustoća neurona je u sloju V (nešto više od 31.000/mm^3), što je za 50% više od gustoće u preostalim slojevima.

Ukupan volumen u polju 14c kod čovjeka prosječno iznosi blizu 220mm^3 (Slika 5-45B), te je to povećanje od gotovo dvadeset puta u odnosu na majmuna.

Kao i u štakora i majmuna, najveći volumen imaju slojevi II/III (zajedno ~95mm^3), nakon čega slijedi sloj V s volumenom od približno 48mm^3. Slojevi I i VI imaju približno jednake volumene (~35-40mm^3 po sloju).

Promatrajući odnose volumena između slojeva vidljivo je kako kod čovjeka u odnosu na majmuna dolazi do relativnog povećanja u ukupnom volumenu sloja V i blagog smanjenja udjela slojeva II/III.

Tablica 5-8: Tablica prikazuje volumen (mm^3), ukupan broj neurona (NeuN) i ukupan broj kalretininskih (CR) neurona po slojevima **u polju 14 kaudalno (14c) čovjeka**. CE označava koeficijent greške po Gundersenu. SD označava standardnu devijaciju.

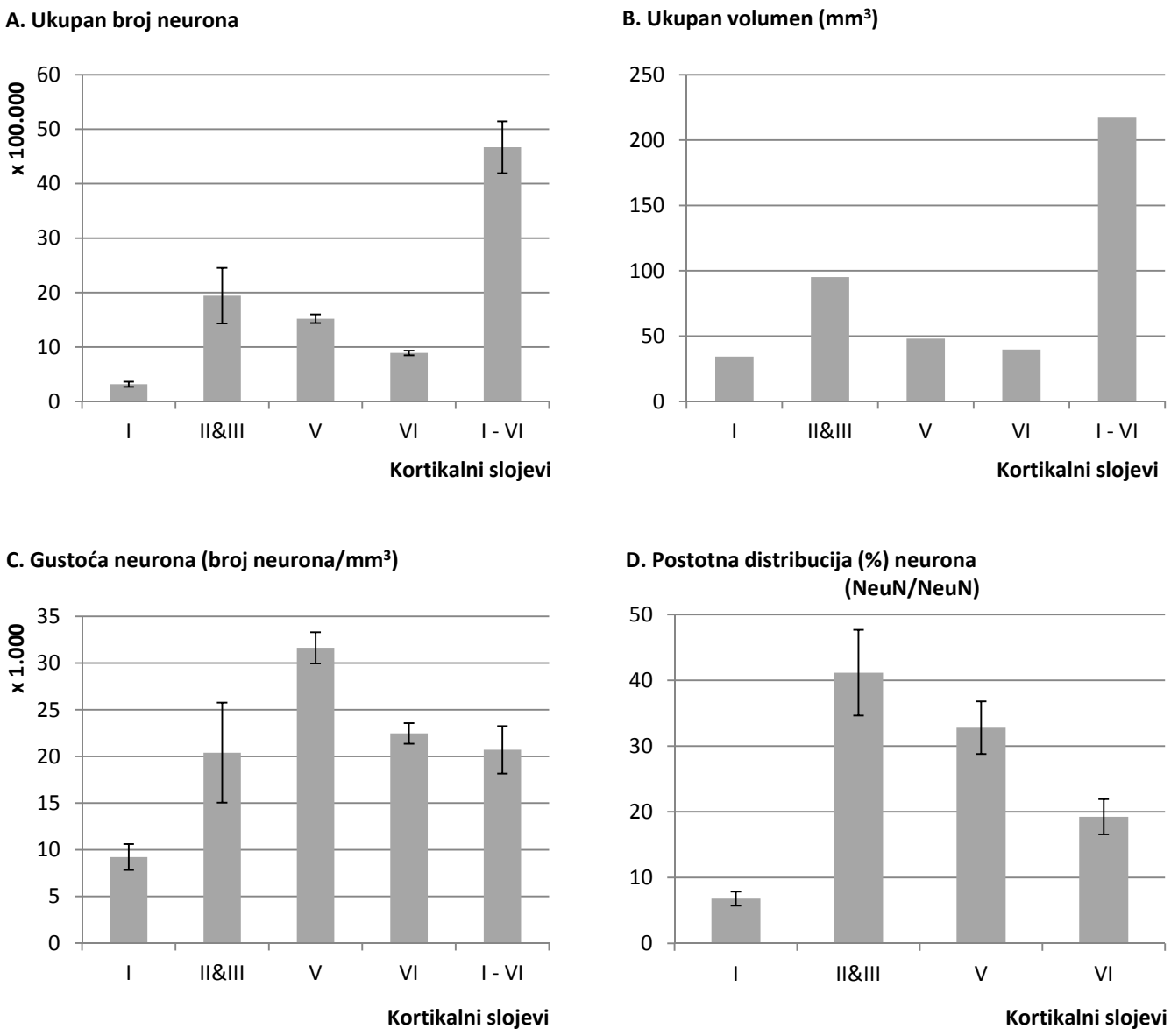
Polje 14c Čovjek SLOJ	Volumen [mm^3]	Ukupni broj NeuN stanica	SD	CE	Ukupni broj CR stanica	SD	CE
I	34,3	316.325	47.545	0,07	163.758	14.337	0,09
II&III	95,2	1.942.251	510.370	0,07	402.273	43.313	0,08
V	48,1	1.520.162	80.714	0,07	87.573	25.476	0,10
VI	39,6	890.165	43.520	0,08	33.687	7.453	0,11
Svi slojevi	217,2	4.668.902	476.615	0,07	687.291	71.774	0,10

Tablica 5-9: Tablica prikazuje ukupnu gustoću neurona (NeuN po mm^3), gustoću kalretininskih (CR po mm^3) neurona, udio (%) kalretininskih neurona u odnosu na ukupan broj neurona, postotnu distribucija ukupnog broja neurona (NeuN/NeuN) i kalretininskih (CR/CR) neurona po slojevima u **polju 14c čovjeka**. SD označava standardnu devijaciju.

Polje 14c Čovjek SLOJ	Gustoća neurona (NeuN/mm^3)	SD	Gustoća CR neurona (CR/mm^3)	SD	% CR/NeuN	SD	% NeuN/NeuN	SD	% CR/NeuN	SD
I	9217	1385	5578	488	52,1	4,3	6,8	1,1	23,9	1,75
II&III	20399	5360	4054	436	22,0	7,2	41,2	6,5	58,5	2,56
V	31631	1679	2193	638	5,8	2,0	32,8	4,0	12,6	2,63
VI	22461	1098	946	209	3,8	0,8	19,2	2,7	4,9	1,08
Svi slojevi	20704	2542	3488	288	14,9	2,7				

Tablica 5-10: Tablica prikazuje volumen (mm^3), ukupan broj neurona (NeuN) i ukupan broj kalretininskih (CR) neurona u **polju 14c čovjeka** po slojevima za svako analizirano tkivo. CE označava koeficijent greške po Gundersenu. N/A – volumen nije analiziran stereološki. Na temelju rostralne i kaudalne delineacije polja, broja i debljine rezova, te prosječne površine polja na rezu, podaci o ukupnoj površini polja pokazali su odstupanje do 5% od vrijednosti ČO378. Stoga je kao referentna vrijednost za izračunavanje broja neurona preuzeta vrijednost ČO378.

	Čovjek 1 (ČO 376)					Čovjek 2 (ČO 378)					Čovjek 3 (ČO 379)				
Polje 14c Čovjek SLOJ	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**	**Volumen [mm^3]**	**Ukupan broj neurona**	**CE**	**Ukupan broj CR neurona**	**CE**
I	N/A	268.742	0,10	153.381	0,12	34,3	363.831	0,06	180.117	0,06	N/A	316.402	0,06	157.777	0,08
II&III	N/A	1.509.866	0,11	424.556	0,13	95,2	1.811.658	0,05	429.907	0,04	N/A	2.505.229	0,05	352.355	0,08
V	N/A	1.592.209	0,10	70.467	0,15	48,1	1.432.936	0,05	116.852	0,04	N/A	1.535.340	0,05	75.402	0,1
VI	N/A	903.601	0,11	42.208	0,19	40,0	925.383	0,06	30.472	0,05	N/A	841.511	0,06	28.382	0,1
Svi slojevi	N/A	4.274.418	0,11	690.611	0,15	217,2	4.533.808	0,06	757.347	0,05	N/A	5.198.482	0,06	613.915	0,09



Slika 5-45: Na grafovima su prikazani podaci dobiveni analizom **NeuN rezova polja BA 14c čovjeka**. (A) Ukupan broj neurona po pojedinom sloju; (B) Ukupan volumen pojedinih slojeva (mm^3); (C) Gustoća neurona u pojedinom sloju (broj neurona/mm^3); (D) Postotna distribucija (%) od ukupnog broja neurona po slojevima.

Kalretininski neuroni (Slika 5-46) predstavljaju gotovo 15% od ukupnog broja neurona u polju 14c kod čovjeka (Slika 5-46D), što je 20% više u odnosu na majmuna. Njihov ukupan broj iznosi oko 700.000 (Slika 5-46A).

Više od polovice (58,5%) kalretininskih neurona smješteno je u slojevima II/III (~400.000 neurona), a gotovo četvrtina (24%) smještena je u sloju I. U sloju V se nalazi 12,6% kalretininskih neurona, što je dva i pol puta više od sloja VI (5%) (Slika 5-46C). Distribucija kalretininskih neurona po slojevima vrlo je slična onoj kod majmuna.

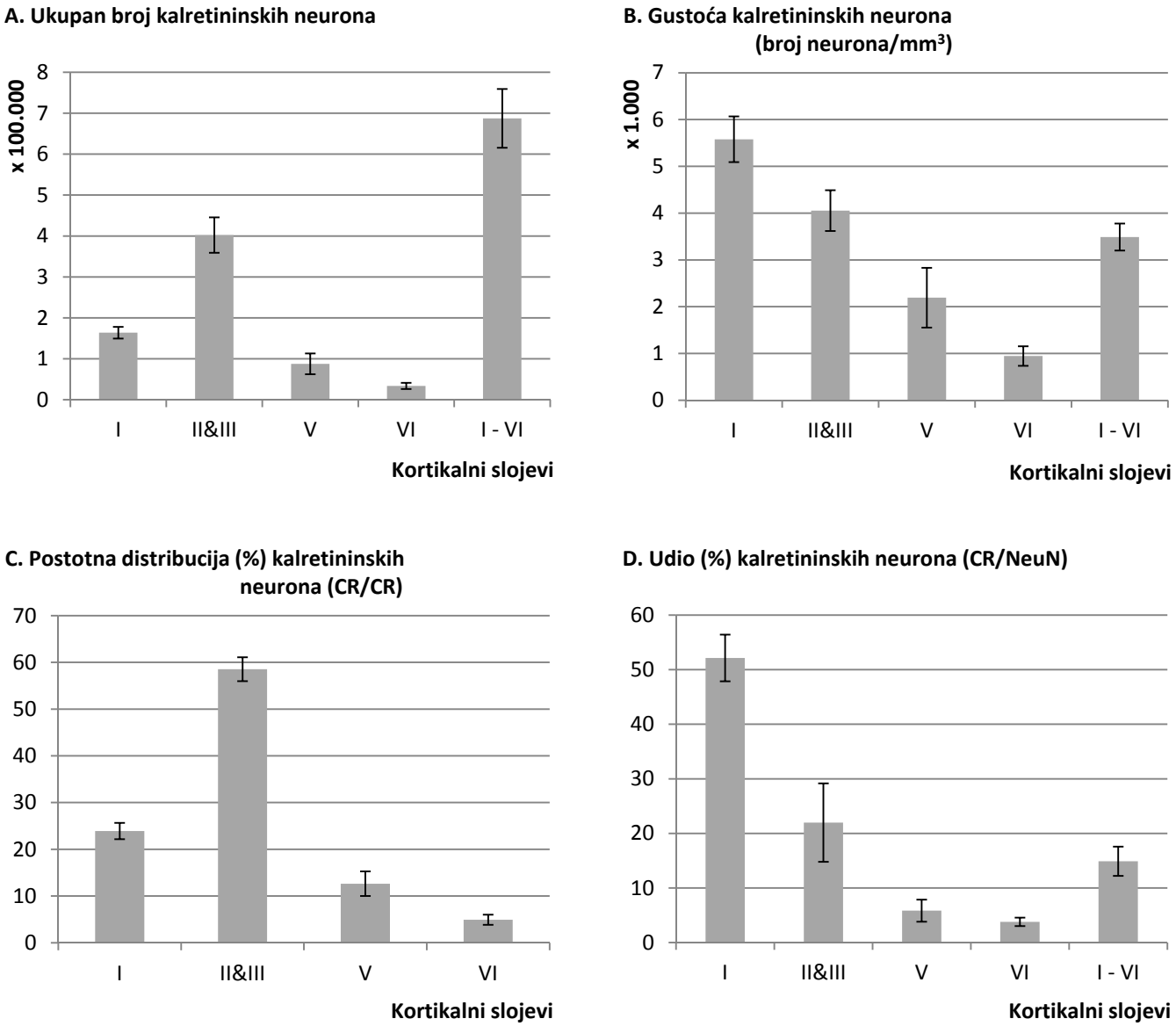
U odnosu na majmuna gustoća kalretininskih neurona (Slika 5-46B) se smanjuje prosječno za tri puta, što je razumljivo jer odgovara omjeru povećanja volumena slojeva i povećanja ukupnog broja neurona.

Najveća gustoća kalretininskih neurona je u sloju I, koji ima dva do tri puta veću gustoću neurona od ostalih slojeva, te iznosi oko 5.500 neurona/mm^3. Za trećinu je manja gustoća u slojevima II/III (~4.000 neurona/mm^3). Značajno veća gustoća kalretininskih neurona u sloju I naspram slojeva II/III kod čovjeka predstavlja jasnu razliku prema majmunu gdje je gustoća kalretininskih neurona kroz slojeve I-III približno jednaka.

Sloj V ima dvostruko manju gustoću (~2.200 neurona/mm^3), a daljnje smanjenje vidljivo je u sloju VI (~950 neurona/mm^3). Ova tendencija je slična onoj u majmuna, s tom razlikom što kod majmuna sloj VI ima sam 20% manju gustoću kalretininskih neurona u sloju V, dok je kod čovjeka ona upola manja.

Najveći udio kalretininskih neurona u ukupnom broju nalazi se u sloju I, gdje su više od polovice (52%) neurona kalretininski (Slika 5-46C). U slojevima II/III više od petine neurona (22%) su kalretininski, dok je taj postotak značajno manji u slojevima V (6%) i VI (4%).

U odnosu na majmuna udio kalretininskih neurona u slojevima II/III povećava se za 50%. U ostalim slojevima postotak neurona koji izražavaju kalretinin vrlo je sličan onome kod majmuna, iako se može uočiti smanjenje udjela u slojevima V i VI za oko 20%. Obzirom na mali postotak neurona koji izražavaju kalretinin u ovim slojevima ta odstupanja se kreću samo oko 1,5%.



Slika 5-46: Na grafovima su prikazani podaci dobiveni analizom **kalretininskih rezova polja BA 14c čovjeka**. (A) Ukupan broj neurona po pojedinom sloju; (B) Gustoća neurona u pojedinom sloju (broj neurona/mm^3); (C) Postotna distribucija (%) od ukupnog broja kalretininskih neurona po slojevima; (D) Udio (%) kalretininskih neurona u pojedinom sloju.

5.2.2 Usporedba podataka između vrsta

5.2.2.1 Promjene volumena slojeva, ukupnog broj neurona i gustoće neurona između analiziranih vrsta

Ukupan volumen u Brodmannovom polju 14c kod čovjeka prosječno iznosi blizu 220mm^3, što je povećanje od osamnaest puta u odnosu na majmuna gdje ukupan volumen iznosi oko 12mm^3, a koje je gotovo devet puta veći od ukupnog volumena medio-orbitalnog (MO) polja u štakora koji prosječno iznosi oko 1,3mm^3 (Slika 5-47). Stoga je ukupan volumen polja 14c kod čovjeka 165 puta veći od volumena MO polja štakora.

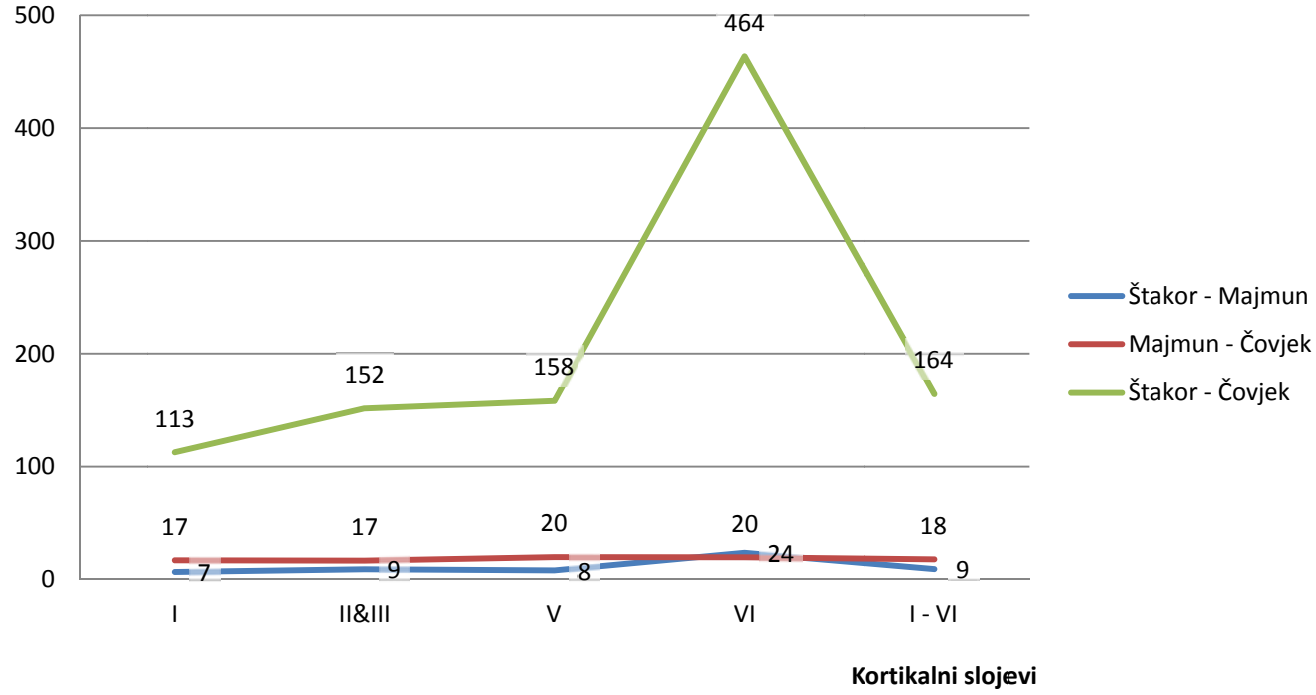
Stopa promjene ukupnog volumena (Slika 5-47B) između *majmuna i čovjeka* ne pokazuje značajnija odstupanja po slojevima u odnosu na povećanje ukupnog volumena (~18x), s tendencijom da se volumen u slojevima V i VI povećava nešto više (~20x) od onoga u slojevima I-III (~17x).

Za razliku od toga, kod povećanja volumena između *štakora i majmuna* (shodno tome i između štakora i čovjeka), približno se tri puta više od prosjeka povećava volumen u sloju VI. Također, povećanje volumena sloja I je 25-30% ispod prosjeka povećanja volumena.

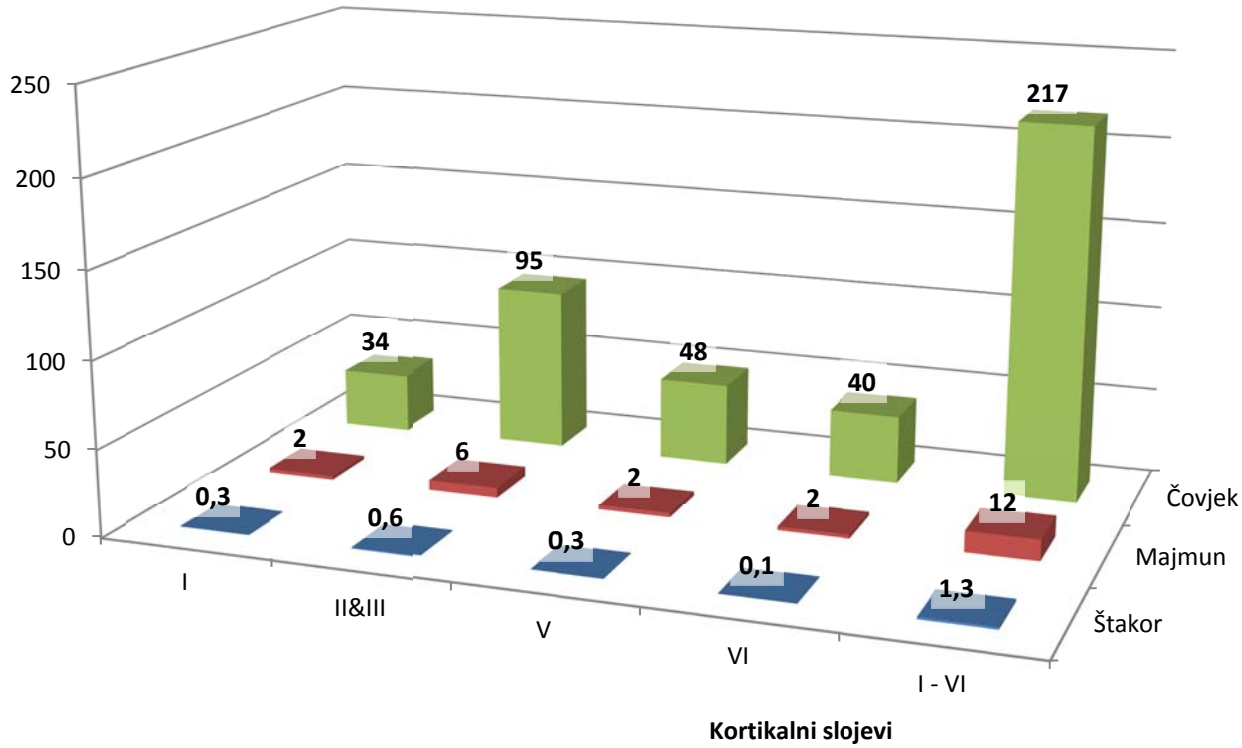
Analiza postotnog udjela volumena pojedinih slojeva potvrđuje kako promjene u sloju I i u sloju VI nisu linearne (Slika 5-48). Zbog toga je postotni udio volumena sloja I (Slika 5-48A) kod štakora (23%) statistički značajno veći nego kod majmuna i čovjeka (~16%), dok je kod sloja VI (Slika 5-48D) on gotovo tri puta manji kod štakora (6,6%) nego kod majmuna i čovjeka (16,5-18%). U svih vrsta volumen slojeva II/III je nešto ispod polovice (Slika 5-48B), a sloja V oko petine ukupnog volumena (Slika 5-48C).

Sažimajući, podaci o promjenama volumena ukazuju da u pravilu dolazi do linearnog povećanja između štakora prema majmunu i čovjeku, ali je nelinearno povećanje volumena iznad prosjeka vidljivo je u sloju VI i nešto manje povećanje od prosjeka u sloju I. Stoga ovi podaci ukazuju na moguću filogenetsku specijalizaciju unutar slojeva I i VI koja se zbiva između glodavaca i primata.

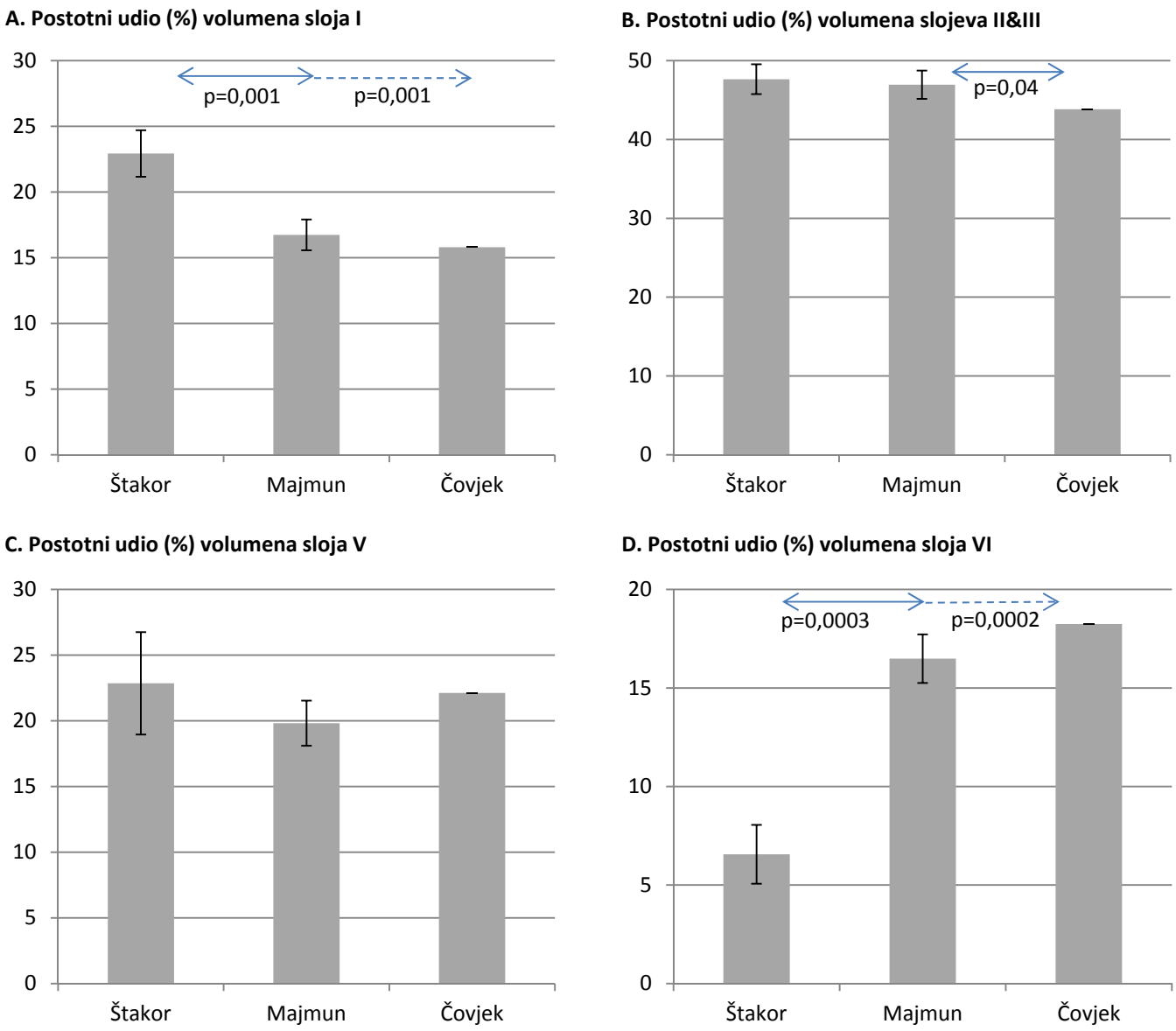
A. Stopa povećanja volumena



B. Usporedba volumena (mm³)



Slika 5-47: (A) Stopa povećanja volumena po slojevima između vrsta; (B) Promjene volumena (mm^3) po slojevima između vrsta.



Slika 5-48: Usporedba postotnog (%) volumena između analiziranih vrsta (volumen po sloju/ukupan volumen) (A) za sloj I, (B) slojeve II/III, (C) sloj V i (D) sloj VI.

U polju 14c čovjeka ukupan broj neurona (NeuN) prosječno iznosi blizu 4.700.000 (Slika 5-49B), što je šest puta više nego u majmuna (~800.000), a što je pak sedam puta više od štakora (~114.000). Stoga je broj neurona kod čovjeka četrdeset puta veći nego kod štakora.

Primjetno je da stopa povećanja broja neurona između štakora i majmuna, te majmuna i čovjeka približno ista (Slika 5-49A). To je značajno drugačije od promjene volumena koji ima dvostruko veću stopu povećanja između majmuna i čovjeka, nego između štakora i majmuna.

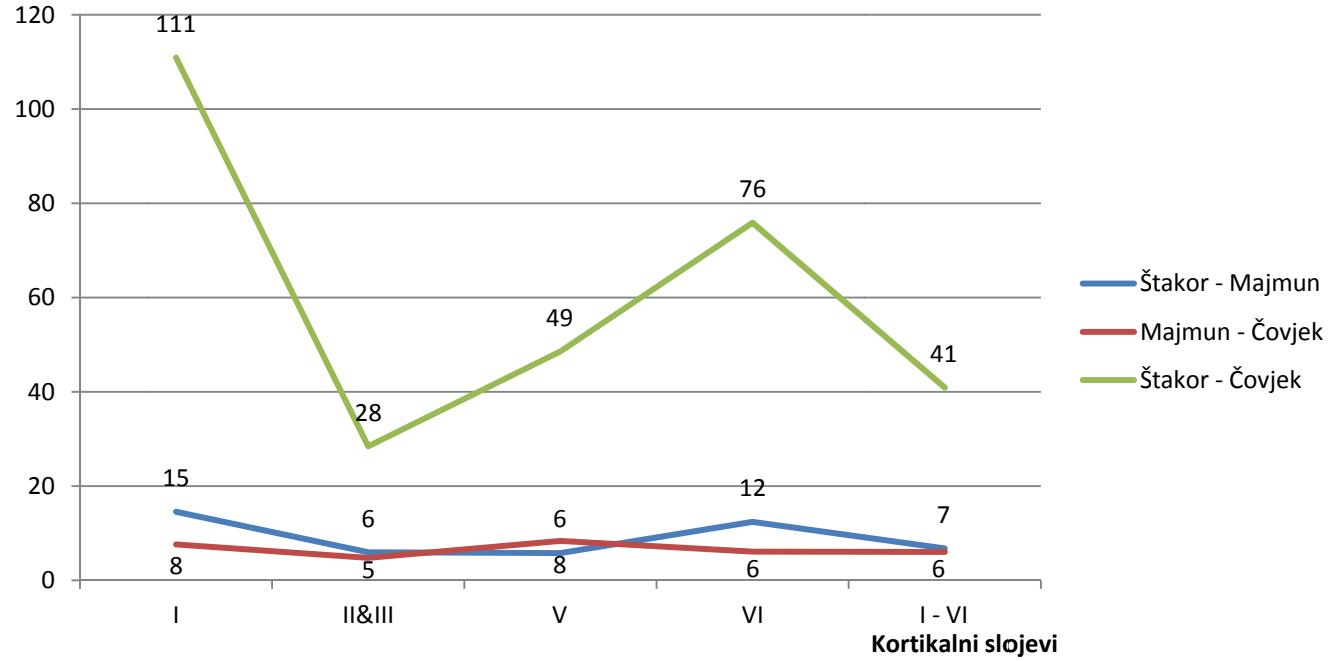
Stopa promjene ukupnog broja neurona između *štakora i majmuna* pokazuje dvije različite tendencije (Slika 5-49A); jednu tendenciju imaju slojevi II-V, gdje se broj neurona poveća za približno šest puta. U preostalim slojevima povećanje je dvostruko veće; nešto je veće u sloju I (14,6x) nego u sloju VI (12,4x).

Stopa promjene između *majmuna i čovjeka* pokazuje da svaki sloj ima različitu dinamiku promjena, s time da su najveća odstupanja u slojevima II/III (povećanje ~5x) naspram V (povećanje ~8,5x), a što je potpuno suprotno od promjene koja se zbiva između štakora i majmuna gdje ovi slojevi imaju približno isto povećanje.

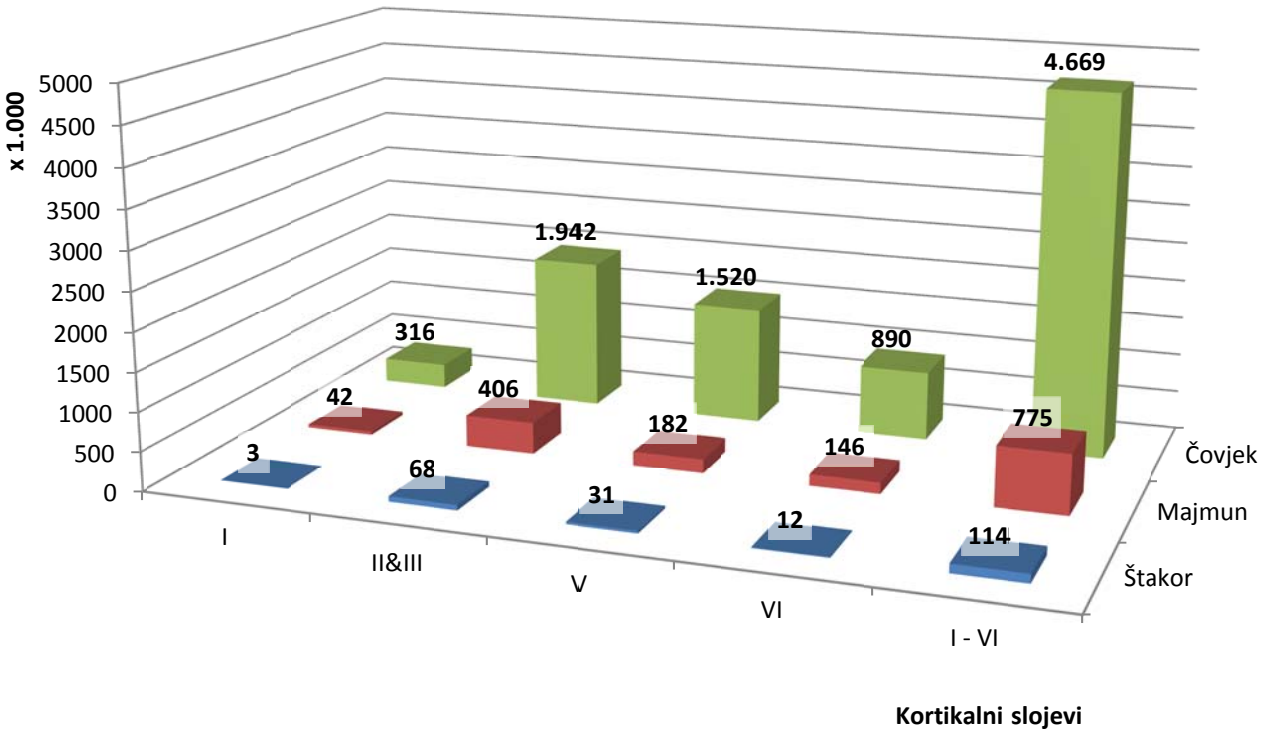
Povećanje broja neurona do kojega dolazi između majmuna i čovjeka je nešto veće u sloju I (~7,5x) nego u sloju VI (~6x), što je blisko relativnoj razlici stope povećanja između ova dva sloja koja je prisutna između štakora i majmuna.

Zbog toga je najveća stopa povećanja u broju neurona između štakora i čovjeka (ukupno za sve slojeve iznosi 41x) prisutna u sloju I (111x), a gotovo dvostruko veće povećanje od prosječnog primjetno je i u sloju VI (76x). Pomalo je iznenađujuće da se ukupan broj neurona u slojevima II/III najmanje povećava (28,5x), gotovo dvostruko manje nego u sloju V (48,5x).

A. Stopa promjene ukupnog broja neurona (NeuN)



B. Usporedba ukupnog broja neurona (NeuN)



Slika 5-49: (A) Stopa povećanja ukupnog broja neurona (NeuN) između vrsta; (B) Promjene ukupnog broja neurona po slojevima između vrsta.

Analiza postotnog udjela broja neurona po pojedinom sloju pokazuju tendenciju da se promjene u slojevima I-III odvijaju linearno kroz sve analizirane vrste, dok se promjene u slojevima V i VI zbivaju na razini dvije vrste (Slika 5-50).

Tako do povećanja udjela neurona u sloju VI (Slika 5-50D) dolazi između štakora (10%) i majmuna (19%), dok se povećanje udjela neurona sloja V dešava između majmuna (23%; štakor 27%) i čovjeka (33%) (Slika 5-50C).

Za razliku od toga, povećanje udjela neurona u sloju I pokazuje statistički značajnu razliku između štakora (2,5%) i majmuna (5,5%), te štakora i čovjeka (7%) (Slika 5-50A). U tom smislu, promjene su slične onima u sloju VI, ali uz daljnju tendenciju povećanja udjela broja neurona u sloju I između majmuna i čovjeka.

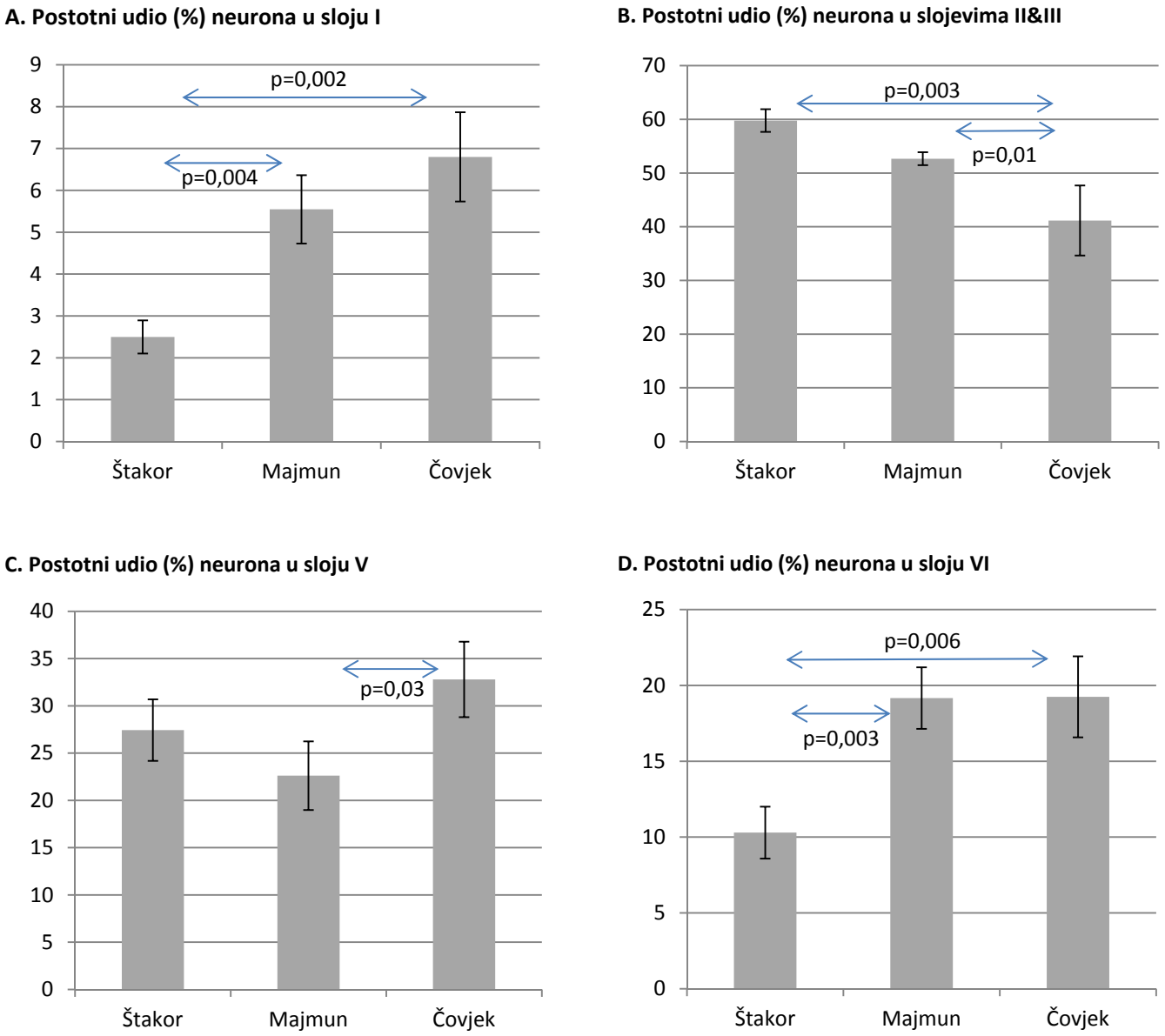
S druge strane, udio neurona u sloju II/III statistički je manji kod čovjeka (40%) kada se usporedi sa majmunom (50%) i sa štakorom (60%) (Slika 5-50 B).

U pogledu razlika među vrstama, promjene u sloju II/III zbivaju se na istoj razini kao i u sloju V, ali u suprotnom smjeru. Međutim, tendencija da se udio neurona u sloju II/III smanjuje prisutna je već između štakora i majmuna.

Sažimajući, podaci o promjenama broja neurona po slojevima pokazuju daleko veću *reorganizaciju u slojevima I i VI između štakora i majmuna*, što jasno ukazuje na moguću filogenetsku specijalizaciju unutar slojeva I i VI koja se zbiva na razini između glodavaca i primata.

Ovdje treba spomenuti da je daljnja tendencija povećanja složenosti strukture sloja I prisutna i između majmuna i čovjeka.

Posebno izražene *razlike između majmuna i čovjeka prisutne su u slojevima II/III, te sloju V*. Ovo ukazuje na funkcionalnu specijalizaciju ovih slojeva primarno kroz evoluciju u primata, iako je tendencija smanjenja udjela neurona u slojevima II/III prisutna već između štakora i majmuna.



Slika 5-50: Usporedba postotnog (%) udjela neurona (NeuN) između analiziranih vrsta (broj neurona u sloju/ukupan broj neurona; NeuN/NeuN) (A) u sloju I, (B) u slojevima II/III, (C) u sloju V, (D) u sloju VI.

Prosječna gustoća neurona (Slika 5-51) u polju 14c iznosi kod čovjeka oko 20.000 neurona po mm^3, što je vrijednost gustoće koju ima „hipocelularni/hiponeuralni“ sloj I u majmuna (Slika 5-43C).

To ukazuje na dramatično smanjenje gustoće neurona kod čovjeka u odnosu na majmuna, gdje je ona tri puta veća i iznosi 63.000 neurona/mm^3. Značajna razlika u gustoći neurona prisutna je i u usporedbi s MO poljem štakora, jer se gustoća kod majmuna značajno, ali ne toliko dramatično smanjuje, te ona kod štakora iznosi 87.000 neurona/mm^3. Ovi podaci pokazuju da je gustoća neurona u MO polju štakora četiri i pol puta veća nego u polju 14c čovjeka.

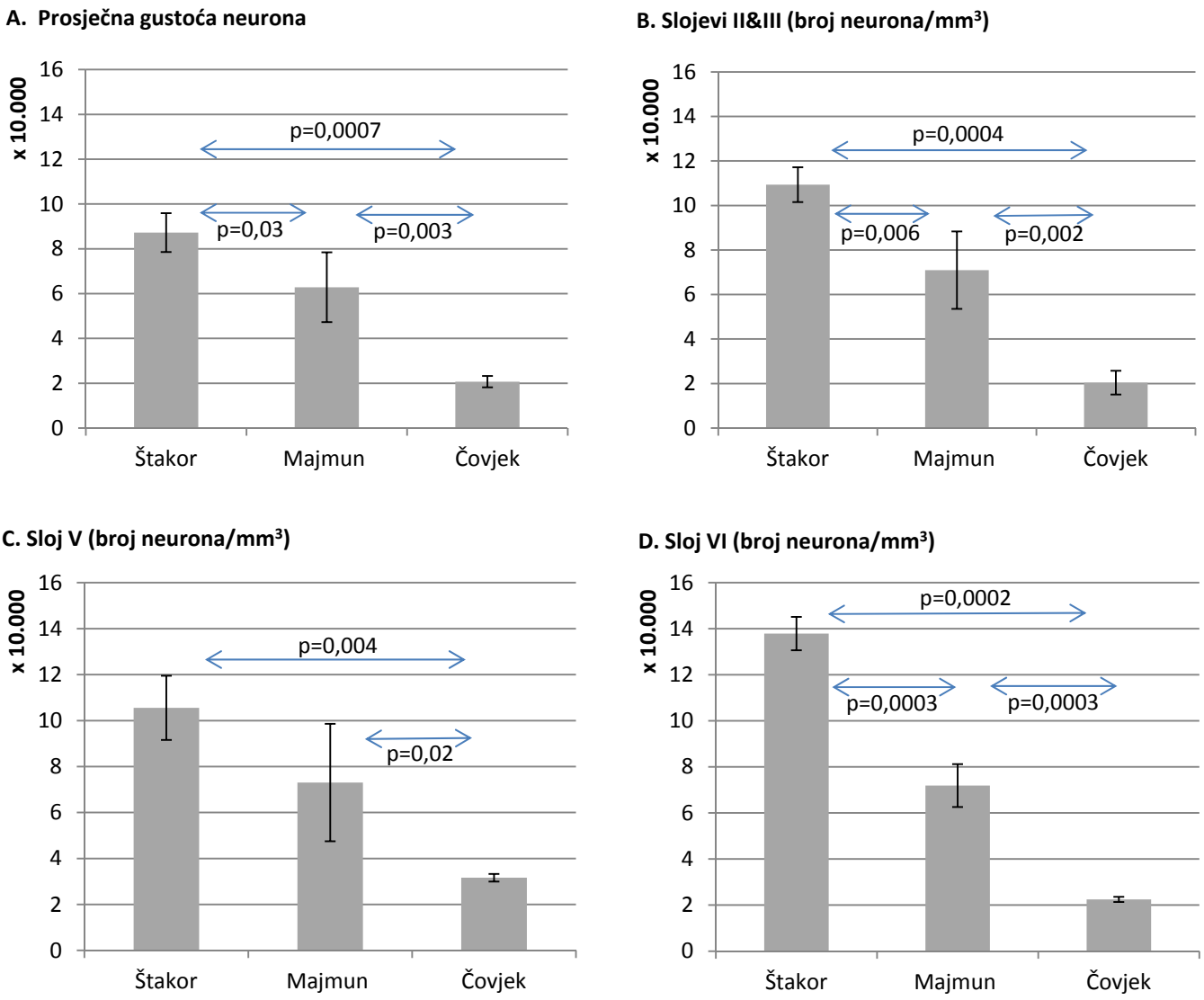
Obzirom na razlike u stopi promjena volumena i stopi promjena ukupnog broja neurona po slojevima između analiziranih vrsta, jasno je kako postoje značajne razlike u gustoći neurona između slojeva kod jedne vrste, kao i u stopi promjena gustoće između vrsta (Slika 5-51).

To je najviše izraženo u sloju I, gdje je gustoća neurona približno jednaka kod štakora i čovjeka (~10.000 neurona/mm^3), dok je u majmuna ona dvostruko veća.

U svim ostalim slojevima postoji ista tendencija statistički značajnog smanjivanja gustoće neurona od štakora prema čovjeku.

Kod majmuna je gustoća u svim preostalim slojevima približno jednaka (71.000–73.000 neurona/mm^3), dok je kod štakora gustoća u sloju VI za 30% veća (~138.000 neurona/mm^3) od one u ostalim slojevima (~106.000-109.000 neurona/mm^3).

Kod čovjeka veća gustoća neurona je u sloju V (~31.000/mm^3), dok je u ostalim slojevima ona u razini prosjeka polja (~20.000/mm^3).



Slika 5-51: Usporedba gustoće (broj/mm^3) neurona (NeuN) između analiziranih vrsta: (A) za sve slojeve, (B) slojeve II&III, (C) sloj V i (D) sloj VI.

Kako je gustoća neurona odraz kompleksnosti dendritičkog stabla, te gustoće aksona i broja sinaptičkih kontakata između neurona, zanimljivo je analizirati u kojim slojevima gustoća značajno odstupa od prosjeka, te kakve su razlike između vrsta (Slika 5-52).

Najdramatičnije razlike su ovdje vidljive u sloju I, koji je kod štakora doista „hipocelularni/hiponeuralni“ jer je gustoća na razini jedne desetine prosječne gustoće, dok kod čovjeka gustoća odgovara gotovo polovici prosječne gustoće (Slika 5-52A).

Osim sloja I, jedini sloj koji pokazuje gustoću ispod prosjeka je sloj II/III kod čovjeka (Slika 5-52B).

Zanimljivo je da gustoća neurona u sloju V za više od 50% premašuje prosječnu gustoću (Slika 5-52C).

Još je jedino u sloju VI gustoća u tolikoj mjeri veća od prosječne, dok je u preostalim slojevima kod svih analiziranih vrsta gustoća veća za najviše 20% (Slika 5-52D).

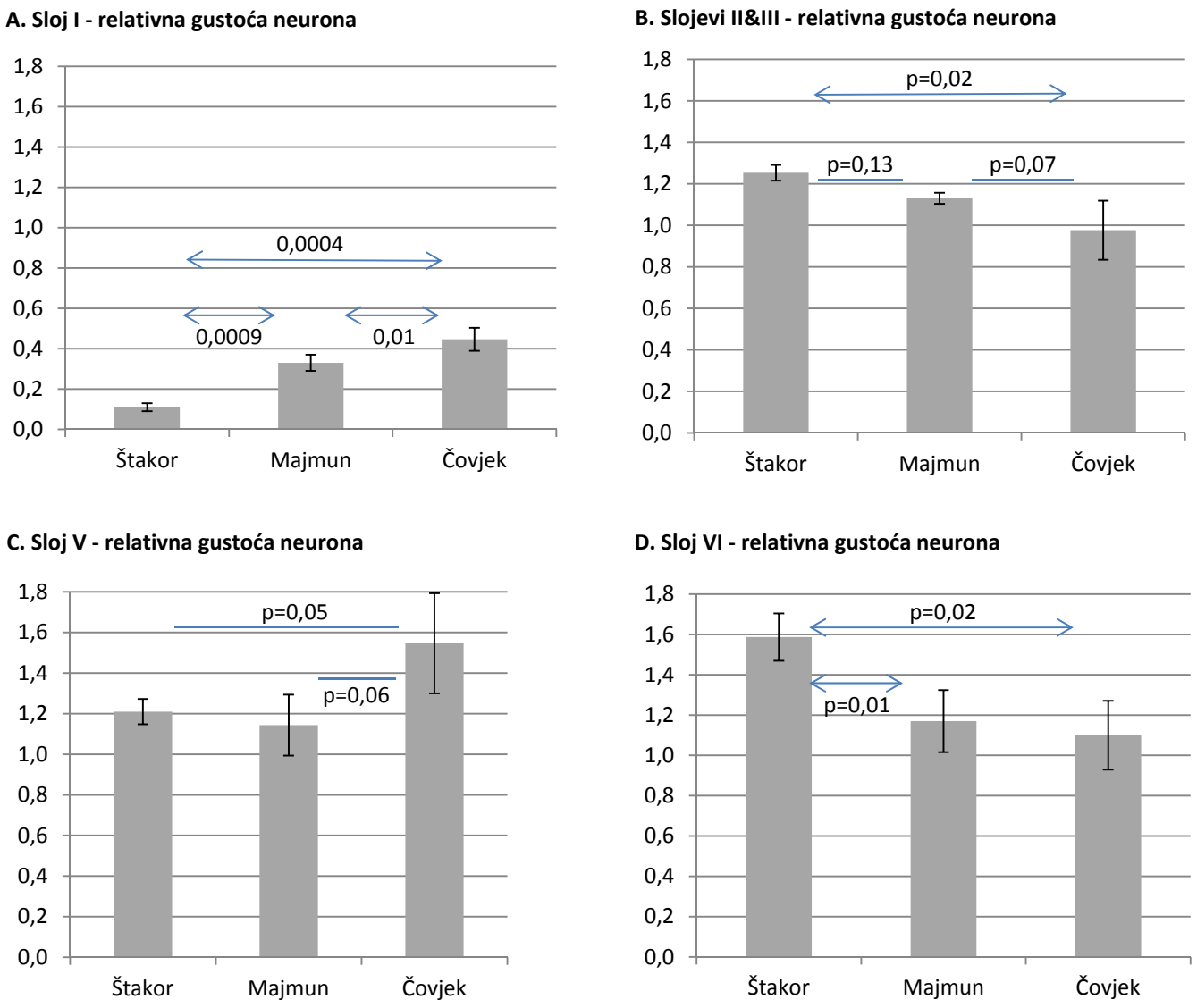
Sažimajući, podaci o gustoći ukazuju na značajnu reorganizaciju unutar svih kortikalnih slojeva, a koje su specifične za sloj i vrstu.

Tako ovi podaci ukazuju da se složenost neuralne morfologije i broja veza kod čovjeka posebno povećava u slojevima II/III. P

Povećanje gustoće u sloju V, a gdje se broj neurona u odnosu na majmuna najviše povećava, ukazuje kako je za funkcionalnu specijalizaciju ovog sloja kod čovjeka potreban primarno veći broj neurona, a ne složenija morfologija i povećanje međusobnih veza.

Također je vidljivo da se dramatično usložnjava neuralna struktura sloja I. S obzirom na izrazito malu gustoću neurona, koja najvjerojatnije odgovara gustoći neurona bijele tvari, kod štakora je očito da ovaj sloj ima primarnu funkciju u inter-arealnoj interakciji jer ga ispunjavaju aksoni koji dolaze od neurona drugih slojeva. Za razliku od toga, kod primata, a posebno izraženo kod čovjeka, sloj I više nije „hiponeuralni“ već po gustoći i udjelu neurona predstavlja doista pravi kortikalni sloj.

Smanjivanje gustoće uz izrazito povećanje broja neurona u sloju VI do kojega dolazi između majmuna i čovjeka ukazuje da je za funkcionalnu specijalizaciju ovog sloja kod primata potreban veći broj neurona, ali i njihova složenija morfologija.



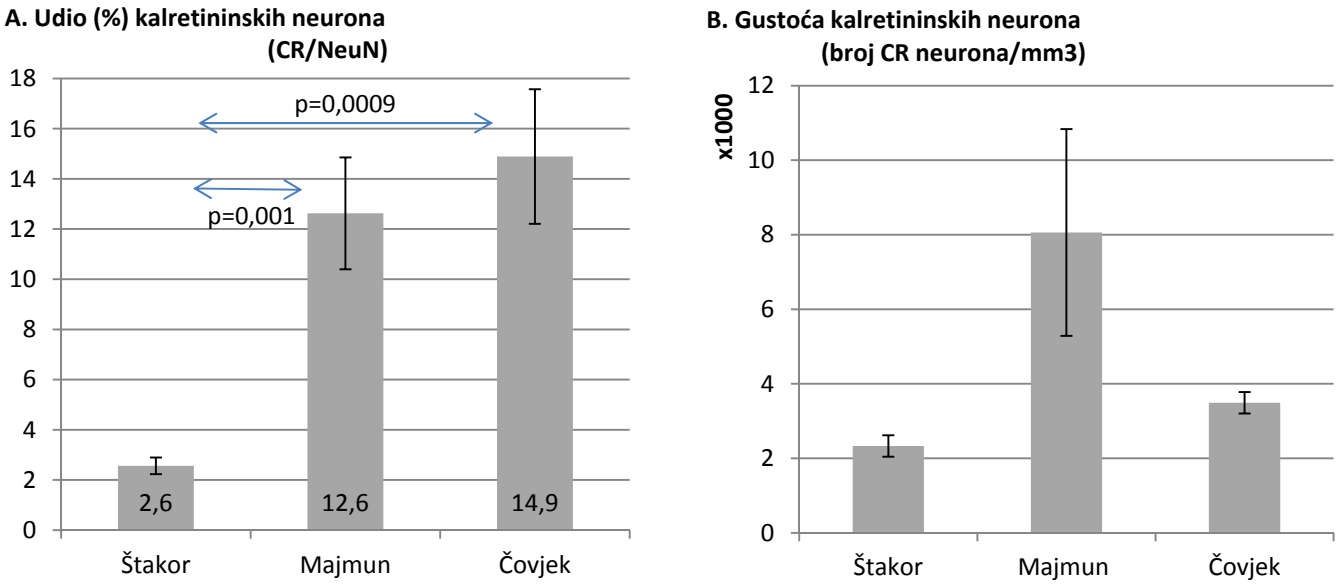
Slika 5-52: Relativna gustoća (gustoća u sloju/gustoća u cijelom polju) neurona (A) u sloju I, (B) u slojevima II/III, (C) u sloju V, (D) u sloju VI.

5.2.2.2 Promjene udjela, broja i distribucije kalretininskih neurona između analiziranih vrsta

Kalretininski neuroni predstavljaju 12,6% od ukupnog broja neurona u polju 14c kod majmuna, što je gotovo šesterostruko povećanje u odnosu na MO polje štakora gdje oni predstavljaju 2,6%. Kod čovjeka se udio kalretininskih neurona povećava za još 20% u odnosu na majmuna, pa oni tako u polju 14c čine gotovo 15% od ukupnog broja neurona (Slika 5-53A).

Gustoća kalretininskih neurona je najveća u majmuna, s obzirom da se udio kalretininskih neurona povećava daleko više od smanjenja gustoće. U majmuna, gustoća kalretininskih neurona je gotovo četiri puta veća nego u štakora te više od dva puta veća u odnosu na čovjeka (Slika 5-53B).

Ovo smanjenje gustoće kalretininskih neurona kod čovjeka je posljedica dramatičnog smanjenja gustoće neurona uz samo blago povećanje udjela kalretininskih neurona.



Slika 5-53: (A) Postotak kalretininskih neurona (CR) u odnosu na cjelokupnu populaciju neurona (NeuN); (B) Gustoća kalretininskih neurona (broj neurona/mm^3) u MO polju štakora, te polju 14c majmuna i čovjeka

Najveći udio kalretininski neuroni imaju u svih analiziranih vrsta u sloju I (Slika 5-54A), pa polovicu od ukupnog broja neurona u ovom sloju predstavljaju kod majmuna (50,5%) i čovjeka (52%), dok je kod štakora taj udio trostruko manji (16,5%).

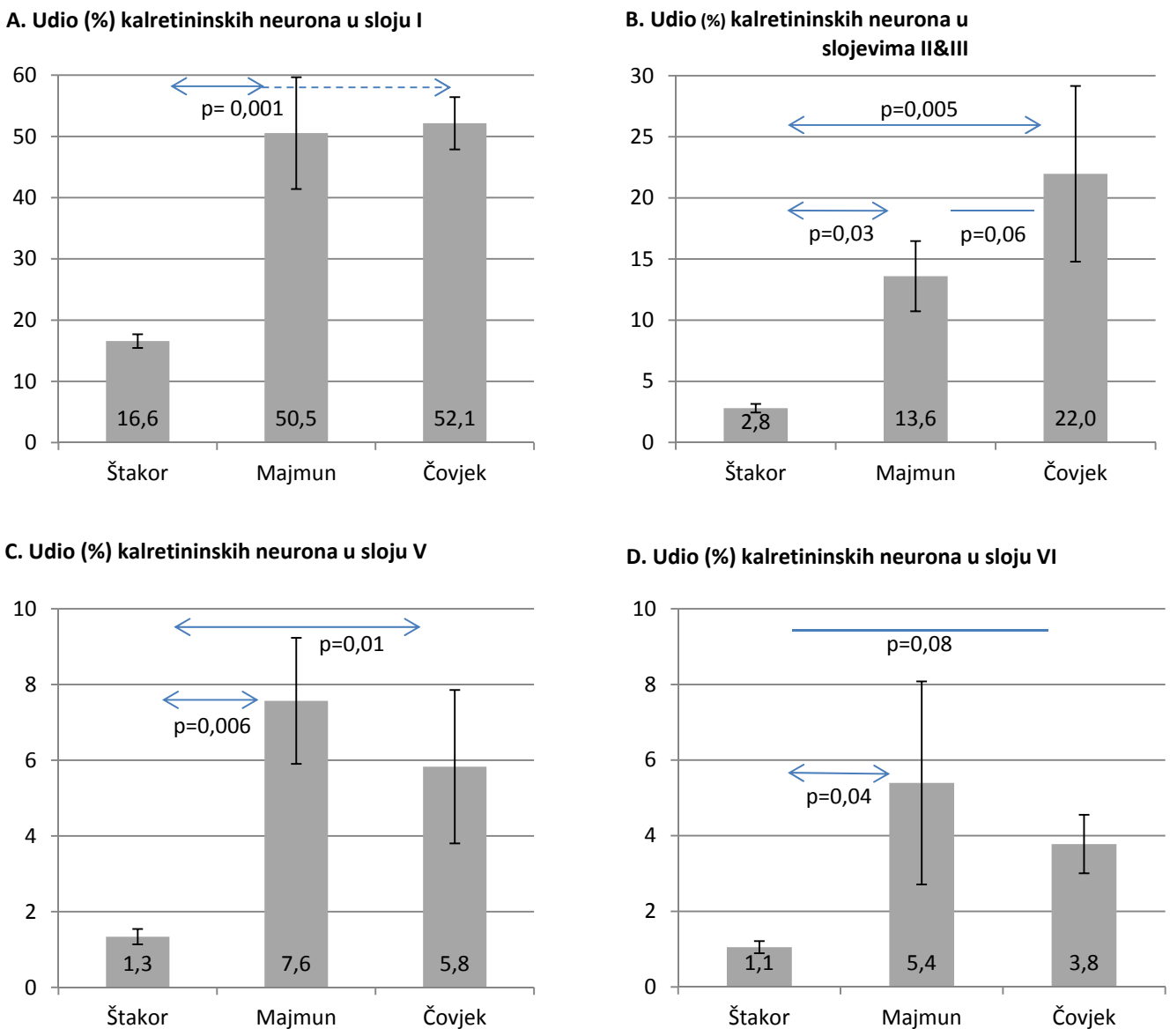
Kod čovjeka u slojevima II/III (Slika 5-54B) više od petine neurona (22%) (Slika 5-54B) su kalretininski što je četiri puta više nego u slojevima V (6%) i VI (5%) (Slika 5-54C,D).

U usporedbi s majmunom (13,5%) povećanje udjela u slojevima II/III je veće od 50%, a u usporedbi sa štakorom to je povećanje za više od osam puta. Statistička analiza jasno pokazuje na linearno povećanje udjela kalretininskih neurona u slojevima II/III kroz sve analizirane vrste, iako razlika između majmuna i čovjeka nije statistički značajna, ali je vrlo blizu ove razine ($p=0,06$).

Kako je u studiji uključen minimalan broj subjekata koji omogućava statističku analizu, nije moguće napraviti analizu isključivanjem subjekata koji odstupaju od medijana. Međutim, pregled vrijednosti po subjektima kod majmuna (10,3%; 14,8%; 15,7%) i čovjeka (14,1%; 23,7%; 28,1%) jasno ukazuje na značajne razlike u proporciji kalretininskih neurona između majmuna i čovjeka u slojevima II/III.

Ovdje treba spomenuti i kako su podaci kod majmuna dobiveni na perfundiranim životinjama, što nije bio slučaj kod čovjeka. U tom smislu je teško procijeniti da li se pad proporcije između majmuna i čovjeka koji je vidljiv u slojevima V (7,6% naspram 5,8%) i VI (5,4% naspram 3,8%) može pripisati metodološkim razlozima ili se radi o stvarnim razlikama. No kako omjer između proporcije u slojevima II/III sa slojevima V i VI kod majmuna iznosi približno dva puta (1,8 i 2,5), a kod čovjeka je dvostruko veći (3,8 i 5,8), ovi podaci prilično jasno govore u prilog promjenama u proporciji kalretininskih neurona unutar slojeva između majmuna i čovjeka.

Zanimljivo je kako su razlike u omjeru ovih proporcija za štakore slične vrijednostima kod majmuna (2,2 i 2,5). Ovdje treba uzeti i mogućnost da postoje značajne interindividualne razlike između pojedinaca u udjelu kalretininskih neurona.



Slika 5-54: Postotak kalretininskih (CR) neurona u odnosu na cjelokupnu populaciju neurona (A) u sloju I, (B) u slojevima II/III, (C) u sloju V, (D) u sloju VI.

Ukupan broj kalretininskih neurona u polju 14c kod čovjeka iznosi prosječno oko 700.000, što je sedam puta (7x) više nego u majmuna (~100.000), koji ima trideset i tri puta (33x) više kalretininskih neurona nego štakor (~3.000). To znači da je ukupno povećanje između štakora i čovjeka 235 puta (Slika 5-55B).

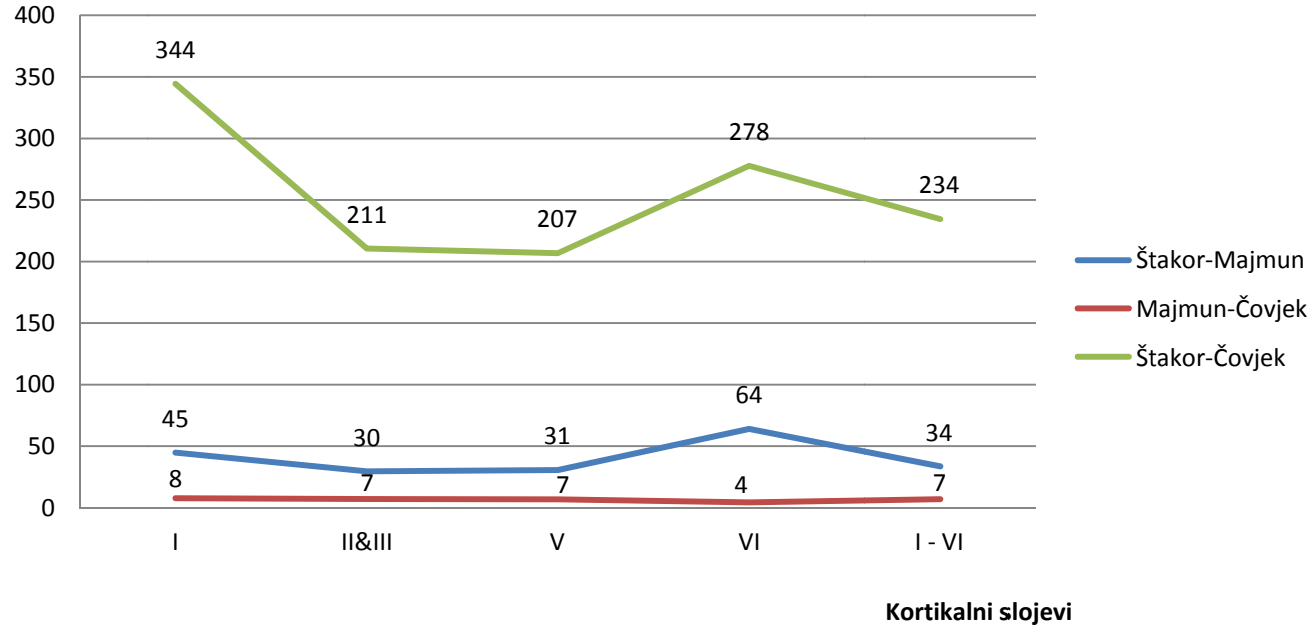
Najveća stopa porasta (Slika 5-55A) ukupnog broja kalretininskih neurona *između štakora i majmuna* prisutan je u sloju VI (64x), a nakon toga u sloju I (45x). Ovdje treba uzeti u obzir značajno iznad prosječno povećanje u ukupnom broju neurona (NeuN) u ovim slojevima.

U slojevima II-V broj kalretininskih neurona povećava se oko trideset puta (30x).

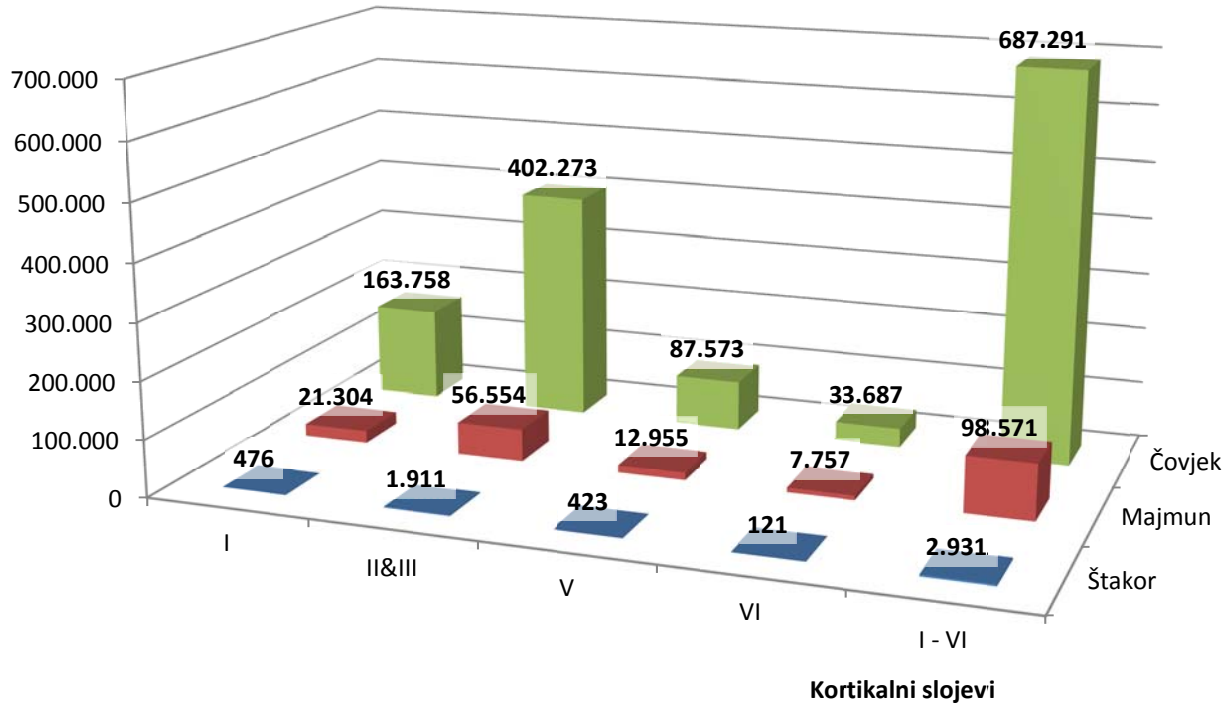
Između *majmuna i čovjeka* ukupan broj kalretininskih neurona poveća se u prosjeku sedam puta (7x), a od tog prosjeka značajnije odstupa jedino povećanje broja u sloju VI gdje se broj kalretininskih neurona poveća za nešto više od četiri puta (4x).

Kada se uspoređuje porast u broju kalretininskih neurona između štakora i čovjeka vidljivo je kako se značajno iznad prosjeka (235x) povećava broj kalretininskih neurona u sloju I (344x), a iznad prosjeka je povećanje i u sloju VI (278x). Povećanje u slojevima II-V je nešto malo ispod prosjeka (207-211x).

A. Stopa promjene ukupnog broja kalretininskih neurona



B. Usporedba ukupnog broja kalretininskih neurona



Slika 5-55: (A) Stopa povećanja ukupnog broja kalretininskih neurona (NeuN) između vrsta; (B) Promjene ukupnog broja kalretininskih neurona po slojevima između vrsta.

Distribucija kalretininskih neurona po slojevima ne pokazuje razlike u glavnom principu distribucije (Slika 5-56).

Više od polovice kalretininskih neurona smješteno je kod svih vrsta u slojevima II/III (Slika 5-56B), nakon toga slijedi sloj I gdje je smješteno oko petine neurona (Slika 5-56A).

Za sloj V (Slika 5-56C) je karakteristično da ima najmanje razlike u odstupanju između vrsta (12,6-14,4%).

Najmanje kalretininskih neurona smješteno je u sloju VI (Slika 5-56D); zanimljivo je da približno iste vrijednosti imaju štakor (4,2%) i čovjek (5%), dok je kod majmuna taj postotak nešto veći (7,8%), s tendencijom statistički značajnih razlika ($p=0,06$).

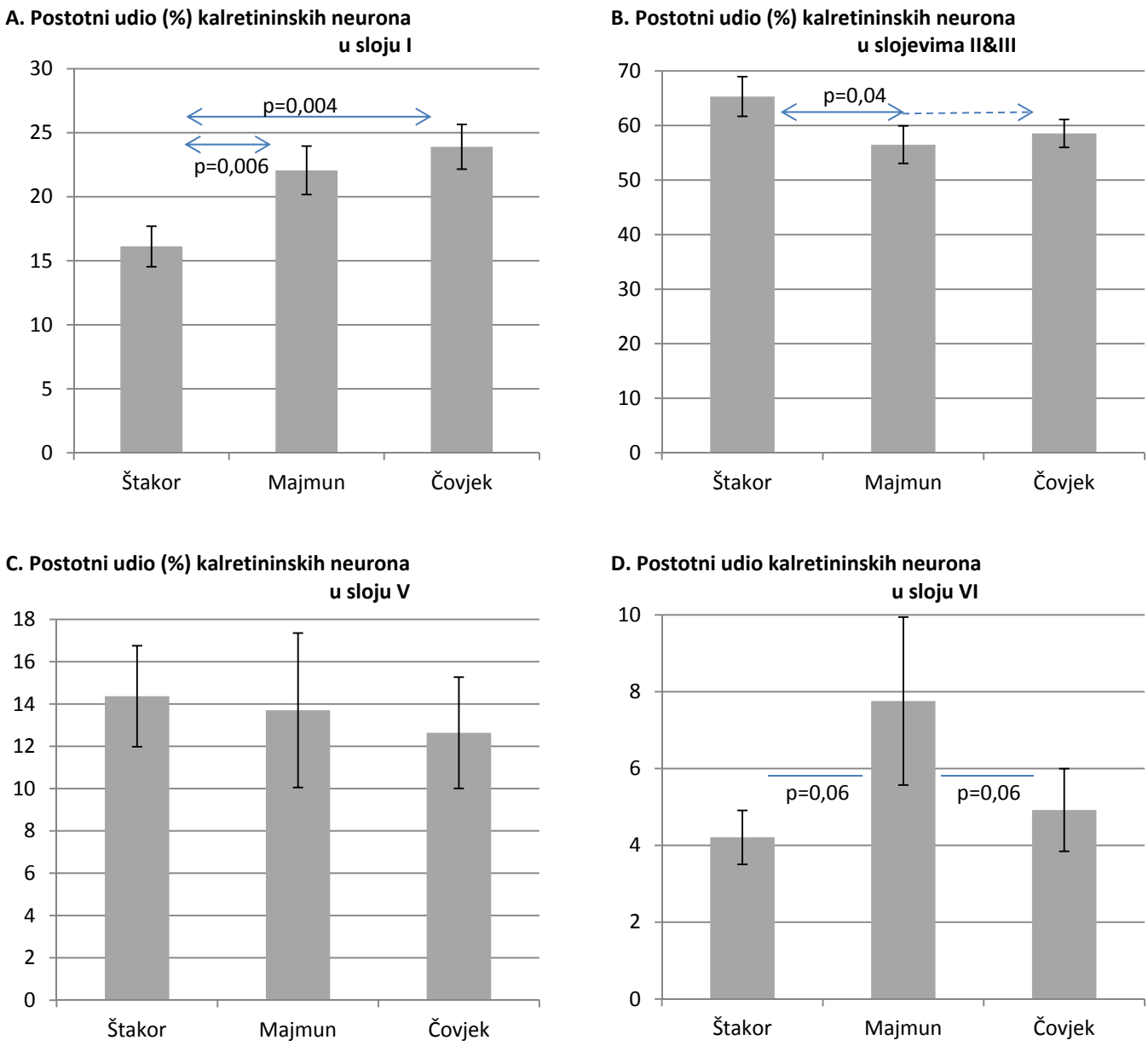
Iako je u slojevima II/III smješten najveći broj kalretininskih neurona kod svih vrsta, ipak postoji statistički značajno smanjenje u proporciji između štakora (65,3%) naspram majmuna i čovjeka (56,5-58,5%).

Također, u sloju I, gdje je kod svih vrsta smještena sljedeća po brojnosti skupina kalretininskih neurona, postoji statistički značajno povećanje između štakora (16,1%) naspram majmuna i čovjeka (22-24%).

Podaci o porastu broja i promjenama udjela kalretininskih neurona jasno pokazuju kako *između štakora i majmuna dolazi do značajno većeg porasta u broju kalretininskih u odnosu na porast u ukupnom broju neurona kroz sve analizirane slojeve*. Ono što je posebno zanimljivo je da *između majmuna i čovjeka* u cjelini dolazi do povećanja udjela kalretininskih od približno 20%, no da promjene pokazuju *različitu tendenciju između slojeva*.

U slojevima II/III se udio poveća za 50% što je različito od slojeva V i VI gdje se udio kalretininskih neurona smanjuje za trećinu. U ova dva sloja daleko je najmanji udio kalretininskih neurona u ukupnoj populaciji, dok u slojevima II/III više od petine, a u sloju I polovica neurona, izražavaju kalretinin.

Ovi podaci ukazuju na značajno drukčiji ustroj lokalnih neuralnih krugova i interkolumnarnu interakciju u površnijim u odnosu na dublje kortikalne slojeve.



Slika 5-56: Usporedba postotnog (%) udjela kalretininskih neurona između analiziranih vrsta (broj kalretininskih neurona u sloju/ukupan broj kalretininskih neurona; **CR/CR**) (A) u sloju I, (B) u slojevima II/III, (C) u sloju V, (D) u sloju VI.

5.2.2.3 Razlike u tendenciji promjena kalretininskih neurona i ukupnog broja neurona između kortikalnih slojeva

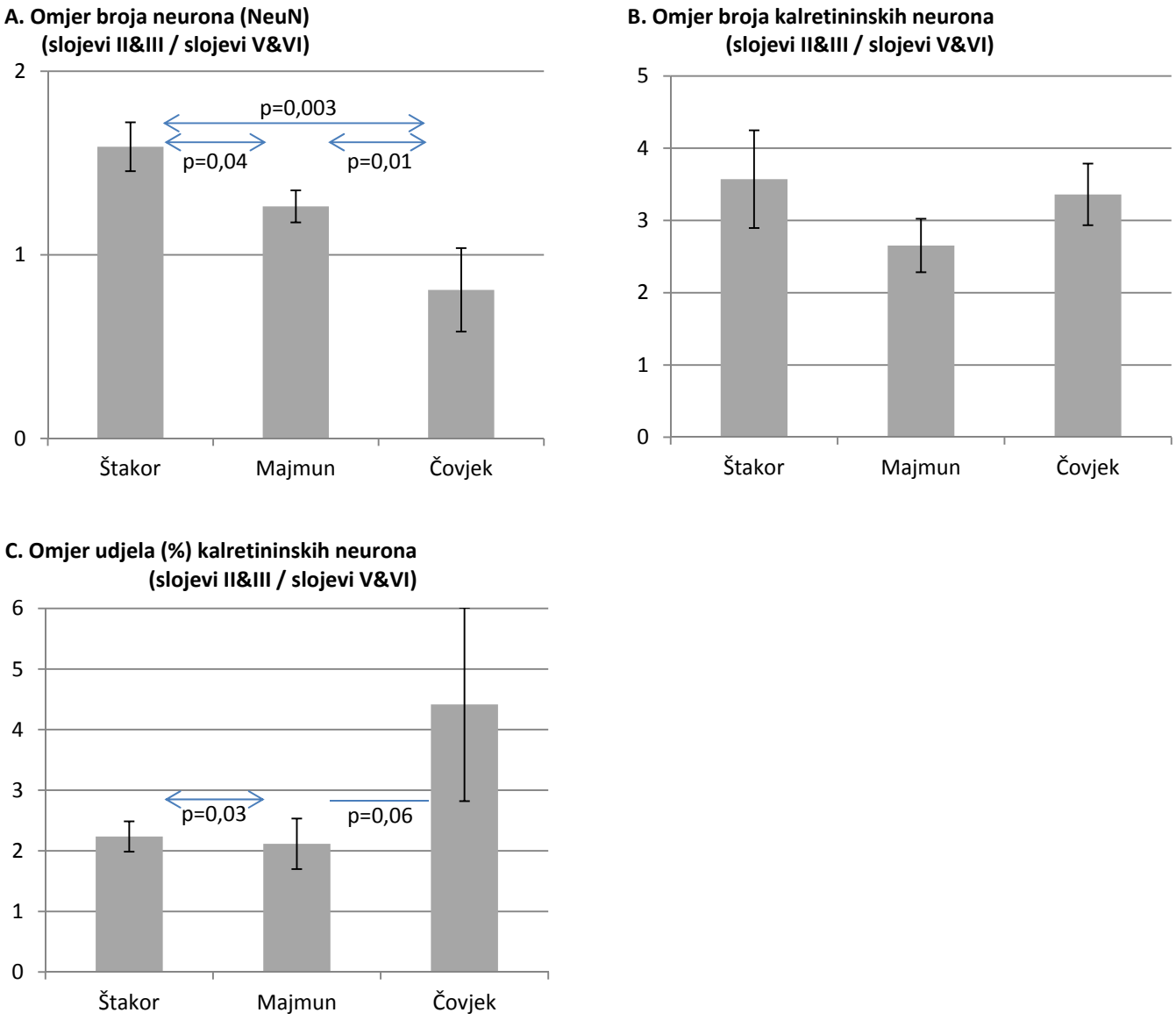
Kako u smislu ulaznih i izlaznih projekcija postoji značajna razlika između površnijih i dubljih slojeva, zanimljivi podaci mogu se dobiti uspoređujući stopu promjena u slojevima II/III koji su izvor kortiko-kortikalnih projekcija, sa slojevima V i VI koji su izvor kortiko-subkortikalnih projekcija (Slika 5-57).

Prvi podatak koji je bio neočekivan je značajno i linearno smanjenje od štakora (60%) prema čovjeku (40%) u postotku neurona MO i polja 14c koji se nalaze u slojevima II/III (Slika 5-57A). To konkretno znači da se omjer broja neurona smještenih u slojevima II/III naspram broja neurona u slojevima V i VI prepolovio od štakora prema čovjeku.

Iako se u slojevima II/III radi o linearnom i kontinuiranom smanjenju udjela između svih vrsta, treba spomenuti da jedino u ovim slojevima nema značajne razlike od prosječnog povećanja do kojeg dolazi između vrsta, što nije slučaj za slojeve V i VI. Tako je u sloju VO povećanje broja neurona dvostruko veće od prosjeka između štakora i majmuna, a između majmuna i čovjeka stopa povećanja neurona u sloju V je dvostruko veća od one u sloju II/III.

Stoga je smanjenje udjela neurona u sloju II/III posljedica neproporcionalnog povećanja broja neurona u slojevima V i VI između navedenih vrsta.

Što se tiče kalretininskih neurona, omjer u broju kalretininskih neurona između slojeva II/III naspram V/VI nije se značajnije promijenio kroz vrste (Slika 5-57C), uz opasku da je kod majmuna 20-25% manji (2,7) nego kod štakora (3,6) i čovjeka (3,4) (Slika 5-57B). Međutim omjer vrijednosti udjela kalretininskih neurona u slojevima II/III naspram V/VI pokazuje dvostruko veće vrijednosti kod čovjeka (4,4) nego kod majmuna i štakora (2,2). Ovi podaci dodatno pokazuju na važnost povećanja proporcije kalretininskih neurona u slojevima II/III.



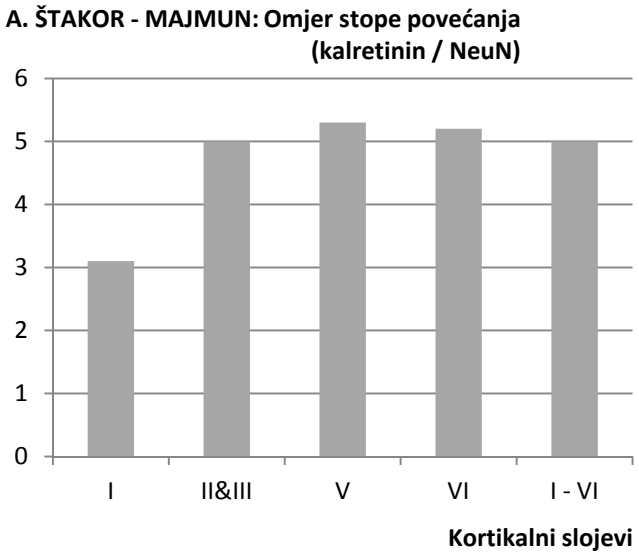
Slika 5-57: (A) Omjer ukupnog broja neurona (NeuN) između slojeva II/III naspram V i VI; (B) Omjer ukupnog broja kalretininskih neurona između slojeva II/III naspram V i VI; (C) Omjer postotnog udjela (%) kalretininskih neurona u slojevima II/III naspram V i VI.

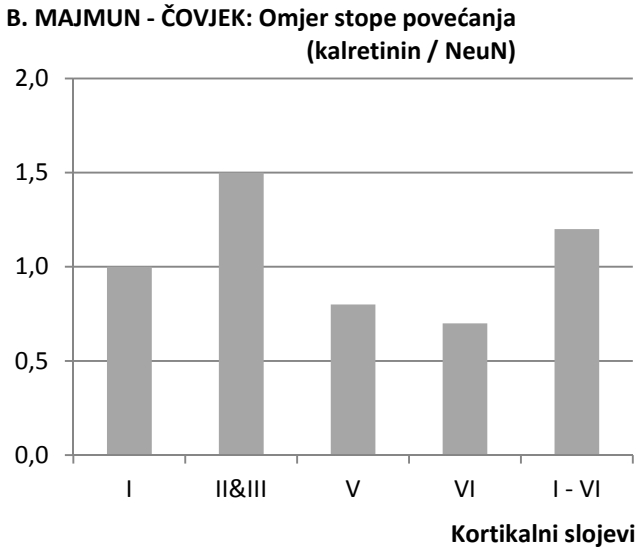
Promatrajući odnos stope povećanja broja kalretininskih neurona i stope povećanja broja svih neurona (Slika 5-58), vidljivo je kako su promjene do kojih dolazi *između štakora i majmuna* relativno stabilne kroz slojeve.

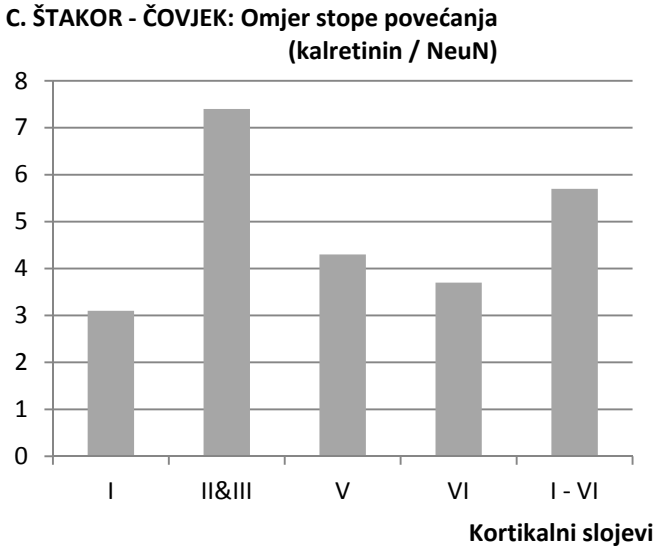
Prosječno povećanje broja kalretininskih neurona je pet puta veće od povećanja broja svih neurona, te je taj odnos prisutan u svim slojevima, izuzev sloja I gdje je taj odnos tri puta (Slika 5-58A). Treba doduše spomenuti da je stopa povećanja ukupnog broja neurona u sloju I i VI više od dva puta veća nego u ostalim slojevima, a u sloju I je i udio kalretininskih neurona u ukupnoj populaciji najveći, u štakora petnaest puta veći nego u sloju VI.

Između majmuna i čovjeka, stopa povećanja broja kalretininskih neurona u odnosu na povećanje broja svih neurona ne pokazuje da se u polju 14c broj kalretininske populacije povećava značajno više od ukupnog broja neurona (Slika 5-58B). Međutim, podaci po slojevima pokazuju kako je u slojevima II/III stopa povećanja broja kalretininskih neurona 50% veća od ukupnog povećanja broja neurona, dok je u slojevima V/VI stopa povećanja broja kalretininskih neurona manja od ukupnog povećanja (Slika 5-58B,C).

Važnost povećanja udjela kalretininskih neurona u slojevima II/III jasno je vidljiva promatrajući stopu povećanja broja kalretininskih neurona prema povećanju ukupnog broja neurona. Ovi podaci ukazuju na značaj eksponencijalnog povećanja u broju kalretininskih neurona u slojevima II/III kroz filogenezu medio-orbitalnog prefrontalnog korteksa.







Slika 5-58: Omjer stope povećanja broja kalretininskih neurona naspram stope povećanja ukupnog broja (NeuN) neurona (A) između štakora i majmuna, (B) između majmuna i čovjeka, te (C) između štakora i čovjeka.

6. RASPRAVA

6.1 Metodološka ograničenja u komparativnim studijama organizacije neuralne mreže kore velikoga mozga

Pitanje o tome da li je organizacija neuralne mreže u čovjeka suštinski drukčija od one u malih eksperimentalnih životinja uglavnom izaziva podijeljena mišljenja unutar neuroznanstvene zajednice te se često više doimlje kao ideološki sukob, nego kao argumentirana rasprava (1).

Zagovornici stava koji smatraju kako je razlika u strukturi neuralne mreže kore velikoga mozga do koje dolazi tijekom evolucije sisavaca samo kvantitativni pomak, među temeljnim istraživačima predstavljaju izrazitu većinu. Kao glavni argument koji je doista teško jednostavno oboriti, postavljaju podatke o tome kako je vrlo rijetko slučaj da neuralne strukture koje nalazimo kod čovjeka nemaju barem u rudimentarnom obliku neki korelat u miša i štakora.

Međutim, ovako pojednostavljeno razmišljanje ne uzima u obzir kako je zapravo neuralna mreža kore velikoga mozga izrazito složen sustav s interakcijom velikog broja morfološki, molekularno i elektrofiziološki definiranih subpopulacija neurona. Stoga promjene u proporciji određenih populacija neurona mogu suštinski promijeniti strukturu neuralne mreže, a posljedično i njezina funkcionalna svojstva (1).

Drugi čimbenik koji ograničava razumijevanje promjena kortikalne neuralne mreže odnosi se na pronalaženje homolognih polja za usporedbu (134, 135). Najznačajnije promjene organizacije neuralne mreže događaju se u najvišim asocijativnim područjima za koja se smatra da i nemaju jasne korelate u štakora (134). Osim toga, studije koje su istraživale proporcije određenih populacija neurona često su metodološki neujednačene te uključuju samo bazičnu kvantitativnu analizu.

Zaključivanja o razlikama između vrsta, ili o regionalnim i laminarnim razlikama unutar iste vrste, najčešće se temelje na podacima dobivenim iz različitih studija s neujednačenim metodološkim pristupom.

Stoga je prioritet u oblikovanju ovog istraživanja bio staviti naglasak na metodologiju kojom će biti moguće dobiti detaljne i konzistentne podatke o laminarnim promjenama u ukupnom broju neurona i broju kalretininskih neurona do kojih dolazi između analiziranih vrsta. To je bio glavni razlog zašto je umjesto jednostavne kvantitativne analize većeg broja polja provedena stereološka analiza unutar jasno definiranog homolognog polja asocijativnog korteksa. Na ovaj način dobiveni su precizni podaci o promjenama specifičnim za pojedine slojeve koje se događaju kroz evoluciju sisavaca, a kasnije i evoluciju primata.

Do sada nema niti jedne studije koja je na ovako detaljan i konzistentan način analizirala promjene po slojevima između različitih vrsta u ukupnom broju neurona, kao i u broju određenih subpopulacija neurona. Razlog se nalazi u metodološkoj zahtjevnosti stereološke analize; od sustavnog rezanja blokova koji sadrže cijelo polje od interesa, do velikog broja imunohistokemijskih eksperimenata, delineacije polja te same mikroskopske analize i na kraju analize podataka. Stoga je vrlo teško ovakvu analizu učiniti u više polja pa se najčešće koriste ne-stereološki načini kvantitativne analize.

Analiza u ovom istraživanju je jednim dijelom uključila i prekomjerni probir te je pokazala da bi u slučaju minimalnog stereološkog probira odstupanja od ovih podataka iznosila najviše 10%. Ona je dakle pokazala da bi se korištenjem „ekonomiziranog“ pristupa dobili konzistentni i vjerodostojni podaci koji ne bi značajno odstupali do stvarnih vrijednosti.

Međutim, ova studija je pokazala i to da „jednostavne“ kvantitativne analize na kojoj se temelje rezultati o proporciji neurona u određenom sloju mogu dovesti do nevjerodostojnih podataka. U studijama u kojima se analizira promjena unutar stupića koji zahvaća istu površinu (u dubinskoj dimenziji) kroz sve slojeve (7, 83) ili promatra ograničeno područje određenog sloja iste površine u susjednim rezovima, ne uzima se u obzir da postoji razlika u dubinskoj površini određenog sloja. Površina plohe koja graniči sa susjednim slojevima može se značajno razlikovati između površnih i dubokih slojeva. Naime, u štakora koji ima lizencefalički mozak dubinska površina sloja smanjuje se od gornjih (površinskih-bližih piji) slojeva do donjih (dubinskih-bližih bijeloj tvari) slojeva. Slično je kod girificiranih vrsta kada se radi o regijama smještenih u vrhu vijuge, dok je za one u dubini brazde obrnuto.

Stoga kvantitativna analiza koja ne uključuje dvodimenzionalno razgraničenje cjelokupnog polja može rezultirati izrazito nevjerodostojnim i nekonzistentnim rezultatima.

6.2 Zajednička obilježja i razlike neuralne strukture medio-orbitalnog polja u štakora i polja 14c u majmuna i čovjeka

Kvalitativna citoarhitektonska analiza je pokazala da, bez obzira na povećanje debljine korteksa, analizirana polja u sve tri vrste pokazuju jasna zajednička svojstva i zadovoljavaju stroge kriterije da se definiraju kao homologna polja. Uz to, analiza aferentnih projekcija medio-orbitalnog polja u štakora pokazuje jasnu homologiju s projekcijama opisanima za medijalna orbitalna polja u primata. Posebno je važno za homologiju s poljem 14c da postoje jasne projekcije koje dolaze iz CA1 polja hipokampusa koje su specifične samo za ovo polje medijalnog i orbitalnog prefrontalnog korteksa primata (158).

Kvalitativno je najupečatljivija promjena u debljini korteksa koja se posebno povećava između majmuna i čovjeka, gdje dolazi i do značajnog smanjivanja gustoće neurona (80, 83). Kvantitativni podaci pokazuju velik porast u broju neurona kroz sve slojeve te povećanje volumena svih slojeva. Povećanje volumena je veće od stope povećanja ukupnog broja neurona do kojega dolazi između majmuna i čovjeka.

To govori u prilog značajnom povećanju morfologije dendritičkog stabla, broja sinapsi i gustoće aksona kroz evoluciju sisavaca, što se posebno intenzivira tijekom evolucije kore velikoga mozga čovjeka. Kvantitativni podaci pokazuju da promjene u broju i gustoći neurona nisu ravnomjerno zastupljene kroz sve slojeve. One također pokazuju različit obrazac promjena u evoluciji od štakora do majmuna te različit obrazac kroz evoluciju primata prema čovjeku.

Promjene specifične za određene slojeve, a koje su u analiziranim poljima vidljive kod čovjeka i majmuna u odnosu na štakora, odnose se na neproporcionalno povećanje broja neurona u slojevima I i VI. Broj neurona u sloju I poveća se u majmuna 15 puta u odnosu na štakora, što je dvostruko više u odnosu na većinu ostalih slojeva. Broj neurona se u sloju I povećava dvostruko više od povećanja volumena pa je tako ovaj sloj jedini koji u majmuna ima veću gustoću neurona nego u štakora.

Zanimljivo je kako gustoća neurona u sloju I kod majmuna dosegne gustoću neurona u slojevima II/III kod čovjeka. Ovo povećanje gustoće između štakora i majmuna samo po sebi dovodi do povećanja udjela neurona u volumenu sloja. Kako se istovremeno može očekivati da su ti neuroni i složenijeg dendritičkog stabla te da kod majmuna u volumenu više participira i razgranjenje apikalnog dendrita piramidnih neurona, može se zaključiti kako dolazi do značajnog smanjenja udjela horizontalnih vlakana u strukturi sloja I.

U sloju I je kod štakora smješteno samo 2% kortikalnih neurona te je to primarno fibrilarni sloj izrazito značajan za inter-arealnu komunikaciju. To se najbolje vidi na primjeru volumena koji je kod štakora samo dva puta manji od volumena subkortikalne bijele tvari koja također sadrži određen broj neurona. Nasuprot tome, kod čovjeka je u polju 14c gotovo 7% kortikalnih neurona smješteno u sloju I, s neuralnom gustoćom samo upola manjom od prosječne gustoće korteksa. Također, volumni udio sloja I se smanjuje za trećinu kod majmuna i čovjeka u odnosu na štakora.

Stoga je vidljivo kako sloj I u štakora predstavlja fibrilarni – izrazito „hiponeuralni“ sloj, koji po strukturi ima više sličnosti s bijelom tvari nego s kortikalnim slojevima. Za razliku od toga, u čovjeka ovaj sloj predstavlja pravi neuralni sloj s malom gustoćom neurona. To pokazuje da dolazi do suštinskih promjena u funkcionalnim svojstvima sloja I između glodavaca i primata.

Obzirom na razvojne karakteristike sloja I, većina neurona koja se ovdje nalazi kod štakora predstavlja neurone rođene u ranom fetalnom razdoblju koji svoju ulogu imaju primarno u regulaciji migracije neurona i urastanju aferentnih vlakana (23, 159-162). Za razliku do toga, u ukupnoj populaciji neurona sloja I ova subpopulacija predstavlja samo manji dio te ovdje dominiraju neuroni koji se ravnomjerno stvaraju tijekom cijele prve polovice trudnoće kao i neuroni ostalih kortikalnih slojeva i dio su odrasle kortikalne mreže (163).

Druga izrazita razlika između štakora i majmuna odnosi se na sloj VI u kojemu se broj neurona povećava po dvostruko većoj stopi nego je slučaj u ostalim slojevima. Povećanje volumena je još i veće te se odvija po trostruko većoj stopi od prosječne. Kao rezultat ovih promjena kod majmuna i čovjeka gotovo petina neurona smještena je u sloju VI.

Zanimljivo je također da sloj VI u usporedbi sa svim ostalim kortikalnim slojevima baš kod štakora ima najveću gustoću neurona te se na temelju toga može zaključiti da se u njemu nalaze neuroni s najjednostavnijim dendritičkim stablom. Nasuprot tome, kod čovjeka je gustoća neurona u sloju VI samo malo veća od gustoće neurona u slojevima II i III, gdje je uvjerljivo najmanja gustoća neurona od svih kortikalnih slojeva u svih analiziranih vrsta (izuzev sloja I).

Dostupni podaci ne govore u prilog objašnjenju da se ovako mala gustoća može pripisati povećanju složenosti dendritičkog stabla. Moguće objašnjenje leži u brojnosti aferentnih i eferentnih kortikalnih aksona koji su u sloju VI kod primata već izrazito mijelinizirani i zauzimaju veći volumen nego u glodavaca. Također, moguće je da kratka kortiko-kortikalna vlakna (U-vlakna) dijelom prolaze kroz sloj VI.

Drugo se pitanje postavlja o povećanju populacije neurona sloja VI. Jedno od mogućih objašnjenja je uključivanje neurona sloja pod pločom u funkcionalne krugove sloja VI. Kako je sloj pod pločom daleko razvijeniji u čovjeka nego u štakora (162), ovakvo povećanje broja neurona govori u prilog predloženom objašnjenju. S druge strane, u primata je najupečatljivija razlika polja 14 u odnosu na susjedne slojeve daleko veća debljina sloja VI.

Većina rezultata kod majmuna i čovjeka pokazuje da neuroni sloja pod pločom ostaju difuzno raspršeni kao neuroni bijele tvari, odnosno da se u nekim područjima blago kondenziraju te se ova zona definira kao sloj VIb (23, 159-162). Iako se ne može isključiti da se u polju 14 sloj pod pločom kondenzira u takvoj mjeri da se potpuno stopi sa slojem VI, ipak se takva mogućnost čini malo vjerojatnom.

Sloj VI sadrži primarno neurone s projekcijama prema talamusu te je moguće da ovo povećanje broja odražava postojanje obilnijih veza između asocijativnih područja korteksa i talamusa kod primata.

Najvažnije promjene u strukturi polja 14c između majmuna i čovjeka uključuju iznadprosječno povećanje neurona u sloju V pa kod čovjeka ovaj sloj sadrži gotovo trećinu neurona u ovom polju. Za razliku od majmuna, gdje je gustoća neurona kroz slojeve II-VI približno ista, kod čovjeka je gustoća neurona u sloju V za 50% veća nego u ostalim slojevima.

Ovi rezultati pokazuju da je više od povećanja složenosti dendritičkog stabla, za sloj V kod čovjeka važnije povećanje u broju neurona. To ukazuje da čovjek ima obilnije i složenije subkortikalne projekcije iz asocijativnih područja orbito-medijalnog korteksa nego što je to slučaj kod majmuna.

Kako povećanje u broju neurona od štakora do čovjeka nije veće od prosjeka jedino u slojevima II/III, udio neurona u ovim slojevima linearno se smanjuje. To dovodi do iznenađujućeg rezultata, gdje je 60% neurona medio-orbitalnog polja u štakora smješteno u slojevima II/III, dok je kod čovjeka ovaj postotak samo 40%. To odstupa od podataka iz literature koji opisuju laminarnu distribuciju neurona unutar kortikalne kolumne (80, 83).
Moguće objašnjenje za ovakvo odstupanje od literaturnih podataka navedeno je u prvom dijelu diskusije, a to je činjenica da se analizom kroz sve slojeve po istoj jedinici pijalne površine ne uzima u obzir smanjenje dodirne površine prema susjednim slojevima do koje dolazi prema dubljim slojevima.

Stoga je vjerojatno da se kod štakora prema dubljim slojevima u brojanje uključuje veća proporcija neurona određenog sloja nego što je slučaj s površnijim slojevima, što je izbjegnuto u ovoj studiji. S obzirom da MO polje obavija medio-orbitalni rub te je izrazito velika zakrivljenost konveksne (pijalne) strane, upravo u njemu dolazi do izrazito velikog smanjenja između pijalne površine i dodirnih površina sloja VI sa susjednim slojevima. Ovdje doduše treba spomenuti da je i kod majmuna velika zakrivljenost pijalne površine sloja 14c, a i kod čovjeka polje ne ulazi duboko u brazdu. Stoga je i kod majmuna i kod čovjeka pijalna površina veća od granične površine dubljih slojeva, ali je to najmanje izraženo kod čovjeka, a značajno manje u majmuna nego u štakora.

Može se zaključiti kako ova studija pokazuje da se na temelju podataka o debljini slojeva i gustoći neurona mogu dobiti pogrešni podaci o laminarnom udjelu neurona, jer postoje razlike u površini dodirnih ploha između dubljih i površnih slojeva (ovisno o tome da li polje zauzima vrh vijuge ili dubinu brazde). Ipak, iznenađuje činjenica da se postotni udio neurona u slojevima II/III smanjuje gotovo za trećinu te je povećanje u broju neurona između štakora i čovjeka jedino u ovim slojevima značajno ispod prosječnog povećanja.

Ovaj podatak je i u potpunosti suprotan stavu da kod primata, a posebno u višim asocijativnim područjima čovjeka, slojevi II/III sadrže i dvostruko više neurona nego slojevi V i VI, dok je kod glodavaca obrnuta situacija. Ovi rezultati pokazuju da je u MO/14c polju situacija zapravo obrnuta. To otvara nova pitanja o tome da li je ovakva situacija karakteristična i za preostala polja medijalnog orbitalnog asocijativnog korteksa primata te da li je ona drukčija od odnosa koji nalazimo u dorzalnim i lateralnim poljima frontalnog režnja.

6.3 Promjene u udjelu kalretininskih neurona

Porast broja kalretininskih neurona peterostruko je veći od porasta u ukupnom broju neurona, što je u skladu s podacima u literaturi koji govore o višestrukom povećanju udjela kalretininskih neurona do kojega dolazi kroz evoluciju sisavaca (Tablica 1-1).

Promatrajući ovaj porast između štakora i majmuna, vidljivo je kako je on ravnomjerno zastupljen kroz sve slojeve. To na neki način ukazuje na moguću ulogu kalretininskih neurona u integraciji „dodatnih" neurona u sinaptičku mrežu određenog sloja.

Kako bi povećanje broja neurona dovelo i do odgovarajuće funkcionalne učinkovitosti, potrebna je i složenija integracija unutar neuralne mreže. Pretpostavka je da upravo u tom smislu dolazi do povećanja udjela kalretininskih neurona. Ovdje međutim treba spomenuti kako razlike u udjelu kalretininskih neurona unutar različitih slojeva postaju jako izražene. Stoga je pitanje da li povećanje udjela kalretininskih neurona ima i drukčiji značaj. Naime, kod majmuna i čovjeka udio kalretininskih neurona u slojevima V i VI je približno dvostruko veći nego što je slučaj u slojevima II/III kod štakora. S druge strane, udio kalretininskih neurona u slojevima II/III kod čovjeka je dvadeset puta veći nego što je u sloju VI kod štakora. To konkretno znači da u nekim slojevima jedan kalretininski neuron dolazi na 70 projekcijskih neurona, dok je u nekim slojevima taj odnos 1:3.

Promjene do kojih dolazi između štakora i majmuna ukazuju na, za sve slojeve, zajednički mehanizam koji omogućava da se pomoću većeg broja kalretininskih neurona omogući funkcionalna učinkovitost koja korelira s povećanjem ukupnog broja neurona. Promjene do kojih dolazi između majmuna i čovjeka pokazuju da nije u svim slojevima ova korelacija takva.

Tako recimo povećanje ukupnog broja neurona do kojeg dolazi između majmuna i čovjeka u slojevima V i VI ne samo da ne prati paralelno povećanje broja kalretininskih neurona, već je ono manje. U ovim slojevima dominiraju neuroni sa subkortikalnim projekcijama te u njima nema značajnije intra-arealne integracije. Stoga je vjerojatno za funkcionalnu specijalizaciju ovih slojeva kod čovjeka značajnije povećanje broja projekcijskih neurona.

Za razliku od ovih slojeva, gdje je odnos kalretininskih naspram projekcijskih neurona najmanje 1:15, u slojevima II/III ovaj je omjer daleko manji. Ukoliko kalretininski neuroni sloja I pripadaju sinaptičkoj mreži koja modulira aktivnost projekcijskih neurona slojeva II/III, omjer kalretininskih neurona naspram projekcijskih je manji od 1:3. Za razliku od slojeva V/VI, slojevi II/III imaju izrazito bogatu intra-arealnu komunikaciju, kao i integraciju projekcija s više drugih kortikalnih polja (131).

Stoga bi uloga ovako velikog broja kalretininskih neurona mogla biti u stvaranju velikog broja neuralnih sklopova („cell assembly“). Slojevi II/III su jedini gdje dolazi do ispodprosječnog povećanja ukupnog broja neurona, ali ujedno i do najizraženijeg povećanja udjela kalretininskih neurona.

To konkretno znači da unutar polja 14c u čovjeka više od 80% kalretininskih neurona sudjeluje u sinaptičkoj mreži s 35% projekcijskih neurona (slojevi II/III), dok s druge strane manje od 20% kalretininskih neurona sudjeluje u sinaptičkoj mreži s 65% projekcijskih neurona.

Sloj I ima i daleko najveću stopu povećanja kalretininskih neurona (kao i ukupnog broja neurona) te u majmuna i čovjeka kalretininski neuroni čine 50% od svih neurona. Povećanje udjela kalretininskih neurona može biti povezano i sa stvaranjem dodatne sinaptičke mreže koja omogućava inter-kolumnarnu integraciju kontaktirajući distalne dijelove apikalnog dendrita piramidnih neurona koji dolaze iz površnih, ali i dubljih slojeva.

Moguće je također da u tu mrežu spada i dio kalretininskih neurona slojeva II/III te da oni, bez obzira na smještaj u ovim slojevima, nisu dio sinaptičke mreže koja kontaktira samo kortiko-kortikalne piramide. U svakom slučaju, promjene udjela i distribucije kalretininskih neurona, pogotovo u slojevima I-III govore u prilog suštinskih promjena sinaptičke mreže ovih slojeva. Ove promjene vidljive su dijelom kod majmuna, ali su jednim dijelom prisutne samo u čovjeka.

U prilog suštinskim promjenama sinaptičke mreže kortiko-kortikalnih slojeva govore i morfološki oblici kalretininskih neurona koji su u ovoj studiji identificirani samo kod čovjeka.

6.4 Primjenjivost podataka o povećanju proporcije kalretininskih neurona na ostala kortikalna područja

U interpretaciji ovih rezultata polazilo se od pretpostavke da kalretininski neuroni pripadaju isključivo populaciji GABA-ergičkih neurona, iako ova tvrdnja nije izravno potkrijepljena.

Metodološki razlozi limitirali su imuno-histokemijski prikaz kolokalizacije kalretinina s ekspresijom samog neurotransmitera (GABA) ili jednog od sintetizirajućih enzima (glutamat-dekarboksilaza/GAD: GAD65 i GAD67). Osim toga, stupanj ekspresije ovih biljega nije u jednakoj mjeri prisutan u tijelu svih GABA-ergičkih neurona (164), pa stoga izostanak kolokalizacije s kalretininom ne znači nužno i da se radi o neuronu koji ne sintetizira GABA. Jasan dokaz da se radi o GABA-ergičkim neuronima moguće je dobiti jedino primjenom in-situ hibridizacije.

Međutim, morfološka obilježja dendritičkog stabla kalretininskih neurona i izostanak dendritičkih trnova jasno ukazuju da većina, ako ne i svi kalretininski neuroni, pripadaju skupini GABA-ergičkih neurona. To je i u skladu s podacima iz literature (Tablica 1-1).

Uz to, postoji prepoznatljiv obrazac bojenja kore velikoga mozga na kalretinin kroz različite vrste sisavaca, od evolucijski najstarijih jednootvornih sisavaca (Monotremata), preko tobolčara, kukcojednih sisavaca (šišmiši), mesojeda (pas, mačka, rakun), morskih sisavaca te primata (165). Najvećim dijelom se radi o intenzivno obojanim bipolarnim stanicama, malenog tijela, koncentrirane više u slojevima II i III.

Iznimke od tog obrasca su jedna vrsta šišmiša (Pteropus vampyrus) kod kojeg gotovo pa nema nikakvog obojenja kore na kalretinin, te u morskih sisavaca, gdje je struktura kore drugačija. Tako se u delfina nalazi debeli i izrazito celularan sloj I, u kojem su ponovno prisutni bipolarni kalretininski neuroni. U slojevima II i III nalaze se osobito velike, multipolarne i fuziformne kalretininske stanice. Morfologija ovih neurona pokazuje da nije riječ o glutamatergičkim neuronima.

Kod spomenutih vrsta prisutna je i kalretininska reaktivnost u neokortikalnim neuronima piramidnog oblika. To su malene piramidne stanice sloja V, rijetko i sloja III, koje nisu posebno brojne te imaju slab intenzitet bojenja (165). Iznimka su entorinalni te piriformni korteks, gdje su učestale piramidne stanice s kalretininom, te neokorteks odrasle činčile koja u sloju III kroz cijeli neokorteks sadrži blago obojane malene piramidne neurone (165).

Obrazac kalretininskog bojenja u ovoj studiji ne pokazuje sličnosti s iznimkama opisanim u gore navedenim vrstama, te se može sa velikom sigurnošću zaključiti da se radi o specifičnom prikazu jedne populacije GABA-ergičkih neurona.

Drugo pitanje koje se nameće kao rezultat ovog rada je da li su podaci primjenjivi i na ostala kortikalna područja u majmuna i čovjeka. Glavni rezultati ovog istraživanja u skladu su s podacima iz literature koji govore o dramatičnom povećanju udjela kalretininskih neurona kroz evoluciju sisavaca (Tablica 1-1).

Većina podataka govori kako kalretininski neuroni čine oko 4% od ukupnog broja neurona kod glodavaca, dok kod primata taj udio raste na oko 10%. Rezultati ove studije je u ovom rasponu te je udio ovih neurona kod glodavaca nešto manji od onoga navedenog u drugim studijama, dok je udio kod majmuna nešto veći.

Stoga je moguće da ove razlike nisu samo metodološke prirode, već se radi o ipak značajnim razlikama u udjelu neurona između različitih područja moždane kore.

Rezultati također pokazuju kako je udio kalretininskih neurona najveći u supragranularnim slojevima I-III kroz sve vrste. Kod primata je udio kalretininskih neurona u supragranularnim slojevima daleko iznad udjela u infragranularnim slojevima, što je u skladu podacima iz literature (48, 57). Ovi podaci također pokazuju kako u asocijativnim područjima kalretininski neuroni čine i do 50% populacije GABA-ergičkih neurona.

Ukoliko bi ovakva situacija bila primjenjiva i za polje 14c, kod majmuna i čovjeka gotovo trećina neurona bila GABA-ergička. To bi moglo značiti da je broj GABA-ergičkih i glutamatergičkih neurona gotovo izjednačen u slojevima II/III. Stoga ovakav izračun treba uzeti s oprezom, iako mu u prilog govore rezultati studije DelRio i DeFelipe (1996) (46) kako u slojevima II/III asocijativnog sljepoočnog korteksa čovjeka gotovo 40% neurona ima GABA-ergički fenotip. Ova studija također pokazuje i najveći udio kalretininskih neurona (blizu 50%).

U skladu s ovim podacima su i neke druge studije koje su analizirale udio GABA-ergičkih i kalretininskih neurona u asocijativnim područjima kod majmuna i čovjeka (49, 57, 62, 63). Doduše, studije koje su provedene u primarnim područjima korteksa majmuna i čovjeka uglavnom pokazuju da je udio GABA-ergičkih neurona manji, oko 20%, te da je udio kalretininskih neurona također manji.

Ovi podaci ukazuju na mogućnost da postoje značajne razlike između primarnih i asocijativnih područja u udjelu GABA-ergičkih neurona u cjelini, kao i o udjelu različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona. S druge strane, ovako visok postotak GABA-ergičkih neurona u slojevima II/III, kao i specifične veze s hipokampusom, možda ukazuje na postojanje većeg broja projekcijskih GABA-ergičkih neurona.

Kvalitativan pregled susjednih područja koja su obuhvaćena analiziranim blokovima ne ukazuje kako u njima postoji značajno različita distribucija i gustoća kalretininskih neurona. Stoga se može zaključiti da opisani obrazac distribucije i gustoće kalretininskih neurona nije specifičan za ovo polje, već da predstavlja obrazac koji općenito nalazimo u orbitalnim poljima frontalnog asocijativnog korteksa. U kojoj mjeri je ovako visok udio kalretininskih neurona obilježje medijalnih i dorzalnih polja ostaje otvoreno pitanje.

Kao što je već spomenuto, postojeći podaci iz literature ukazuju da asocijativna orbitalna polja imaju višu proporciju kalretininskih neurona od primarnih područja korteksa (Tablica 1-1). No, treba spomenuti da u čovjeka postoji odvojak rostralnog migratornog puta (koji kroz rano postnatalno razdoblje opskrbljuje olfaktorni tračak kalretininskim neuronima) usmjeren prema orbitalnim dijelovima frontalnog asocijativnog korteksa (166). Ovaj migratorni put je više izražen od onoga usmjerenoga prema olfaktornom tračku, te opskrbljuje područja orbitalnog medijalnog korteksa kroz marginalnu zonu (sloj I). To može objasniti visok udio kalretininskih neurona u slojevima I-III polja 14c opisan u ovoj studiji. Funkcionalno značenje ovakve organizacije za sada ostaje nepoznato.

6.5 Funkcija kalretininskih neurona u neokortikalnoj mreži

6.5.1 Morfološka i elektrofiziološka svojstva kalretininskih interneurona

Morfološki, kalretininski neuroni najčešće pokazuju obilježja koja odgovaraju populacijama neurona s dva čuperka („bitufted cells“) koji uspostavljaju sinapse sa srednjim dijelom apikalnog dendrita (17, 117), zatim bipolarnih neurona koji sinapse stvaraju na proksimalnom dijelu apikalnog dendrita piramidnih neurona (116) te neurona s dva buketića („double bouquet cells“) koji uspostavljaju sinapse s bazalnim dendritima piramida (114, 115).

Ovakav način projekcija dovodi do izravne inhibicije proksimalnih dijelova dendritičkog stabla piramidnih neurona. Međutim, eksperimentalni podaci pokazuju kako se kod glodavaca samo oko 10% sinapsi koje dolaze od kalretininskih neurona nalazi na glutamatergičkim stanicama (27), jer se oni primarno projiciraju na somatostatinske i druge kalretininske neurone (119).

Nekoliko morfoloških svojstava ukazuje kako su kalretininski neuroni izrazito ekscitabilna populacija. U štakora, oni primaju oko 7% od svih ekscitatornih aferentnih aksona, iako predstavljaju samo 4% ukupne populacije neurona (167). Trećina sinapsi na tijelu i gotovo sve sinapsi na dendritima su ekscitatorne. Porijeklo aksona ovih sinapsi nije u potpunosti određen, ali je jasno ukazano da značajan dio dolazi izravno od susjednih piramidnih neurona (27).

Uz to, otpor membrane kalretininskih neurona je vrlo visok (42), što izrazito povećava ekscitabilnost.

Populacija kalretininskih interneurona najčešće ima dva oblika elektrofiziološkog odgovora, akomodirajući i ne-adaptirajući (sporo) okidajući (16, 111). Elektrofiziološka svojstva koreliraju s membranskom distribucijom naponom reguliranih ionskih kanala (16, 168). Ovi proteinski kompleksi nazivaju se ‘kalretininski klasteri’ i uključuju proteine Kv3.4, SK2 i Caα1B (112).

6.5.2 Prostorna distribucija sinapsi na piramidnom neuronu

Izravne projekcije iz specifičnih unimodalnih jezgara talamusa pristupaju na donje dijelove bazalnog dendritičkog stabla piramidnih neurona sloja III i zvjezdaste neurone sloja IV, koji zatim pružaju projekcije na proksimalne dijelove bazalnih dendrita (Slika 1-6). Lokalni aksoni piramidnih neurona slojeva II/III pristupaju većinom na proksimalne dijelove apikalnog dendritičkog stabla (uključujući i kose/postranične dendrite) te manjim dijelom na bazalno dendritičko stablo smješteno u sloju III. Povratne projekcije („feedback“) iz susjednih kortikalnih polja projiciraju se na distalni dio apikalnog dendrita, uključujući i terminalno dendritičko razgranjenje („terminal tuft“) (169).

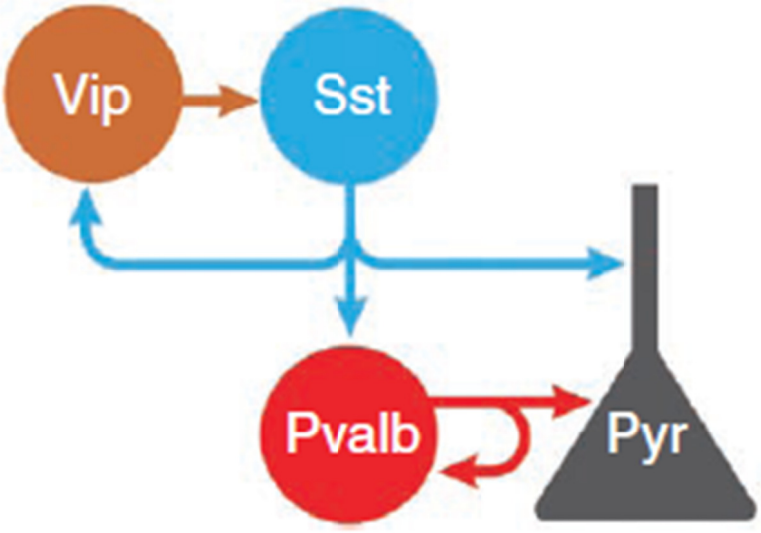
Apikalno dendritičko stablo prima još dva sustava talamičkih ekscitatornih aksona. Prvo su tu aksoni specifičnih-multimodalnih talamičkih jezgara koji se projiciraju na samo glavno stablo apikalnog dendrita i njegovo terminalno razgranjenje (169), na koje pristupaju i aksoni neurona nespecifičnih talamičkih jezgara koji predstavljaju povratni dio kortiko-talamo-kortikalne petlje (170).

Kao što je već spomenuto, različite subpopulacije kalretininskih neurona kontroliraju različite odjeljke apikalnog i bazalnog dendritičkog stabla piramidnih neurona; stanice s dva buketića kontroliraju bazalne dendrite piramida (114, 115), dok se bipolarni (116) i neuroni s dva čuperka (117) projiciraju na apikalni dendrit.

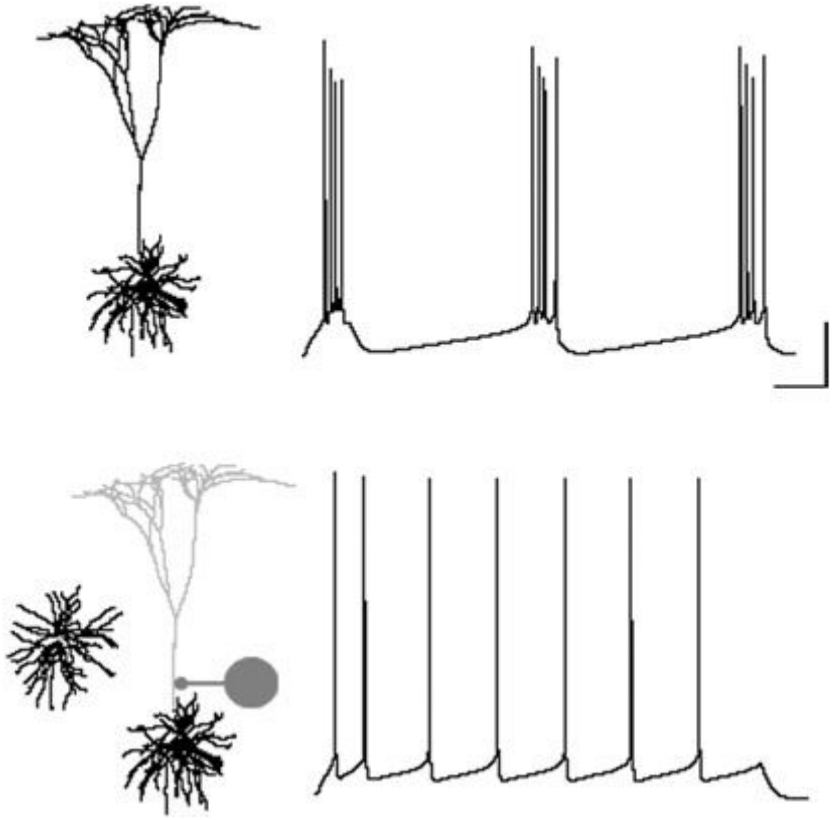
No daleko veći utjecaj kalretininski neuroni imaju na interneurone (27), gdje posebno velik inhibitorni utjecaj imaju na susjedne somatostatinske stanice (119). Somatostatinski neuroni izravno inhibiraju piramide, ali i snažno inhibiraju parvalbuminske interneurone (119).

Somatostatinske neuroni koji izravno pristupaju na piramidni neuron najvećim dijelom su Martinottijeve stanice, s opsežnim projekcijama i na apikalne i bazalne dendrite (120) te stanice s dva čuperka koje pristupaju samo na apikalni dendrit.

Parvalbuminski neuroni su košaraste stanice koje sinaptički završavaju samo u području tijela piramidnih neurona, te najproksimalnijim dijelovima dendrita, ali i jednim dijelom na početnom segmentu aksona (16, 119, 171). One nemaju značajniji utjecaj na druge populacije interneurona (119).



Slika 6-1: Prikaz najvažnijih funkcionalnih odnosa među biokemijskim skupinama interneurona. Preuzeto iz rada Pfeffer i sur. 2013, Nat Neurosci 16:1068-76 (119).



Slika 6-2: Prikazano je kako interneuron funkcionalno eliminira dio dendritičkog stabla iz integriranja ekscitatornih signala, te se mijenja elektrofiziološki odgovor. Preuzeto iz Buzsaki 2011, Rhythms of the Brain, Oxford University Press (173).

6.5.3 Hipoteza o ulozi kalretininskih interneurona u neokortikalnoj mreži

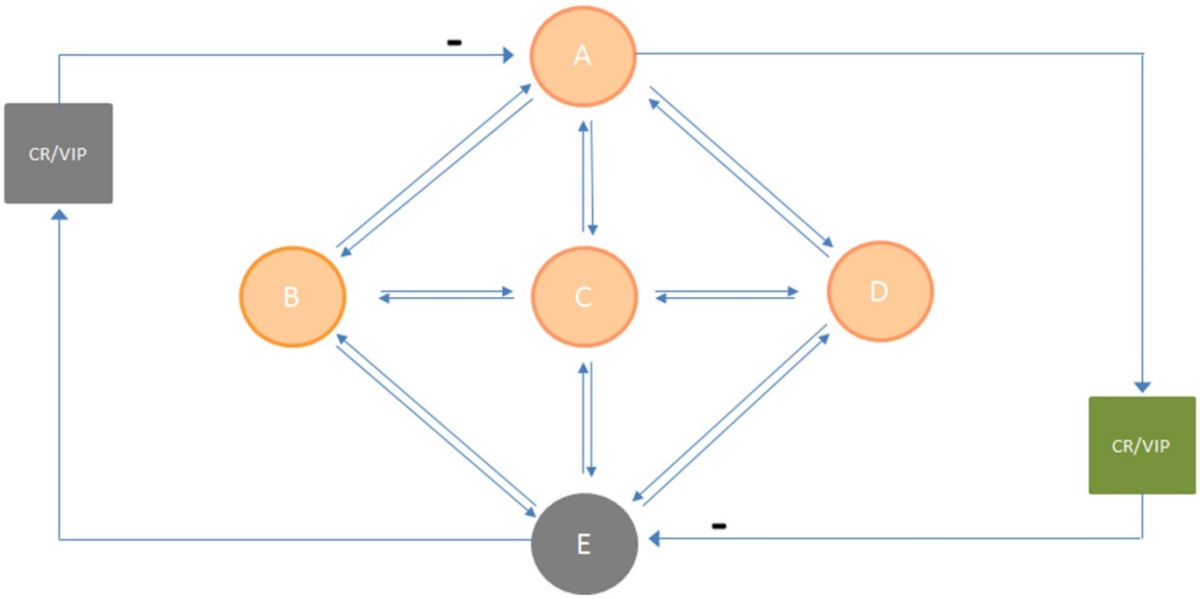
Gore navedeni podaci o funkcionalnoj povezanosti bitni su za razumijevanje mogućeg značaja visokog povećanja kalretininskih neurona. Oni pokazuju kako u glodavaca kalretininski neuroni (koji najvećim dijelom izražavaju i vazo-intestinalni peptid VIP) prvenstveno reguliraju druge interneurone (Slika 6-1), a tek manjim dijelom sinapse stvaraju sa piramidnim neuronima (119). One se nalaze prvenstveno na najproksimalnijem dijelu dendritičkog stabla, najviše 20–50μm od tijela piramide, gdje se isključivo nalaze inhibitorne sinapse (172). Ove inhibitorne sinapse moćno eliminiraju učinak ekscitacijskih postsinaptički potencijala (EPSP) iz pojedinih dendritičkih grana, mijenjajući obrazac elektrofiziološkog odgovora piramidne stanice (173) (Slika 6-2).

Izravne projekcije kalretininskih interneurona na somatostatinsku populaciju imati će dva ključna učinka (119, 174): disinhibiciju distalnih dijelova dendritičkog stabla piramidnih neurona te disinhibiciju parvalbuminskih interneurona.

Disinhibicija dendritičkog stabla dovodi do veće vjerojatnosti integriranja EPSP-a u dendritima te njihovog provođenja do tijela. Na taj način raste vjerojatnost pojave akcijskih potencijala (174).

No hoće li ovi podražaji izazvati akcijski potencijal ovisi o aktivaciji sinapsi na tijelu koje najvećim dijelom dolaze od parvalbuminskih košarastih stanica. Ove stanice su većinom brzo-okidajuće („fast spiking“) (49, 175) i povezane međusobno električnim sinapsama („gap junctions“) (176). Zbog prestanka inhibicije od strane somatostatinskih neurona parvalbuminski neuroni pojačavaju inhibitorni utjecaj na tijelo neurona, što je u rasponu gamma frekvencija (iznad 30Hz). Frekvencijski odgovor parvalbuminskih neurona je dva do tri puta viši od izvornog disinhibitornog učinka kalretininskih neurona, s frekvencijom oko 20Hz (27). Posljedično, gamma oscilatorni odgovor može biti izazvan i frekvencijama izvan gamma spektra jer je taj odgovor svojstvo koje je posljedica disinhibirane aktivnosti mreže parvalbuminskih košarastih neurona (121).

Može se pretpostaviti kako ovaj porast učestalosti inhibicije u gamma području dovodi do visoke selekcije EPSP-a, koja se naziva temporalna koherentnost skupine EPSP-a. Kod gamma frekvencije od 40Hz trajanje jednog intervala je 25ms te on uključuje harmonijsku oscilaciju uzlazne i silazne faze. Kako bi ulazni EPSP doveo do nastanka akcijskog potencijala mora se pojaviti unutar prve polovice intervala.



Slika 6-3: Shema prikazuje obrazac funkcionalne pripadnosti kao posljedicu sinhronog okidanja. Samo oni neuroni koji su imaju gotovo istu fazu oscilacije (A–D) u tom trenutku predstavljaju jedinstveni neuralni sklop („cell assemblies“). Iako neuron E stvara sinapse s neuronima sklopa, on je funkcionalno isključen jer se njegovi akcijski potencijali ne pojavljuju u vremenskom prozoru integracije signala klastera A-D. Hipoteza je kako su upravo kalretininski interneuroni oni koji omogućavaju međusobno odvajanje funkcionalnih neuronskih grupa (simbolički prikazano kao neuroni „A – D“). Moguće je da ovi neuroni mijenjaju frekvencijsku domenu rada piramidnih neurona iz nižih frekvencija (ispod 30Hz) u domenu gama osciliranja (iznad 30Hz). Kalretininski interneuroni značajno skraćuju vremenski prozor za integraciju signala u piramidnoj stanici, te na taj način onemogućuju prijenos podražaja iz drugih neuronalnih skupina koje se razlikuju u svojoj frekvenciji i/ili fazi osciliranja (simbolički je takav neuron na slici prikazan kao „E“).

Uz to, neuroni se najčešće ne ponašaju kao harmonijski nego kao takozvani relaksacijski oscilatori te je uzlazna oscilatorna faza kraća. Zbog toga je za konstruktivnu interferenciju EPSP-a potrebno razdoblje kraće od 12ms.

Drugim riječima, ukoliko je piramidni neuron izložen inhibiciji s frekvencijom u domeni gamma oscilacija, jedini ekscitatorni signali koji se mogu integrirati u području aksonskog brežuljka su oni koji su vremenski vrlo koherentni i pojavili su se gotovo istovremeno (177).

Na ovaj način se međusobno sinaptički povezani neuroni mogu „isključiti“ iz procesuiranja te se stvaraju privremene funkcionalne jedinice (Slika 6-3). Na taj način je moguće da jedan glutamatergički neuron može biti dio velikog broja neuralnih sklopova („neural assemblies“) te neuralna mreža nije statički određena samo prema uspostavljenim sinapsama.

Broj ovakvih privremenih neuronskih „mikro-sklopova“ koji se temelje na selekciji funkcionalno srodnih neurona izravno utječe na memorijske i kognitivne kapacitete jer dovodi do povećanja kapaciteta paralelnog procesuiranja unutar određenog kortikalnog područja.

Ovo bi konkretno značilo kako je za povećanje kapaciteta i učinkovitosti neuralne mreže od samog povećanja ukupnog broja projekcijskih neurona važnije omogućiti stvaranje većeg broja privremenih funkcionalnih „mikro-sklopova“ unutar mreže međusobno sinaptički povezanih glutamatergičkih neurona (178).

Projekcije i funkcionalna svojstva kalretininskih neurona ukazuju na ključnu ulogu upravo ove subpopulacije u povećanju kapaciteta stvaranja privremenih neuronskih sklopova. Promatrajući rezultate ove studije, vidljivo je kako u slojevima II/III kod čovjeka na jedan kalretininski neuron dolaze samo 2-3 piramide.

Pretpostavka je kako način procesuiranja najsloženijih kognitivnih funkcija kroz kortiko-kortikalnu neuralnu mrežu u multimodalnim asocijativnim područjima u podlozi ima stvaranje privremenih neuronskih „mikro-sklopova“. Zbog toga povećanje udjela kalretininskih neurona izravno korelira s njihovim brojem.

Zanimljivo je također da takve promjene nisu toliko važne u subkortikalno projicirajućim slojevima (V i VI), već promjene između majmuna i čovjeka uključuju više povećanje ukupnog broja neurona u usporedbi s povećanjem kalretininskih neurona.

Stoga je značaj povećanja proporcije kalretininskih neurona posebno važan unutar kortiko-kortikalne mreže viših asocijativnih područja u čovjeka.

7. ZAKLJUČCI

1. Citoarhitektonska svojstva medio-orbitalnog polja u štakora te polja 14c u majmuna i čovjeka pokazuju kako se radi o komplementarni područjima.

2. Aferentne projekcije medio-orbitalnog polja u štakora pokazuju glavna obilježja projekcija polja 14c opisanih kod majmuna i čovjeka.

3. Ukupan broj neurona povećava se po stopi koja je između štakora i majmuna bliska onoj između majmuna i čovjeka; izrazito odstupanje od prosječnog povećanja broja neurona vidljivo je između štakora i majmuna za sloj I i VI.

4. Ukupan volumen slojeva povećava se više od ukupnog broja neurona, a stopa povećanja volumena između majmuna i čovjeka dvostruko je veća od one između štakora i majmuna. Značajno odstupanje povećanja volumena od prosjeka vidljivo je samo između štakora i majmuna u sloju VI.

5. Smanjenje gustoće neurona (NeuN) ukazuje kako je kod majmuna morfologija neurona i međusobna povezanost složenija nego u štakora, a daleko veće usložnjavanje odvija se između majmuna i čovjeka.

6. Udio i gustoća neurona pokazuju kako sloj I u majmuna, i posebice u čovjeka, ima više sličnosti s ostalim kortikalnim slojevima nego s bijelom tvari, a što je slučaj u glodavaca. Udio kalretininskih neurona u sloju I (50%) kod majmuna i čovjeka dodatno ukazuje na značajnu reorganizaciju neuralne mreže sloja I kod primata.

7. Povećanje udjela neurona u sloju VI kod majmuna paralelno s iznad-prosječnim smanjenjem gustoće neurona ukazuje na značajnu reorganizaciju neuralne mreže sloja VI kod primata. Moguće je da se fetalni sloj pod pločom kod primata u polju 14c postnatalno kondenzira i priključi sloju VI.

8. Udio kalretininskih neurona značajno se razlikuje između slojeva, ali je princip da se njihov udio progresivno smanjuje od površnih do dubokih slojeva očuvan kroz sve analizirane vrste. To ukazuje na važniju ulogu kalretininskih neurona u lokalnim neuralnim krugovima površnih kortikalnih slojeva.

9. Broj kalretininskih neurona između štakora i majmuna peterostruko brže raste u odnosu na ukupan broj neurona i to ravnomjerno u svim slojevima. To ukazuje na značajnu reorganizaciju lokalne neuralne mreže kroz evoluciju sisavaca koja se ujednačeno zbiva kroz slojeve II-VI.

10. Za razliku od toga, povećanje broja kalretininskih neurona u odnosu na ukupan broj neurona između majmuna i čovjeka pokazuje različitu tendenciju između slojeva; za funkcionalnu specijalizaciju slojeva II/III potrebno je dodatno povećanje udjela kalretininskih neurona, dok je za funkcionalnu specijalizaciju slojeva V i VI bitnije povećanje ukupnog broja neurona.

11. Omjer projekcijskih naspram kalretininskih neurona u slojevima I-III iznosi najviše 3:1 što je trideset puta manje nego omjer u sloju VI kod štakora i pet puta manje nego omjer u sloju VI kod čovjeka. Kako se neuroni slojeva II/III projiciraju u druga kortikalna polja može se zaključiti da kalretininski neuroni imaju posebno važnu ulogu u procesuiranju informacija unutar kortiko-kortikalne mreže.

12. Povećanje udjela kalretininskih neurona može promijeniti strukturu neuralne mreže i omogućiti bolje funkcionalno procesuiranje na način da isti piramidni neuron može biti uključen u više različitih neuralnih sklopova.

13. Izrazito povećanje kalretininskih neurona u slojevima II/III ukazuje da bi ovaj model trebao biti od posebne važnosti u inter- i intra-arealnom procesuiranju, dok je za komunikaciju sa subkortikalnim strukturama prioritetnije povećanje u broju projekcijskih neurona.

8. SAŽETAK

U ovom istraživanju stereološkim metodama analiziran je udio kalretininskih neurona u medio-orbitalnom (MO) polju štakora, te polju 14c u majmuna i čovjeka. Kvalitativnom analizom potvrđeno je kako kalretininskih neuroni imaju obilježja ne-piramidnih (GABA) neurona.

Kvantitativni podaci su pokazali peterostruko povećanje udjela kalretininskih neurona između štakora (2,5%) i majmuna (12,5%). Kod čovjeka se njihov udio još dodatno povećao te oni čine 15% od ukupne populacije kortikalnih neurona. Najveći udio kalretininskih neurona zabilježen je u sloju I kod majmuna i čovjeka, gdje više od polovice neurona izražava kalretinin. Zanimljivo je i kako promjene u strukturi sloja I ukazuju da on kod primata u cjelini ima daleko složeniju neuralnu strukturu jer sadrži gotovo 7% od ukupnog broja svih kortikalnih neurona, dok je kod štakora taj udio nešto iznad 2%.

U ostalim slojevima podjednako je povećanje udjela kalretininskih neurona u ukupnoj populaciji neurona između štakora i majmuna. Nasuprot tome, od majmuna do čovjeka u slojevima II/III broj kalretininskih neurona raste brže od ukupnog broja neurona, dok je u slojevima V i VI obrnuto. To ukazuje kako od majmuna do čovjeka evolucija lokalnih neuralnih krugova uključuje funkcionalnu specijalizaciju specifičnu za sloj.

Podaci o smanjenju ukupne gustoće neurona (NeuN) po pojedinim slojevima pokazuju kako povećanje udjela kalretininskih neurona korelira s usložnjavanjem dendritičke morfologije neurona određenog sloja te povećanjem broja sinapsi i intra-arealnih projekcija. Tako je najmanja gustoća neurona zabilježena kod čovjeka u slojevima gdje dominiraju kortiko-kortikalni neuroni (II/III) i gdje je udio kalretininskih neurona znatno iznad prosjeka (22%).

Može se pretpostaviti da ovakvo dramatično povećanje udjela kalretininskih neurona mijenja strukturu lokalnih neuralnih krugova i omogućava povećanje kapaciteta procesuiranja bez linearnog povećanja broja projekcijskih neurona.

9. SUMMARY

Domagoj Džaja, Morphological and chemical characteristics of calretinin neurons in the primate neocortex, 2015.

In this study the proportion of calretinin neurons in medio-orbital (MO) area of rat as well as in area 14c of monkey and human has been studied using stereological approach. Qualitative analysis showed that calretinin neurons have features of non-pyramidal (GABA) neurons.

Quantitative analysis showed a five-fold increase in the proportion of calretinin neurons between rat (2,5%) and monkey (12,5%). In human there is an additional increase and they represent 15% of total neuron pool. The highest proportion of calretinin neurons is observed in monkey and human layer I, where half of neurons are expressing calretinin. Intrestingly, changes in structure of layer I imply that in primates it has more complex neuronal structure since almost 7% of all cortical neurons are located there, whereas in rat this proportion is slightly above 2%.

In other layers incrase in the proportion of calretinin neurons between rat and monkey appears concurrently. In contrary, between monkey and human number of calretinin neurons increases in layer II/III more then total number of neurons, whreas in layers V and VI this pattern is reversed. It seems that there is a layer specific patter for functional specialization of local circuitry during primate evolution.

Data about decrease in total neuronal density (NeuN) through cortical layers show that increase in the proportion of calretinin neurons correlates with increased dendritic complexity of particular layer as well as with increase in synaptic number and intra-areal connectivity. So, the lowest density is observed in layers of human cortex dominated by corticocortical neurons (II/III) where proportion of calretinin neurons is much above average (22%).

We hypothethised that such a pronounced increase in proportion of calretinin neurons is related with reorganization of local circuitries resulting in increase of processing capacity without linear increase in number of projection neurons.

10. POPIS LITERATURE

1. *Rakic P.* Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. Nat Rev Neurosci 2009;10(10):724-35.
2. *Fuster J.* The Prefrontal Cortex. Academic Press, 2015.
3. *Teffer K, Semendeferi K.* Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. Prog Brain Res 2012;195:191-218.
4. *Clowry G, Molnar Z, Rakic P.* Renewed focus on the developing human neocortex. J Anat 2010;217(4):276-88.
5. *Nieuwenhuys R.* The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. Anat Embryol (Berl) 1994;190(4):307-37.
6. *DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R i sur.* New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. Nat Rev Neurosci 2013;14(3):202-16.
7. *DeFelipe J, Elston GN, Fujita I i sur.* Neocortical circuits: evolutionary aspects and specificity versus non-specificity of synaptic connections. Remarks, main conclusions and general comments and discussion. J Neurocytol 2002;31(3-5):387-416.
8. *DeFelipe J, Farinas I.* The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. Prog Neurobiol 1992;39(6):563-607.
9. *Spruston N.* Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. Nat Rev Neurosci 2008;9(3):206-21.
10. *Thomson AM.* Neocortical layer 6, a review. Front Neuroanat 2010;4:13.
11. *Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA.* Electrophysiological classes of layer 2/3 pyramidal cells in monkey prefrontal cortex. J Neurophysiol 2012;108(2):595-609.
12. *Nimchinsky EA, Gilissen E, Allman JM, Perl DP, Erwin JM, Hof PR.* A neuronal morphologic type unique to humans and great apes. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(9):5268-73.
13. *Allman JM, Tetreault NA, Hakeem AY i sur.* The von Economo neurons in frontoinsular and anterior cingulate cortex in great apes and humans. Brain Struct Funct 2010;214(5-6):495-517.
14. *Braak H, Braak E.* Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. Prog Neurobiol 1985;25(2):93-139.
15. *Vercelli A, Assal F, Innocenti GM.* Emergence of callosally projecting neurons with stellate morphology in the visual cortex of the kitten. Exp Brain Res 1992;90(2):346-58.
16. *Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 2004;5(10):793-807.
17. *Freund TF, Buzsaki G.* Interneurons of the hippocampus. Hippocampus 1996;6(4):347-470.
18. *Cossart R, Petanjek Z, Dumitriu D i sur.* Interneurons targeting similar layers receive synaptic inputs with similar kinetics. Hippocampus 2006;16(4):408-20.
19. *Tomioka R, Rockland KS.* Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. J Comp Neurol 2007;505(5):526-38.
20. *Melzer S, Michael M, Caputi A i sur.* Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. Science 2012;335(6075):1506-10.
21. *Kostovic I, Rakic P.* Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. J Comp Neurol 1990;297(3):441-70.
22. *Super H, Uylings HB.* The early differentiation of the neocortex: a hypothesis on neocortical evolution. Cereb Cortex 2001;11(12):1101-9.
23. *Judas M, Sedmak G, Kostovic I.* The significance of the subplate for evolution and developmental plasticity of the human brain. Front Hum Neurosci 2013;7:423.

24. *Jones EG.* GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. Cereb Cortex 1993;3(5):361-72.

25. *Cajal SR, De Felipe J, Jones EG.* Cajal on the Cerebral Cortex. Oxford University Press 1988.

26. *Szentagothai J.* The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. Brain Res 1975;95(2-3):475-96.

27. *Caputi A, Rozov A, Blatow M, Monyer H.* Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. Cereb Cortex 2009;19(6):1345-59.

28. *Magloczky Z, Freund TF.* Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. Trends Neurosci 2005;28(6):334-40.

29. *Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA i sur.* Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 2008;9(7):557-68.

30. *Van Brederode JF, Mulligan KA, Hendrickson AE.* Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. J Comp Neurol 1990;298(1):1-22.

31. *Kubota Y, Hattori R, Yui Y.* Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. Brain Res 1994;649(1-2):159-73.

32. *Yan YH, van Brederode JF, Hendrickson AE.* Developmental changes in calretinin expression in GABAergic and nonGABAergic neurons in monkey striate cortex. J Comp Neurol 1995;363(1):78-92.

33. *Gonchar Y, Burkhalter A.* Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. Cereb Cortex 1997;7(4):347-58.

34. *Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T.* Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. J Comp Neurol 2003;467(1):60-79.

35. *Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A.* Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. Front Neuroanat 2007;1:3.

36. *Burkhalter A.* Many specialists for suppressing cortical excitation. Front Neurosci 2008;2(2):155-67.

37. *Uematsu M, Hirai Y, Karube F i sur.* Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. Cereb Cortex 2008;18(2):315-30.

38. *Xu X, Roby KD, Callaway EM.* Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. J Comp Neurol 2010;518(3):389-404.

39. *Rogers JH.* Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. Brain Res 1992;587(1):147-57.

40. *Kawaguchi Y, Kubota Y.* GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. Cereb Cortex 1997;7(6):476-86.

41. *Ma T, Wang C, Wang L i sur.* Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. Nat Neurosci 2013;16(11):1588-97.

42. *Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J.* Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Dev Neurobiol 2011;71(1):45-61.

43. *Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J.* Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. J Neurosci 1987;7(5):1503-19.

44. *Beaulieu C.* Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. Brain Res 1993;609(1-2):284-92.

45. *Micheva KD, Beaulieu C.* Postnatal development of GABA neurons in the rat somatosensory barrel cortex: a quantitative study. Eur J Neurosci 1995;7(3):419-30.

46. *del Rio MR, DeFelipe J.* Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. J Comp Neurol 1996;369(3):472-82.

47. *Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ.* Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. J Comp Neurol 1997;377(4):465-99.

48. *Gabbott PL, Jays PR, Bacon SJ.* Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). J Comp Neurol 1997;381(4):389-410.

49. *Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV, Kroner S, Lewis DA, Krimer LS.* Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. Cereb Cortex 2005;15(8):1178-86.

50. *Sherwood CC, Raghanti MA, Stimpson CD i sur.* Scaling of inhibitory interneurons in areas v1 and v2 of anthropoid primates as revealed by calcium-binding protein immunohistochemistry. Brain Behav Evol 2007;69(3):176-95.

51. *Barinka F, Salaj M, Rybar J, Krajcovicova E, Kubova H, Druga R.* Calretinin, parvalbumin and calbindin immunoreactive interneurons in perirhinal cortex and temporal area Te3V of the rat brain: qualitative and quantitative analyses. Brain Res 2012;1436:68-80.

52. *Beaulieu C, Campistron G, Crevier C.* Quantitative aspects of the GABA circuitry in the primary visual cortex of the adult rat. J Comp Neurol 1994;339(4):559-72.

53. *Meinecke DL, Peters A.* GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. J Comp Neurol 1987;261(3):388-404.

54. *Lin CS, Lu SM, Schmechel DE.* Glutamic acid decarboxylase and somatostatin immunoreactivities in rat visual cortex. J Comp Neurol 1986;244(3):369-83.

55. *Ren JQ, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T.* Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. Exp Brain Res 1992;92(1):1-14.

56. *Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F.* Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. Cereb Cortex 2004;14(10):1100-9.

57. *Gabbott PL, Bacon SJ.* Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. J Comp Neurol 1996;364(4):609-36.

58. *Conde F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA.* Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. J Comp Neurol 1994;341(1):95-116.

59. *Barinka F, Druga R.* Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. Physiol Res 2010;59(5):665-77.

60. *Meskenaite V.* Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, Macaca fascicularis. J Comp Neurol 1997;379(1):113-32.

61. *Melchitzky DS, Eggan SM, Lewis DA.* Synaptic targets of calretinin-containing axon terminals in macaque monkey prefrontal cortex. Neuroscience 2005;130(1):185-95.

62. *Sherwood CC, Holloway RL, Erwin JM, Hof PR.* Cortical orofacial motor representation in Old World monkeys, great apes, and humans. II. Stereologic analysis of chemoarchitecture. Brain Behav Evol 2004;63(2):82-106.

63. *Sherwood CC, Holloway RL, Erwin JM, Schleicher A, Zilles K, Hof PR.* Cortical orofacial motor representation in Old World monkeys, great apes, and humans. I. Quantitative analysis of cytoarchitecture. Brain Behav Evol 2004;63(2):61-81.

64. *Gabbott PL, Bacon SJ.* Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. J Comp Neurol 1996;364(4):567-608.

65. *Jones EG.* The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. Cereb Cortex 2009;19(9):1953-6.

66. *Beaulieu C, Kisvarday Z, Somogyi P, Cynader M, Cowey A.* Quantitative distribution of GABA-immunopositive and -immunonegative neurons and synapses in the monkey striate cortex (area 17). Cereb Cortex 1992;2(4):295-309.

67. *Fitzpatrick D, Lund JS, Schmechel DE, Towles AC.* Distribution of GABAergic neurons and axon terminals in the macaque striate cortex. J Comp Neurol 1987;264(1):73-91.

68. *Jones EG, Huntley GW, Benson DL.* Alpha calcium/calmodulin-dependent protein kinase II selectively expressed in a subpopulation of excitatory neurons in monkey sensory-motor cortex: comparison with GAD-67 expression. J Neurosci 1994;14(2):611-29.

69. *Hornung JP, De Tribolet N.* Distribution of GABA-containing neurons in human frontal cortex: a quantitative immunocytochemical study. Anat Embryol (Berl) 1994;189(2):139-45.

70. *Forbes CE, Grafman J.* The role of the human prefrontal cortex in social cognition and moral judgment. Annu Rev Neurosci 2010;33:299-324.

71. *Friocourt G, Parnavelas JG.* Identification of Arx targets unveils new candidates for controlling cortical interneuron migration and differentiation. Front Cell Neurosci 2011;5:28.

72. *Marin O.* Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. Nat Rev Neurosci 2012;13(2):107-20.

73. *Toth K, Eross L, Vajda J, Halasz P, Freund TF, Magloczky Z.* Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. Brain : a journal of neurology 2010;133(9):2763-77.

74. *Bernard C, Cossart R, Hirsch JC, Esclapez M, Ben-Ari Y.* What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy? Epilepsia 2000;41 Suppl 6:S90-5.

75. *Bernard C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y.* Interneurones are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. Epilepsy research 1998;32(1-2):93-103.

76. *Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC i sur.* Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. Nat Neurosci 2001;4(1):52-62.

77. *Esclapez M, Houser CR.* Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. J Comp Neurol 1999;412(3):488-505.

78. *Hirsch JC, Agassandian C, Merchan-Perez A i sur.* Deficit of quantal release of GABA in experimental models of temporal lobe epilepsy. Nat Neurosci 1999;2(6):499-500.

79. *Khazipov R, Esclapez M, Caillard O i sur.* Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. J Neurosci 2001;21(24):9770-81.

80. *Defelipe J.* The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. Front Neuroanat 2011;5:29.

81. *Shepherd GM.* The microcircuit concept applied to cortical evolution: from three-layer to six-layer cortex. Front Neuroanat 2011;5:30.

82. *Elston GN, Benavides-Piccione R, Elston A, Manger PR, Defelipe J.* Pyramidal cells in prefrontal cortex of primates: marked differences in neuronal structure among species. Front Neuroanat 2011;5:2.

83. *Defelipe J, Markram H, Rockland KS.* The neocortical column. Front Neuroanat 2012;6:22.

84. *Barbas H, Hilgetag CC, Saha S, Dermon CR, Suski JL.* Parallel organization of contralateral and ipsilateral prefrontal cortical projections in the rhesus monkey. BMC Neurosci 2005;6:32.

85. *Yeterian EH, Pandya DN, Tomaiuolo F, Petrides M.* The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain. Cortex 2012;48(1):58-81.

86. *Wang Y, Markram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J, Goldman-Rakic PS.* Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. Nat Neurosci 2006;9(4):534-42.

87. *Verduzco-Flores S, Bodner M, Ermentrout B, Fuster JM, Zhou Y.* Working memory cells' behavior may be explained by cross-regional networks with synaptic facilitation. PLoS One 2009;4(8):e6399.

88. *Kisvarday ZF, Martin KA, Freund TF, Magloczky Z, Whitteridge D, Somogyi P.* Synaptic targets of HRP-filled layer III pyramidal cells in the cat striate cortex. Exp Brain Res 1986;64(3):541-52.

89. *Morrison JH, Hof PR.* Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. Prog Brain Res 2002;136:467-86.

90. *Selemon LD, Mrzljak J, Kleinman JE, Herman MM, Goldman-Rakic PS.* Regional specificity in the neuropathologic substrates of schizophrenia: a morphometric analysis of Broca's area 44 and area 9. Arch Gen Psychiatry 2003;60(1):69-77.

91. *Dean B.* Is schizophrenia the price of human central nervous system complexity? Aust N Z J Psychiatry 2009;43(1):13-24.

92. *Dorph-Petersen KA, Delevich KM, Marcsisin MJ i sur.* Pyramidal neuron number in layer 3 of primary auditory cortex of subjects with schizophrenia. Brain Res 2009;1285:42-57.

93. *Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME i sur.* Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. JAMA 2011;306(18):2001-10.

94. *Jacot-Descombes S, Uppal N, Wicinski B i sur.* Decreased pyramidal neuron size in Brodmann areas 44 and 45 in patients with autism. Acta Neuropathol 2012;124(1):67-79.

95. *Selemon LD, Ceritoglu C, Ratnanather JT i sur.* Distinct abnormalities of the primate prefrontal cortex caused by ionizing radiation in early or midgestation. J Comp Neurol 2013;521(5):1040-53.

96. *Petanjek Z, Judas M, Kostovic I, Uylings HB.* Lifespan alterations of basal dendritic trees of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a layer-specific pattern. Cereb Cortex 2008;18(4):915-29.

97. *Petanjek Z, Judas M, Simic G i sur.* Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(32):13281-6.

98. *Goldman-Rakic PS.* The "psychic" neuron of the cerebral cortex. Ann N Y Acad Sci 1999;868:13-26.

99. *Melchitzky DS, Lewis DA.* Pyramidal neuron local axon terminals in monkey prefrontal cortex: differential targeting of subclasses of GABA neurons. Cereb Cortex 2003;13(5):452-60.

100. *Spocter MA, Hopkins WD, Barks SK i sur.* Neuropil distribution in the cerebral cortex differs between humans and chimpanzees. J Comp Neurol 2012;520(13):2917-29.

101. *Groenewegen HJ, Uylings HB.* The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. Prog Brain Res 2000;126:3-28.

102. *Petanjek Z, Kostovic I.* Epigenetic regulation of fetal brain development and neurocognitive outcome. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109(28):11062-3.

103. *Rajkowska G, Goldman-Rakic PS.* Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: I. Remapping of areas 9 and 46 using quantitative criteria. Cereb Cortex 1995;5(4):307-22.

104. *Rajkowska G, Goldman-Rakic PS.* Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: II. Variability in locations of areas 9 and 46 and relationship to the Talairach Coordinate System. Cereb Cortex 1995;5(4):323-37.

105. *Buckner RL, Krienen FM.* The evolution of distributed association networks in the human brain. Trends Cogn Sci 2013;17(12):648-65.

106. *Hofman MA.* Evolution of the human brain: when bigger is better. Front Neuroanat 2014;8:15.

107. *Hladnik A, Dzaja D, Darmopil S, Jovanov-Milosevic N, Petanjek Z.* Spatio-temporal extension in site of origin for cortical calretinin neurons in primates. Front Neuroanat 2014;8:50.

108. *Petanjek Z, Berger B, Esclapez M.* Origins of cortical GABAergic neurons in the cynomolgus monkey. Cereb Cortex 2009;19(2):249-62.

109. *Petanjek Z, Kostovic I, Esclapez M.* Primate-specific origins and migration of cortical GABAergic neurons. Front Neuroanat 2009;3:26.

110. *Sherwood CC, Holloway RL, Semendeferi K, Hof PR.* Is prefrontal white matter enlargement a human evolutionary specialization? Nat Neurosci 2005;8(5):537-8; author reply 8.

111. *Butt SJ, Fuccillo M, Nery S i sur.* The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. Neuron 2005;48(4):591-604.

112. *Toledo-Rodriguez M, Blumenfeld B, Wu C i sur.* Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex. Cereb Cortex 2004;14(12):1310-27.

113. *Schwaller B.* Calretinin: from a "simple" Ca(2+) buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. Front Neuroanat 2014;8:3.

114. *del Rio MR, DeFelipe J.* A light and electron microscopic study of calbindin D-28k immunoreactive double bouquet cells in the human temporal cortex. Brain Res 1995;690(1):133-40.

115. *Yanez IB, Munoz A, Contreras J, Gonzalez J, Rodriguez-Veiga E, DeFelipe J.* Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. J Comp Neurol 2005;486(4):344-60.

116. *Peters A, Kimerer LM.* Bipolar neurons in rat visual cortex: a combined Golgi-electron microscope study. J Neurocytol 1981;10(6):921-46.

117. *Jiang X, Wang G, Lee AJ, Stornetta RL, Zhu JJ.* The organization of two new cortical interneuronal circuits. Nat Neurosci 2013;16(2):210-8.

118. *Urban Z, Magloczky Z, Freund TF.* Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. Acta biologica Hungarica 2002;53(1-2):205-20.

119. *Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M.* Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. Nat Neurosci 2013;16(8):1068-76.

120. *Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A i sur.* Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. J Physiol 2004;561(Pt 1):65-90.

121. *Cardin JA, Carlen M, Meletis K i sur.* Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. Nature 2009;459(7247):663-7.

122. *Freund TF.* Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. Trends Neurosci 2003;26(9):489-95.

123. *Gulyas AI, Szabo GG, Ulbert I i sur.* Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus. J Neurosci 2010;30(45):15134-45.

124. *Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P.* Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. Nature 1995;378(6552):75-8.

125. *Pouille F, Scanziani M.* Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. Nature 2004;429(6993):717-23.

126. *Cauli B, Zhou X, Tricoire L, Toussay X, Staiger JF.* Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons. Front Neuroanat 2014;8:52.

127. *Borgers C, Talei Franzesi G, Lebeau FE, Boyden ES, Kopell NJ.* Minimal size of cell assemblies coordinated by gamma oscillations. PLoS Comput Biol 2012;8(2):e1002362.

128. *Somogyi P, Katona L, Klausberger T, Lasztoczi B, Viney TJ.* Temporal redistribution of inhibition over neuronal subcellular domains underlies state-dependent rhythmic change of excitability in the hippocampus. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2014;369(1635):20120518.

129. *Harris KD, Csicsvari J, Hirase H, Dragoi G, Buzsaki G.* Organization of cell assemblies in the hippocampus. Nature 2003;424(6948):552-6.

130. *Buzsaki G, Wang XJ.* Mechanisms of gamma oscillations. Annu Rev Neurosci 2012;35:203-25.

131. *Barbas H.* General Cortical and Special Prefrontal Connections: Principles from Structure to Function. Annu Rev Neurosci 2015.

132. *Carmichael ST, Price JL.* Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. J Comp Neurol 1994;346(3):366-402.

133. *Ongur D, Ferry AT, Price JL.* Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. J Comp Neurol 2003;460(3):425-49.

134. *Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B.* Do rats have a prefrontal cortex? Behav Brain Res 2003;146(1-2):3-17.

135. *Van De Werd HJ, Uylings HB.* The rat orbital and agranular insular prefrontal cortical areas: a cytoarchitectonic and chemoarchitectonic study. Brain Struct Funct 2008;212(5):387-401.

136. *Wallis JD.* Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision-making. Nat Neurosci 2012;15(1):13-9.

137. *Wang L, Li X, Hsiao SS i sur.* Differential roles of delay-period neural activity in the monkey dorsolateral prefrontal cortex in visual-haptic crossmodal working memory. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112(2):E214-9.

138. *Petrides M, Tomaiuolo F, Yeterian EH, Pandya DN.* The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. Cortex 2012;48(1):46-57.

139. *Brodmann K, Garey LJ.* Brodmann's Localisation in the Cerebral CortexSpringer 1994.

140. *Dombrowski SM, Hilgetag CC, Barbas H.* Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. Cereb Cortex 2001;11(10):975-88.

141. *Hoover WB, Vertes RP.* Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. J Comp Neurol 2011;519(18):3766-801.

142. *Carmichael ST, Price JL.* Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. J Comp Neurol 1995;363(4):642-64.

143. *Carmichael ST, Price JL.* Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. J Comp Neurol 1995;363(4):615-41.

144. *Kostovic I, Judas M, Kostovic-Knezevic L i sur.* Zagreb research collection of human brains for developmental neurobiologists and clinical neuroscientists. The International journal of developmental biology 1991;35(3):215-30.

145. *Judas M, Simic G, Petanjek Z i sur.* The Zagreb Collection of human brains: a unique, versatile, but underexploited resource for the neuroscience community. Ann N Y Acad Sci 2011;1225 Suppl 1:E105-30.

146. *Watson RE, Jr., Wiegand SJ, Clough RW, Hoffman GE.* Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. Peptides 1986;7(1):155-9.

147. *Lu W, Haber SN.* In situ hybridization histochemistry: a new method for processing material stored for several years. Brain Res 1992;578(1-2):155-60.

148. *Hou J, Riise J, Pakkenberg B.* Application of immunohistochemistry in stereology for quantitative assessment of neural cell populations illustrated in the Gottingen minipig. PLoS One 2012;7(8):e43556.

149. *West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ.* Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in thesubdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. Anat Rec 1991;231(4):482-97.

150. *West MJ.* Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. Trends Neurosci 1999;22(2):51-61.

151. *Ugolini G.* Advances in viral transneuronal tracing. J Neurosci Methods 2010;194(1):2-20.

152. *Salin P, Castle M, Kachidian P i sur.* High-resolution neuroanatomical tract-tracing for the analysis of striatal microcircuits. Brain Res 2008;1221:49-58.

153. *Bras H, Gaytan SP, Portalier P i sur.* Prenatal activation of 5-HT2A receptor induces expression of 5-HT1B receptor in phrenic motoneurons and alters the organization of their premotor network in newborn mice. Eur J Neurosci 2008;28(6):1097-107.

154. *Coulon P, Bras H, Vinay L.* Characterization of last-order premotor interneurons by transneuronal tracing with rabies virus in the neonatal mouse spinal cord. J Comp Neurol 2011;519(17):3470-87.

155. *Paxinos G, Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, 2006.

156. *Beck E.* A cytoarchitectural investigation into the boundaries of cortical areas 13 and 14 in the human brain. J Anat 1949;83(2):147-57.

157. *Petrides M, Pandya DN.* Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque frontal cortex. In: Boller F, Grafman J, ur. Handbook of neuropsychology, str. 17-58. Elsevier, 1994.

158. *Kondo H, Saleem KS, Price JL.* Differential connections of the temporal pole with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. J Comp Neurol 2003;465(4):499-523.

159. *Jovanov Milosevic N, Judas M, Aronica E, Kostovic I.* Neural ECM in laminar organization and connectivity development in healthy and diseased human brain. Prog Brain Res 2014;214:159-78.

160. *Kostovic I, Jovanov-Milosevic N, Rados M i sur.* Perinatal and early postnatal reorganization of the subplate and related cellular compartments in the human cerebral wall as revealed by histological and MRI approaches. Brain Struct Funct 2014;219(1):231-53.

161. *Kostovic I, Sedmak G, Vuksic M, Judas M.* The relevance of human fetal subplate zone for developmental neuropathology of neuronal migration disorders and cortical dysplasia. CNS Neurosci Ther 2015;21(2):74-82.

162. *Kanold PO, Luhmann HJ.* The subplate and early cortical circuits. Annu Rev Neurosci 2010;33:23-48.

163. *Rakic P.* Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. Nat Rev Neurosci 2002;3(1):65-71.

164. *Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR.* Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. J Neurosci 1994;14(3 Pt 2):1834-55.

165. *Hof PR, Glezer, II, Conde F i sur.* Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. Journal of chemical neuroanatomy 1999;16(2):77-116.

166. *Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA i sur.* Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. Nature 2011;478(7369):382-6.

167. *Gonchar Y, Burkhalter A.* Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. Cereb Cortex 1999;9(7):683-96.

168. *Zemankovics R, Kali S, Paulsen O, Freund TF, Hajos N.* Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current and passive membrane characteristics. J Physiol 2010;588(Pt 12):2109-32.

169. *Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K.* The subcellular organization of neocortical excitatory connections. Nature 2009;457(7233):1142-5.

170. *Rubio-Garrido P, Perez-de-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clasca F.* Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. Cereb Cortex 2009;19(10):2380-95.

171. *Freund TF, Katona I.* Perisomatic inhibition. Neuron 2007;56(1):33-42.

172. *Trevelyan AJ, Watkinson O.* Does inhibition balance excitation in neocortex? Prog Biophys Mol Biol 2005;87(1):109-43.

173. *Buzsaki G.* Rhythms of the Brain. Oxford University Press 2011.

174. *Xu H, Jeong HY, Tremblay R, Rudy B.* Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. Neuron 2013;77(1):155-67.

175. *Povysheva NV, Zaitsev AV, Rotaru DC, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA, Krimer LS.* Parvalbumin-positive basket interneurons in monkey and rat prefrontal cortex. J Neurophysiol 2008;100(4):2348-60.

176. *Meyer AH, Katona I, Blatow M, Rozov A, Monyer H.* In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. J Neurosci 2002;22(16):7055-64.

177. *Buzsaki G.* Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. Neuron 2010;68(3):362-85.

178. *Dzaja D, Hladnik A, Bicanic I, Bakovic M, Petanjek Z.* Neocortical calretinin neurons in primates: increase in proportion and microcircuitry structure. Front Neuroanat 2014;8:103.

11. ŽIVOTOPIS

Domagoj Džaja rođen je 31.05.1982. godine u Zagrebu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završava u Vrbovcu, a Medicinski fakultet u Zagrebu završava 2007. godine. Kao stažist Klinike za traumatologiju odrađuje jednogodišnji liječnički staž te polaže stručni ispit za samostalni rad u prosincu 2008. godine. Od 2009. godine radi na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga kao znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta „Putevi migracije hipokampalnih GABA-ergičkih neurona u majmuna i čovjeka“ (voditelj prof. dr. sc. Zdravko Petanjek). Sudjeluje u nastavi na Studiju medicine na predmetima „Temelji neuroznanosti“, „Anatomija“ i izbornom predmetu „Mehanizmi boli“. Aktivno sudjeluje u popularizaciji znanosti vezano uz događanja na „Tjednu mozga“ i „Festivalu znanosti“ te kroz gostovanja u emisijama Hrvatske televizije (Znanstvena petica) i Hrvatskog radija (Izaberi zdravlje). Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2010. godine upisuje Doktorski studij Neuroznanost, a 2012. godine mu je prihvaćen prijedlog doktorskog rada pod naslovom „Morfološka i kemijska obilježja kalretininskih neurona u neokorteksu primata“ (mentor prof. dr. sc. Zdravko Petanjek). U sklopu istraživanja boravio je 18 mjeseci u Laboratoriju za neuroanatomiju Medicinskog fakulteta La Timone Sveučilišta Aix Marseille (Institut de Neurosciences des Systèmes - INSERM UMR 1106), Medicinskog fakulteta La Timone u Marseilleu. Trenutno je suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Microcircuitry of higher cognitive functions“ (voditelj prof. dr. sc. Zdravko Petanjek) u okviru kojega je i izrađena ova disertacija. Do sada je objavio sedam kongresnih sažetaka te dva znanstvena rada.