

## PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH.

EWA KUBLIK, PAWEŁ MUSIAŁ

*Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego**Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

## BADANIE UKŁADÓW CZUCIOWYCH METODĄ POTENCJAŁÓW WYWOŁANYCH

## WSTĘP

Wibrysy to długie wąsy zatokowe, pełniące u gryzoni rolę istotnego narządu czuciowego. Układ wibrysowo-baryłkowy, czyli część układu czuciowego zajmująca się informacją przekazywaną przez receptory połączone z wibrysami, jest doskonałym modelem do badania układów sensorycznych. Wynika to z przejrzystej organizacji topograficznej tego systemu, jak również z względnie dużej powierzchni zajmowanej w korze czuciowej przez reprezentację wibrys. W

rozdziale tym przedstawiamy wyniki badań układu baryłkowego metodą potencjałów wywołanych. Pokazujemy, że metoda ta nadaje się bardzo dobrze do badania cech procesu przetwarzania informacji czuciowej. Umożliwia również śledzenie dynamiki funkcjonalnych zmian zachodzących w korze czuwającego (nie uspiętego) zwierzęcia w wyniku modyfikacji znaczenia bodźców czuciowych. Sądzimy, że zmiany te odzwierciedlają wstępny etap uczenia się.

## UKŁAD BARYŁKOWY

## WIBRYSY

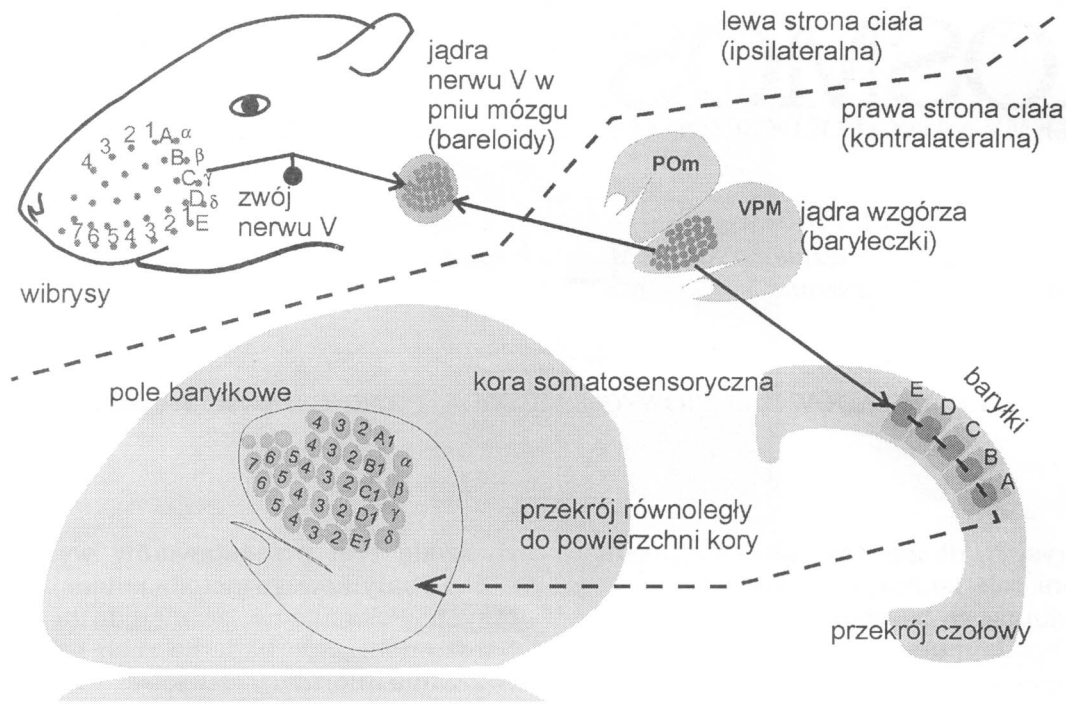
Wąsy zatokowe wyrastają głównie na górnej i dolnej wardze, mniej licznie występują też wokół oczodołów i uszu, a nawet na tułowiu, kończynach i ogonie. Największe z nich — wi-brysy twarzowe — rosną na pyszczku, na tak zwanej poduszce wibrysowej. Ułożone są w pięciu rzędach (oznaczanych od góry kolejnymi literami alfabetu: A-E), z których każdy zawiera od 4 do 8 wibrys. Pozycje w rzędzie (czyli kolejne łuki) są numerowane cyframi arabskimi w kierunku od ucha do nosa (rys. 1).

Wibrysy są dla szczura bardzo istotnym i czułym narzędziem zdobywania informacji o otoczeniu. Szczury posługując się wibrysami są w stanie odróżnić fakturę powierzchni na poziomie porównywalnym z naczelnymi, posługującymi się opuszkami palców. Wytrenowane zwierzęta potrafią odróżnić powierzchnię porowatą z rowkami o głębokości i szerokości 1 mm, położonymi co 1 mm, od powierzchni porowatej z takimi samymi rowkami, których wzajemne odległości są o 60 [Lim większe. Zadanie to jest niezwykle trudne do wykonania przez człowieka za pomocą opuszek palców. Szczury potrafią

również rozpoznawać subtelne różnice w gradacji papieru ściernego. Zabieg usunięcia wibrys u szczurów prowadzi do nieprawidłowości w orientacji, funkcjach ruchowych, równowadze i zachowaniu seksualnym (VINCENT 1912, Gu-STAFSON i FELBAIN-KERAMIDES 1977).

## DROGA CZUCIOWA

Poszczególne wibrysy są reprezentowane w pierwszorzędowej korze czuciowej przez baryłki, czyli zgrupowania komórek IV warstwy, nazwane tak z powodu charakterystycznego kształtu widocznego na czołowych przekrojach tkanki (rys. 1). Baryłka zbudowana jest z cylindrycznie upakowanych komórek ziarnistych kory czuciowej, skupionych gęściej w ściankach (ang. sides) niż we wnętrzu (ang. hollows). Obszary z małą liczbą komórek, otaczające baryłki na poziomie warstwy IV kory czuciowej, to tak zwane przegrody (ang. septa). WOOLSEY i VAN DER LOOS jako pierwsi opisali struktury kory baryłkowej. Za pomocą rejestracji korowych potencjałów wywołanych pobudzeniem różnych obszarów ciała dostrzegli funkcjonalny związek baryłek z wibrysami (WOOLSEY i VAN DER LOOS 1970). Warto wspomnieć, że w korze czuciowej gryzoni



Rys. 1. Schemat układu baryłkowego szczura.

Kropki na pyszczku szczura odpowiadają miejscom w których wyrastają duże wibrysy twarzowe. Są one ułożone w pięciu rzędach, oznaczonych literami od A do E. W każdym rzędzie znajduje się od 4 do 8 wąsów. Pierwszy neuron drogi czuciowej znajduje się w zwoju nerwu trójdzielnego [V nerw Twarzowy). Jego dendryty odbierają informację z receptorów, zaś aksony przekazują je do zespołu jąder nerwu V w pniu mózgu (II neuron czuciowy). Włókna wychodzące z tych jąder przecinają linię pośrodkową i docierają do wzgórza po przeciwnej stronie ciała. Trzeci neuron czuciowy znajduje się w przyśrodkowej części jądra brzuszno-tylnego wzgórza (VPM). Jego aksony docierają do kory somatosensorycznej (warstwy IV i Vb). Na wszystkich poziomach drogi czuciowej pojedynczym wibrysom odpowiadają odrębne zgrupowania komórek (barelidy, baryłeczki i baryłki) ułożone względem siebie we wzór odpowiadający topografii wibrys na pyszczku.

znajduje się około 250 baryłek. Interesujące nas baryłki duże, reprezentujące wibrysy twarzowe, zajmują tylnoprzyśrodkowy obszar kory czuciowej i wytyczają tak zwane pole baryłkowe (PMBSF, ang. postero-medial barrel subfield).

Na skrawkach kory, ciętych równoległe do jej powierzchni, widać, że baryłki duże są ułożone analogicznie jak reprezentowane przez nie wąsy, to znaczy w pięciu rzędach po 4-8 baryłek każdy (rys. 1). Każda z nich jest oznaczona identycznie jak odpowiadająca jej wibrysa, na przykład baryłka A1 reprezentuje wąs A 1. Baryłka jest częścią kolumny korowej, cylindrycznej struktury rozciągającej się przez całą grubość kory, prostopadłe do jej powierzchni.

Obszar pierwszorzędowej kory czuciowej, przyjmującej informację od wibrys, jest relatywnie duży. Pole baryłkowe stanowi znaczną część całej kory czuciowej szczura (rys. 1). Pojedynczej wibrysie odpowiada kolumna korowa o średnicy około 400  $\mu\text{m}$ . Przekrój czubka stosowanych elektrod wynosi od ułamka mikrona do 50  $\mu\text{m}$ , co zapewnia stosunkowo dobrą rozdzielczość podczas rejestracji elektrofizjologicznych.

W skład układu baryłkowego wchodzi, oprócz samych wąsów oraz kory baryłkowej, również struktury pośredniczące w przepływie

informacji czuciowych —jądra w pniu mózgu i we wzgórzu. Wibrysa przekazuje pobudzenie mechanoreceptorom (ciałkom Merkla, Ruffinie-go oraz lancetowatym zakończeniom nerwowym), znajdującym się w zewnętrznej pochewce jej cebulki. Mechanoreceptory, wrażliwe na odkształcenia i wibracje, przekazują dalej pobudzenie czuciowym włóknom aferentnym szczękowej części nerwu trójdzielnego. Włókna te pochodzą od komórek zlokalizowanych w zwoju trójdzielnym. Aksony tych komórek docierają do zespołu jąder nerwu trójdzielnego, leżących w pniu mózgu. Projekcja z jąder nerwu trójdzielnego jest skierowana głównie do leżących po przeciwległej stronie ciała (czyli kontralateralnie) jąder wzgórza czuciowego: do przyśrodkowej części jądra brzuszno-tylnego (VPM, lat. *nucleus ventroposteromedialis*) oraz przyśrodkowej części jądra tylnego (POM, lat. *nucleus posteromedialis*) (CHIAIA i współaut. 199 la, b). Projekcję wzgórzową do kory baryłkowej, przenoszącą specyficzną informację czuciową, można ogólnie podzielić na pierwszorzędową i dru-gorzędową (DIAMOND 1995). Drogę pierwszorzędową tworzą włókna szlaku peryferycznego dochodzącego do VPM, z którego aksony docierają głównie do komórek ziarnistych formujących w

IV warstwie baryłki, zaś drugorzędową tworzy projekcja przez POM, która omija w korze same baryłki, a dociera do komórek leżących ponad, poniżej i pomiędzy baryłkami.

Topologiczna reprezentacja wibrys twarzowych jest zachowana również na wszystkich pośrednich piętrach układu baryłkowego (rys. 1i Na poziomie pnia mózgu, w głównych jądrach nerwu trójdzielnego, poszczególnym wi-brysom odpowiadają skupiska komórek zwane baryłeczkami (ang. barettes; MA i WOOLSEY

#### ODPOWIEDZI WYWOŁANE W KORZE BARYŁKOWEJ

Naturalne bodźce czuciowe (lub elektryczna stymulacja odpowiednich nerwów) wywołują zmianę aktywności elektrycznej neuronów w całym szlaku somatosensorycznym. Kora baryłkowa reaguje pobudzeniem na poruszenie wąsów. Ruchomą końcówkę piezoelektrycznego stymulatora mocujemy do wibiysy w odległości około 15 mm od pyszcza. Podanie na wejście elementu piezoelektrycznego impulsu elektrycznego o amplitudzie 5 V i trwającego 1 ms powoduje wychylenie wąsa o około 1 mm. W zależności od wielkości elektrod umieszczonych w tkance można rejestrować aktywność jednej (ang. single unit), kilku (ang. multiunit) lub tysięcy komórek (czyli tak zwany lokalny potencjał polowy, inaczej — mikroEEG).

#### AKTYWNOŚĆ POJEDYNCZYCH KOMÓREK WYWOŁANA BODŹCEM CZUCIOWYM

Do naszych rozważań pomocne będą wyniki pomiarów aktywności pojedynczych komórek w poszczególnych warstwach (ARMSTRONG-JAMES 1995), dzięki którym można prześledzić sekwencję pobudzenia w korze baryłkowej (rys. 2b). Wartości latencji pobudzenia komórek przedstawione na rysunku odnoszą się do chwili pojawiania się odpowiedzi nie zaś maksimum ich aktywności.

Poruszenie pojedynczej wibrysy pobudza komórki w więcej niż jednej baryłce, a tym samym każda baryłka reaguje na poruszenie więcej niż jednego wąsa. Jednak odpowiedzi te nie są równoważne: komórki w danej kolumnie najszybciej i najsilniej reagują na stymulację wąsa odpowiadającego topograficznie jej położeniu w polu baryłkowym. Zarówno stymulowaną wibryse, jak i pobudzoną przez nią bezpośrednio baryłkę mianuje się zwykle terminem „centralna”. Otaczające je wąsy i baryłki nazywane są odpowiednio wibrysami i baryłkami sąsiednimi (rys. 2a).

1984, DURHAM i WOOLSEY 1984, MA 1991), z kolei na poziomie wzgórza, a ściślej w środkowej części jądra brzuszno-tylnego wzgórza — bare-łoidy (ang. barreloids).

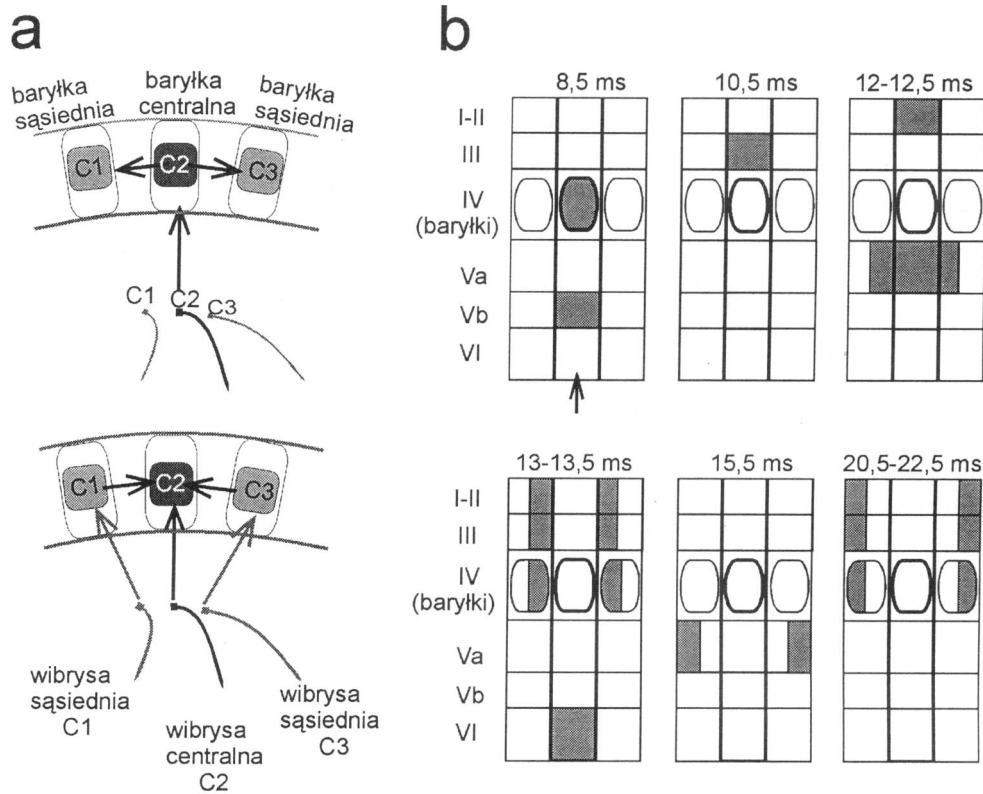
Sygnaly z kory baryłkowej docierają następnie do kolejnych, asocjacyjnych pól kory, gdzie są wykorzystywane w wyższych (np. asocjacyjnych) procesach nerwowych. My jednak zatrzymamy się na etapie pierwszorzędowej kory czuciowej.

W pierwszej fazie pobudzenia (w czasie 8,5-12 ms od podania bodźca) odpowiadają wyłącznie komórki w warstwach I-IV oraz Vb kolumny centralnej. Po zadziałaniu bodźca na wibryse najszybciej obserwuje się aktywność komórek w warstwach IV i Vb (monosynaptyczne pobudzenie ze wzgórza), następnie w warstwie III, po czym w I/II i Va. W warstwie Va odpowiedzi są wielowibrysowe, co oznacza, że aktywne są jednocześnie komórki położone w kolumnie centralnej i w najbliższych kolumnach sąsiednich. W dalszej kolejności (13-22,5ms) zaczynają odpowiadać komórki sąsiednich kolumn w warstwach I-IV, jak również w warstwie VI kolumny centralnej, a następnie komórki odleglejszych kolumn sąsiednich w warstwie Va i w warstwach I-IV.

#### ZMIANY ZBIORCZEJ AKTYWNOŚCI KOMÓREK WYWOŁANE BODŹCEM

Zaimplantowane (umieszczone na stałe podczas operacji pod narkozą) w korze szczura elektrody są na tyle duże, że rejestrują zbiorczą aktywność wielu tysięcy komórek (mikroEEG). Odpowiedź wywołana (potencjał wywołany — EP, ang. evoked potential) jest widoczna jako charakterystyczna sekwencja fal w EEG, obrazująca zsynchronizowaną przez bodziec aktywność tych komórek (rys. 3). Zarejestrowane potencjały wywołane możemy analizować, porównywać ze sobą i uśredniać przyjmując, że zaczynają się w momencie stymulacji.

Na rysunku 3 jest przedstawiony typowy potencjał wywołany, uśredniony z 50 odpowiedzi na stymulację pojedynczego wąsa, odbieranych na głębokości IV warstwy kory baryłkowej. Już na pierwszy rzut oka w odpowiedzi wywołanej można wyodrębnić trzy fale. Pierwsza z nich (P 1) to niewielkie odchylenie potencjału w stronę wartości dodatnich, o wartości maksymalnej przypadającej na czas 6-8 ms po stymu-

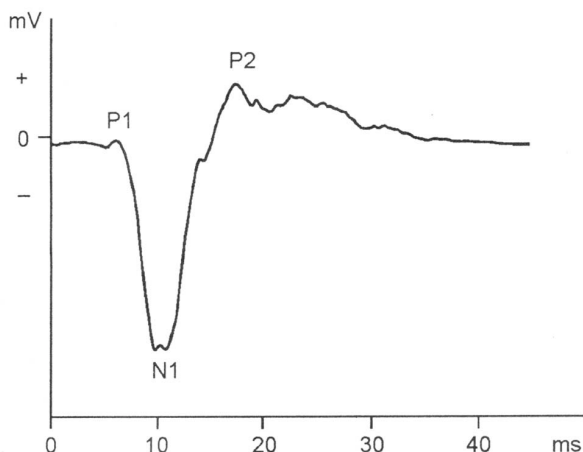


Rys. 2. a — schemat ilustrujący wzajemne relacje wibrysy i baryłek. Góra: dla baryłki C2 wibrysa centralną : wibrysa o tym samym oznaczeniu — C2; C1 i C3 (oraz nieobecne na rysunku B2, D2 itd.) to wibrysy sąsiednie. Dół: dla wibrysy C2 baryłka (i cała kolumna) C2 jest baryłką centralną, natomiast C1 i C3 (oraz D2 itd.) są baryłkami sąsiednimi, b — Przedstawia przebieg pobudzenia w korze baryłkowej, opracowany podstawie rejestracji aktywności pojedynczych komórek (ARMSTRONG-JAMES 1995). Na poruszenie ;dyn czego węża najszybciej reagują komórki w odpowiadającej mu baryłce centralnej. Podane wartości ;dow okrešlają latencję (czas od zadziałania bodźca), z jaką zaczynają reagować komórki w zacięniowanym rejonie.

lacji. Po niej następują kolejno: składowa ujemni (z maksimum w 9-12 ms) i dodatnia P2 (18-25 ms). Mimo że kolejne fale stanowią odrębne elementy odpowiedzi, nie musi to oznaczać, że odpowiadają im procesy pobudzania (lub hamowania) innych populacji neuronów. W gruncie rzeczy w każdej składowej może sumować

się kilka komponentów odpowiadających różnym procesom aktywacji elementów neuronalnych kory. Ponadto aktywność danej grupy komórek może przejawiać się w sekwencji kilku kolejnych fal aktywności elektrycznej.

Jak widać potencjał wywołany stanowi globalną miarę aktywności wielu komórek kory. Nie tak łatwo znaleźć w nim bezpośrednie od-



Rys. 3. Potencjał wywołany uśredniony z 50 pojedynczych odpowiedzi na stymulację wibrysy. Na osi odciętych czas [ms] (punkt zerowy odpowiada momentowi stymulacji wibrysy), na osi rzędnych wartość potencjału [mV]. Zaznaczono główne składowe potencjału: pierwszą falę dodatnią (P1), pierwszą falę ujemną (N1), drugą falę dodatnią (P2). W obrębie maksimum fali N1 widać dwa subkomponenty oddalone od siebie o około 2 ms.

zwierciedlenie aktywności komórek w poszczególnych warstwach kory. Pamiętajmy jednak o tym, że dla zgromadzenia danych, pokazanych na rysunku 2b, trzeba było wielu doświadczeń, w czasie których rejestrowano setki komórek różnych klas. Jak się niebawem przekonamy, właściwa analiza

potencjałów, uzyskanych podczas jednej sesji doświadczalnej, pozwala na wyciągnięcie pewnych ogólnych wniosków na temat przetwarzania informacji czuciowych w korze baryłkowej.

#### ANALIZA POTENCJAŁÓW WYWOŁANYCH

Rejestrowane w korze baryłkowej potencjały wywołane możemy analizować/porównywać w trzech umownych wymiarach. W „płaszczyźnie poziomej” obserwujemy odpowiedzi jednej kolumny korowej na poruszanie różnych wibrys. Przesuwając elektrodę prostopadle do powierzchni kory „w pionie” widzimy różnicę potencjałów wywołanych,

##### MAPA ODPOWIEDZI

Wstępnym etapem doświadczeń chronicznych jest operacja, podczas której w wybranych strukturach mózgu implantuje się elektrody. Dzięki temu możemy później rejestrować aktywność elektryczną mózgu nie uspionego, normalnie reagującego zwierzęcia. Z kolei podczas doświadczeń ostrych lub operacji wstępnej (na zwierzętach w narkozie) elektroda jest podtrzymywana przez ramię mikromanipulatora i może być dzięki temu przemieszczana w czasie eksperymentu.

Po umieszczeniu elektrody w korze baryłkowej szukamy wibrysy, której stymulacja wywołuje w miejscu rejestracji największą odpowiedź. (Jest to oczywiście wibrysa centralna względem baryłki, w pobliżu której znajduje się elektroda). Badanie to, nazywane mapowaniem pola wibrysowego, przeprowadzamy pobudzając kolejno wszystkie wibrysy i uśredniając wywoływane przez każdą z nich odpowiedzi (rys. 4a). Uzyskana mapa odpowiedzi jest charakterystyczna dla danej lokalizacji elektrody, a w przypadku doświadczeń chronicznych (przy stałej lokalizacji elektrody) nie zmienia się w sposób jakościowy w trakcie eksperymentu.

Elektroda umieszczona w obrębie pola baryłkowego rejestruje aktywność wywołaną stymulacją praktycznie wszystkich wibrys (rys. 4a). Potencjały wywołane w sąsiednich kolumnach po-ruszeniu tego samego wąsa mają bardzo podobny kształt (por. C1 i C2 na rys. 4a). Jak wspomniano wyżej, pobudzenie ze wzgórza dociera najpierw do komórek ziarnistych warstwy IV (baryłki) po czym przenosi się na komórki piramidowe warstw powierzchniowych i głębokich w kolumnie centralnej, a następnie jest przekazywane do kolumn sąsiednich również poprzez komórki piramidowe (rys. 2). Pobudzenie kolumn sąsiednich pomija zatem komórki ziarniste w baryłce, a mimo to

rejestrowanych na różnych głębokościach w korze. Trzecią i najistotniejszą osią jest dla nas czas trwania doświadczenia porównując rejestrowane kolejno po sobie potencjały możemy śledzić dynamikę procesów zachodzących w korze mózgu aktywnego, normalnie reagującego zwierzęcia.

potencjał wywołany ma przebieg podobny jak w kolumnie centralnej. Wynik ten potwierdza teoretyczne przypuszczenie, że aktywność komórek ziarnistych nie ma dużego znaczenia dla zsumowanej aktywności EEG. Na podstawie analizy potencjałów wywołanych wnioskujemy więc głównie o aktywności komórek piramidowych. W korze mózgowej są dwie populacje komórek piramidowych: w warstwach I-III i w warstwach V-VI. Komórki piramidowe leżące powyżej warstwy IV (zawierającej komórki ziarniste; ang. granular cells) nazywamy komórkami supragranularnymi, natomiast te położone poniżej komórek ziarnistych nazywamy komórkami infragranularnymi.

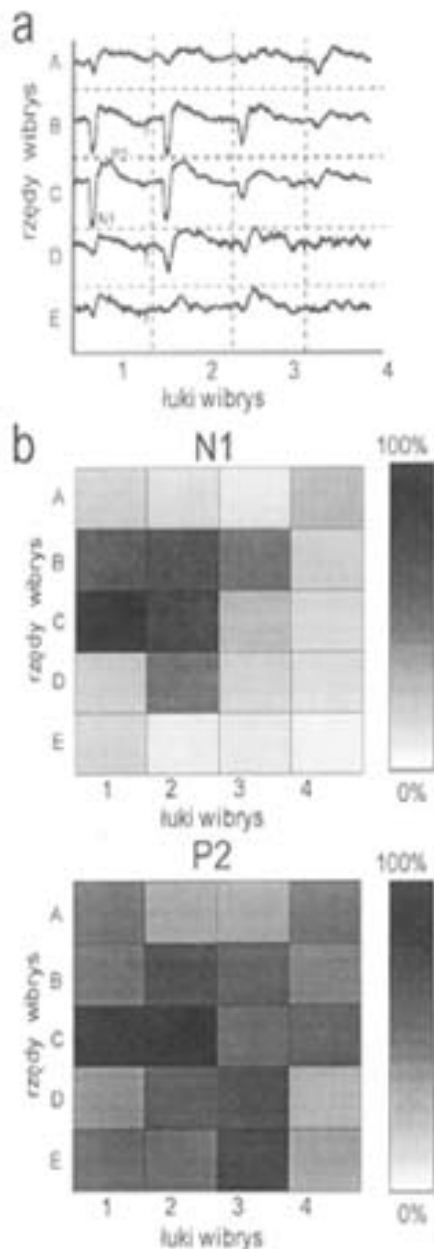
Jak wspomnieliśmy, poruszenie każdej z wibrys wywołuje w korze baryłkowej aktywność rozprzestrzeniającą się do miejsca, w którym znajduje się elektroda. Im dalej od elektrody znajduje się baryłka centralna, tym mniejsza jest amplituda rejestrowanego potencjału. Sprawdziliśmy dokładnie, jaki jest rozkład przestrzenny amplitud obu głównych składowych potencjału (N 1 i P2). Prostokątne pola na rysunku 4b odpowiadają, zgodnie z oznaczeniami, odpowiedziom rejestrowanym przez elektrodę po drażnieniu poszczególnych wąsów na pyszczku. Stopień zacięniowania danego pola jest proporcjonalny do względnej wartości amplitudy fali N 1 lub P2 (liczonej jako stosunek amplitudy odpowiedzi na stymulację danej wibrysy do amplitudy maksymalnej, odpowiadającej wibrysie centralnej). Względna (znormalizowana) amplituda fali Ni ma dobrze zlokalizowaną wartość maksymalną i dość szybko maleje wraz z odległością. Najprawdopodobniej składowa ta jest związana z pobudzeniem kolumny centralnej —odpowiadającej stymulowanej wibrysie. Jej niezerowa wartość w kolumnach sąsiednich (należy pamiętać, że miejsce rejestracji jest „sąsied-

nie” przy pobudzeniu wibrys innych niż wyznaczona przez mapę wibrysa centralna) wynika najprawdopodobniej z tego, że elektroda rejestrowała również pole elektryczne wytwarzane przez elementy sąsiednich kolumn. Mimo że amplituda fali P2 jest mniejsza niż amplituda N1, to jej przestrzenny zasięg jest znacznie większy. Gdyby rejestrowane EP zawierały tylko bierną komponentą elektrotoniczną, to pole o małej wartości początkowej (centralnej) musiałyby mieć

proporcjonalnie równie mały zasięg. Przedstawione doświadczenie sugeruje istnienie aktywnego — neuronalnego mechanizmu rozchodzenia się fali P2 w polu baryłkowym. Dzięki niemu możemy przypisać tą falę pobudzeniu sąsiednich baryłek i dalszych obszarów kory. Dodatkowym argumentem potwierdzającym tę hipotezę jest fakt, że w potencjałach wywołanych, uzyskiwanych na uśpionych szczurach, fala P2 jest znikoma lub wcale jej nie widać. Pod wpływem narkozy stłumione zostają bowiem procesy związane z aktywnym rozprzestrzenianiem się i przetwarzaniem informacji w korze.

#### REJESTRACJA ODPOWIEDZI NA RÓŻNYCH POZIOMACH KORY

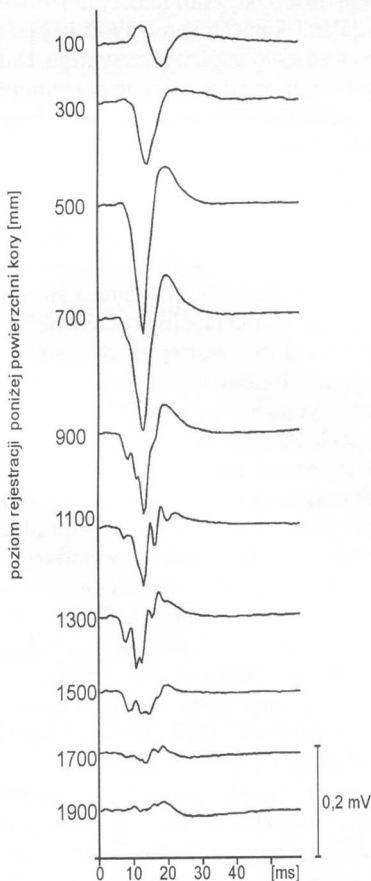
Dodatkowych informacji o aktywności elektrycznej w korze baryłkowej może dostarczyć rejestracja z różnych głębokości kory baryłkowej. Na rysunku 5 jest przedstawiony przykładowy wynik wielopoziomowej rejestracji potencjałów wywołanych, uzyskanych dzięki zastosowaniu elektrody przesuwanej w głąb kory podczas doświadczenia „ostrego” na uśpionym zwierzęciu. Widać, że w kolejnych warstwach poszczególne składowe występują z różną amplitudą i latencją. Elektroda znajdująca się w pobliżu populacji neuronów różnych warstw, a nawet różnych elementów komórkowych (takich jak ciała komórkowe lub przebiegające



Rys. 4. a — przykładowa mapa odpowiedzi wywołanych w korze baryłkowej szczura. Każdy potencjał stanowi średnią z 16 odpowiedzi na poruszenie pojedynczej wibrysy (rząd i numer wibrysy zaznaczone na osiach). W tym przypadku elektroda rejestrująca została zaimplantowana w pobliżu baryłki C1 — wibrysa C1 daje najsilniejszą odpowiedź (jest to więc wibrysa centralna). Poruszenie wibrysy sąsiednich również wzbudza aktywność rejestrowaną przez elektrodę, ale amplituda potencjału maleje wraz z odległością od wibrysy centralnej. Rozkład względnych amplitud głównych składowych dokładniej ilustruje dolna część rysunku (b). b — wyżej składowa N1, niżej składowa P2. Każdy mały prostokąt odpowiada amplitudzie odpowiedniego potencjału z górnej części rysunku. Wartości maksymalne amplitud obu składowych uzyskanych dla wibrysy centralnej (C1) uznaliśmy za 100% i oznaczyliśmy kolorem czarnym. Z kolei poziomy szarości w pozostałych prostokątach wyraża proporcję amplitudy składowej dla danej wibrysy w stosunku do amplitudy maksymalnej. Fala N1 rozchodzi się jedynie do baryłek bezpośrednio sąsiadujących z centralną. Składowa P2 rozprzestrzenia się po polu baryłkowym na znacznie dalsze odległości.

pionowo w korze szczytowe dendryty komórek piramidowych), odbiera aktywność o różnym przebiegu czasowym i zróżnicowanej amplitudzie. Pobudzenie tej samej grupy neuronów może być rejestrowane w postaci fal o różnej polaryzacji, w zależności od tego, czy wywołany nim przepływ jonów odbywa się w kierunku do elektrody, czy w kierunku od niej (por. artykuł A. Wróbla w tym tomie Kosmosu). Za pomocą tak zwanej analizy gęstości źródłowej prądu (CSD, ang. current source density analysis) na podstawie kształtu EP na różnych głębokościach kory można określić miejsca będące źródłem jonów i miejsca będące celem ich wędrówki (tzw. zlewki). Z takich danych możemy z kolei wnioskować, jakie elementy sieci neuronalnej są w danej chwili pobudzone.

Metodą CSD z powodzeniem stosowali Di i współaut. (1990) również do badania kory baryłkowej szczura. Do wyników CSD zastosowali



Rys. 5. Potencjały wywołane rejestrowane na różnych głębokościach w korze baryłkowej (górze rysunku odpowiada powierzchni, zaś dół podstawie kory).

W zależności od poziomu, na którym znajduje się elektroda, poszczególne składowe potencjału mogą mieć różną polaryzację i latencję. Analiza tych różnic pozwala na wyciąganie wniosków o przepływie pobudzenia w korze.

dotatkowo analizę składowych głównych (PCA

ang. principal component analysis), dzięki której udało im się wyróżnić w kształcie EP dwie niezależne składowe. Rozpoczęły się one w tym samym momencie, jednakże maksimum drugiej składowej następowało 4 ms po maksimum pierwszej z nich. Di i współautorzy zinterpretowali te dwa niezależne źródła prądu jonowego jako pochodzące od dwóch populacji komórek piramidowych. Pierwsza składowa reprezentuje aktywność komórek supragranularnych, druga – infragranularnych.

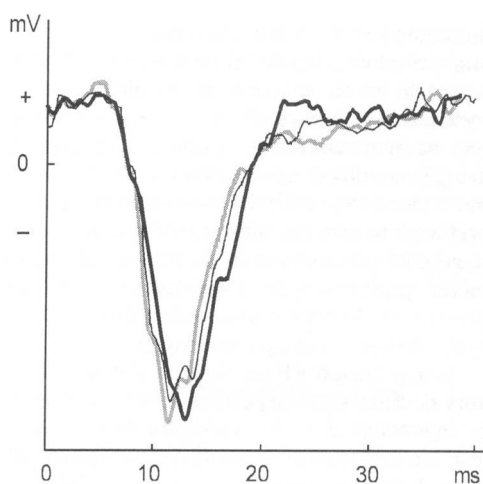
Różny kształt EP na różnych głębokościach kory dowodzi wysokiej czułości metody. Niestety rejestracja z wielu poziomów jednocześnie jest bardzo trudna. Wielokanałowe elektrody mają zbyt duże rozmiary i mogą niszczyć tkankę kory mózgowej. Przedstawione wyżej rozwiązanie wymaga długiego czasu badania i uśredniania kolejnych EP na różnych głębokościach kory. Metodę tę stosuje się więc głównie na uspionym zwierzęciu, w którym potencjały te nie zmieniają się zasadniczo w czasie doświadczenia.

#### ANALIZA KSZTAŁTU POTENCJAŁU

W celu wyznaczenia składowych głównych EP w doświadczeniach na nie uspionym zwierzęciu zastosowaliśmy inny wariant metody PCA. Zamiast zmienności uśrednionych potencjałów w domenie przestrzennej (to znaczy na różnych głębokościach) wykorzystaliśmy rozrzut kształtu pojedynczych potencjałów zarejestrowanych kolejno w różnym czasie, ale w tym samym położeniu elektrody. Podejście to pozwoliło nam wydzielić z EP dwie składowe, zgodne z wynikami Di i współautorów.

Kształt fali N1 nie jest gładki. Można w nim wyróżnić dwa subkomponenty widoczne jako niezależne szczyty oddalone od siebie o około 2 ms (rys. 3 i 6). W celu przypisania tych składowych odpowiednim elementom neuronalnym wykonaliśmy inne doświadczenie, w którym przejściowo schłodziliśmy powierzchniowe warstwy kory baryłkowej, wyłączając tym samym aktywność znajdujących się w nich neuronów. Procedura ta nie wpłynęła na całkowitą amplitudę EP. Nastąpiło natomiast wyraźne spłycenie pierwszego subkomponentu N1, zaś drugi nie tylko nie zmalał, lecz nawet uległ nieznacznej wzmożeniu (rys. 6; KUBLIK i współaut. 1997). Doświadczenie to pozwala wnioskować, że fala N1 rzeczywiście reprezentuje aktywność dwóch niezależnych populacji komórek piramidowych:

z pierwszym subkomponentem wynikającym z pobudzenia komórek supragranularnych (ulegających dezaktywacji pod wpływem powie-



Rys. 6. Za pośrednictwem srebrnej płytki, umieszczonej na powierzchni kory baryłkowej uśpionego szczura, schłodzono górne warstwy kory.

Zablokowano tym samym aktywność znajdujących się tam komórek. Szarą linią narysowany został potencjał uśredniony z odpowiedzi wywołanych w korze baryłkowej przed chłodzeniem. Impulsowe ochłodzenie kory wywołuje natychmiastowe obniżenie amplitudy pierwszego subkomponentu fali N1 (czarna linia), który po kilkudziesięciu sekundach, wraz z ogrzaniem się kory, wraca do normy (cienka linia).

rzchniowego chłodzenia) i drugim — z pobudzenia komórek infragranularnych (do których fala zimna nie dociera i nie zmienia ich aktywności).

Kolejne fale potencjału wywołanego odzwierciedlają zatem następujące etapy przepływu informacji w korze baryłkowej szczura: P1 to fala o małej amplitudzie wynikająca z pobudzenia włókien wzgórzowo-korowych (aug. incoming volley). Fala N1 ilustruje pobudzenie komórek piramidowych w kolumnie centralnej. Subkomponent pierwszy jest związany z komórkami warstw powierzchniowych, subkomponent drugi wynika z pobudzenia komórek w głębszych warstwach kory. P2 rozprzestrzenia się po prawie całym polu baryłkowym, odzwierciedlając pobudzenie kolumn sąsiednich i być może dalszych rejonów kory.

#### PRZETWARZANIE INFORMACJI CZUCIOWEJ W KORZE BARYŁKOWEJ

Analiza kształtu potencjałów wywołanych jest jednym z narzędzi do badania funkcji mózgu — tego, w jaki sposób układ nerwowy odbiera i analizuje informacje docierające ze środowiska. W doświadczeniach prowadzonych w naszym laboratorium obserwujemy zmiany stanu aktywności kory mózgu nie uśpionego szczura wynikające z modyfikacji bodźców sensorycznych.

Sesja doświadczalna to 100 stymulacji wy-

branej wibrasy. Całe doświadczenie składa się z wielu takich sesji, powtarzanych w kolejnych dniach. Po okresie przyzwyczajania (habitacji) zwierzęcia do sytuacji doświadczalnej, w kolejnej sesji o każdorazowej stymulacji wibrasy, wprowadzamy dodatkowy bodziec awersyjny (w postaci łagodnego szoku elektrycznego na skórze ucha po tej samej stronie ciała, co drażniony wąs).

Analizie poddajemy wszystkie kolejno zarejestrowane potencjały wywołane. W ciągu pierwszych dni amplituda i kształt odpowiedzi ulegają stabilizacji i utrzymują się na kontrolnym poziomie. Natomiast wprowadzenie awersyjnego bodźca powoduje wyraźny wzrost amplitudy potencjałów. Zmiana dotyczy obu głównych fal (N1 30 ms i P2), przy czym N1 wraca do poziomu kontrolnego szybciej (w czasie jednej sesji) niż P2 (w czasie dwu sesji; Musiał i współaut. 1997).

Dokładna analiza pozwala dostrzec również subtelne różnice kształtu między uśrednionymi potencjałami kontrolnymi, a tymi uzyskanymi po wprowadzeniu bodźca awersyjnego. Dotyczą one proporcji między subkomponentami fali N1. Na podstawie różnicy środkowego fragmentu fali N1 możemy podzielić wszystkie pojedyncze potencjały na dwie klasy: pierwsza z nich charakteryzuje się przewagą pierwszego subkomponentu, w klasie drugiej relacja między nimi jest odwrotna (rys. 7).

W trakcie doświadczenia zmieniała się częstość występowania obu klas potencjałów. Klasa pierwsza dużo częściej pojawia się w tych sytuacjach behawioralnych, do których szczur jest przyzwyczajony (po kilku kolejnych sesjach habituacji). Po wprowadzeniu nowego bodźca notuje się wzrost częstości pojawiania się potencjałów klasy drugiej. W przypadku, gdy jest to nieprzyjemny bodziec awersyjny (prąd) zmiana ta jest natychmiastowa i wyjątkowo znamienna (rys. 7), nie trwa jednak długo (WRÓBEL i współaut. 1995). Proporcja pomiędzy dwiema klasami potencjałów ulega ponownej habituacji już w następnej sesji pomimo ciągłego wzmacniania stymulacji wąsa bodźcem prądowym (KUBLIK I współaut. 1997, MUSIAŁ i współaut. 1997, WRÓBEL i współaut. 1997).

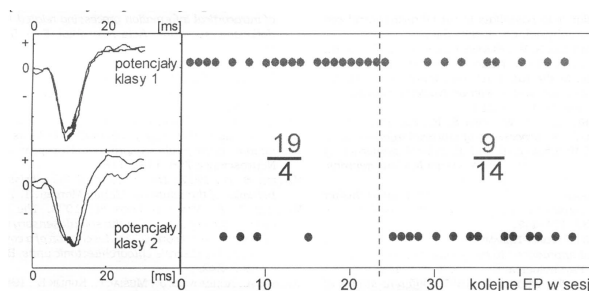
Uzyskane wyniki pokazują, że potencjały wywołane w korze baryłkowej nie uśpionego zwierzęcia nie są jednorodne i niezmiennie. Ich amplituda i kształt zmieniają się w zależności od sytuacji w jakiej znajduje się zwierzę. Ponieważ potencjały wywołane ilustrują aktywności badanej tkanki, oznacza to, że kora baryłkowa w różny sposób reaguje na bodźce w różnych sytuacjach (w opisanym doświadczeniu kontekst był zmieniany wzmocnieniem awersyj-



nym). Pierwszorzędowa kora czuciowa nie jest więc jedynie stacją przekaźnikową między receptorami drogi czuciowej a asocjacyjnymi polami kory. Opisane doświadczenie dowodzi, że może ona regulować ilość przepływającej przez nią informacji.

Po kilku sesjach habituacyjnych (w których wielokrotnie stymulowano ten sam wąs) w korze baryłkowej rejestruje się głównie potencjały klasy 1. Średnia amplituda potencjału stabilizuje się na poziomie kontrolnym a pierwszy subkomponent fali N1 jest większy od drugiego. Wnioskujemy z tego, że pobudzenie nie jest przekazywane poza komórki warstw I-III kory baryłkowej. Z chwilą wprowadzenia bodźca awersyjnego komórki kory czuciowej są dodatkowo aktywowane układami wzbudzającymi, dzięki czemu pobudzenie zostaje przesłane do komórek infragranularnych i dalej do sąsiednich baryłek oraz innych okolic korowych. Zwiększone pobudzenie infragranularnych komórek piramidowych powoduje powiększenie drugiego subkomponentu fali N1 (2 klasa potencjałów). Większa liczba pobudzonych komórek kolumny centralnej uwidacznia się we wzroście całkowitej amplitudy fali N1, natomiast większe pobudzenie baryłek sąsiednich powoduje obserwowany wzrost fali P2.

Nie wyjaśniony pozostaje na razie mechanizm regulujący wzbudzenie kory pod wpływem nowych (up. awersyjnych) bodźców. Najprawdopodobniej jest to wynik działania układów modulujących z pnia mózgu (układ noradrenergiczny lub/i cholinergiczny). Istnieją dane (SARA i współaut. 1995, VANKOV i współaut. 1995) pokazujące, że komórki w jądrze miejsca sinawego (LC, ang. locus coeruleus) reagują nasileniem aktywności na pojawienie się wszelkich nowych bodźców w otoczeniu zwierzęcia. Prowadzi to do zwiększonego wydzielania noradrenaliny w korze i w konsekwencji do pobudzenia jej komórek i zwiększonego przepływu informacji do asocjacyjnych obszarów kory.



Rys. 7. Wyniki sesji doświadczalnej, w czasie której stymulacją wibrysy wzmocniono bodźcem awersyjnym.

Na wykresie zaznaczono punktami przynależności kolejnych potencjałów wywołanych, rejestrowanych w korze baryłkowej, do jednej z dwóch klas wyróżnionych na podstawie proporcji subkomponent fali N1. Przerwana linia oznacza moment, w którym rozpoczęto wzmacnianie każdej stymulacji wibrysy bodźcem awersyjnym. Widać wyraźnie różnicę częstości występowania obu klas potencjałów w sytuacji kontrolnej i po wprowadzeniu nowego bodźca (dane liczbowe wpisane w środku rysunku). Po lewej stronie przedstawiono uśrednione potencjały klasy 1 i klasy 2. Grubszą linią podkreślono te fragmenty, którymi różnią się oba typy potencjałów.

## PODSUMOWANIE

Rejestrowane w korze potencjały wywołane przez bodźce czuciowe odzwierciedlają zsumowaną aktywność wielu tysięcy komórek. Fakt ten stanowi o zalecie tej metody: umożliwia ona wgląd w aktywność dużej sieci neuronów (takiej jak jedna lub wiele kolumn w polu baryłkowym) w mózgu nie uspiętego, normalnie reagującego zwierzęcia. Daje możliwość śledzenia zachowania tej samej sieci w zmieniających się warunkach środowiska. Metoda ta, mimo że pozornie nieprecyzyjna, pozwala wyciągnąć bardzo precyzyjne wnioski o przepływie informacji, w pierwszorzędowej korze czuciowej. Obserwacja zmian poszczególnych komponent potencjałów wywołanych umożliwia wnioskowanie o funkcjonalnych zmianach w sieci kory pierwszorzędowej przekazującej informację o bodźcu czuciowym. Informacja ta może być aktywnie przekazywana

do dalszych obszarów korowych lub stłumiona na poziomie warstw supragranularnych. Wybór

strategii zależy od istotności (kontekstu znaczeniowego) analizowanego bodźca.

## STUDIES ON SENSORY SYSTEMS BY THE EVOKED POTENTIALS METHOD

### Summary

This article presents results of electrophysiological experiments on the rat vibrissa/barrel system. Experiments on single cell and evoked potentials (EP) recorded from the cortex of anaesthetized and chronic rats are reviewed. The barrel cortex of unanaesthetized, behaving rat seems to handle sensory information from vibrissae in two different ways, revealed by two different types (shapes) of evoked potentials. A contextually important sensation is trans-

mitted to the neighboring cortical areas, which is manifested by "active" type of EP with increased subcomponent of infragranular pyramidal cell activity. Continuous repetition of the same stimulation decreases its behavioral significance and the information is dumped at the level of supragranular pirainidal cells ("habituated" type of EP).

## LITERATURA

- ARMSTRONG-JAMES M., 1995. *The nature and plasticity of sensory processing within adult rat barrel cortex*. LW:] JONES E. G., DIAMOND I. D. (red.) *Cerebral Cortex*. Plenum Press, New York and London 11, 333-373.
- DIAMOND M. E., 1995. *Somatosensory thalamus of the rat*. [WI E. G. JONES, I. T. DIAMOND (red.) *Cerebral Cortex*. Plenum Press, New York and London ii, 189-219.
- DI S., BAUMGARTNER C., BARTH D., 1990. *Laminar analysis of extracellular field potentials in rat vibrissa/barrel cortex*. *J. Neurophysiol.* 63, 4. 832—840.
- CHIAIA N. L., RHOADES R. W., BENNET-CLARKE C. A., FISH S. E., KILLACKEY H. P., 199 1a. *Thalamic processing of vibrissal information in the rat: I. Afferent input to the Medial Ventral Posterior and Posterior Nucleus neurons*. *J. Comp. Neurol.* 314, 201-216.
- CHLAIA N. L., RHOADES R. W., FISH S. E., KILLACKEY H. P., 199 1b. *Thalamic processing of vibrissal information in the rat: II. Morphological and functional properties of Medial Ventral Posterior and Posterior Nucleus neurons*. *J. Comp. Neurol.* 314, 217-236.
- DURHAM D., WOOLSEY T. A., 1984. *Effects of neonatal whisker lesion on mouse central trigeminal pathways*. *J. Comp. Neurol.* 233, 424-447.
- GUSTAFSON J. W., FELBAIN-KERAMIDAS S. L., 1977. *Behavioral and neural approaches to the function of the mystacial vibrissae*. *Psychological Bulletin.* 3, 471—488.
- KUBLIK E., MUSIAŁ P., WRÓBEL A., 1997. *Different stages of cortical processing revealed by subcomponents of evoked potentials*. *Exp. Brain Res.* 117(suppl.), 33.
- KUBLIK E., MUSIAŁ P., WRÓBEL A., 1997. *Changes of evoked potentials induced in the somatosensory cortex by cooling*. *Acta Neurobiol. Exp.* 57(suppl.), 65.
- MA P. M., WOOLSEY T. A., 1984. *Cytoarchitectonic correlates of the vibrissae in the medullary trigeminal complex of the mouse*. *Brain Res.* 306, 374—379.
- Mi P. M., 1991. *The barrel cortex architectonic vibrissal representations in the Brainstem Trigeminal Complex of the mouse. I. Normal structural organization*. *J. Comp. Neurol.* 309, 161—199.
- MUSIAŁ P., KUBLIK E., PANECKI S. J., WRÓBEL A., 1997. *Transient changes of activity in the rat barrel cortex during conditioning*. *Brain Res.*, w druku.
- MUSIAŁ P., KUBLIK E., WRÓBEL A., 1997. *Immediate changes of intracortical information processing related to the conditioning procedure*. *Acta Neurobiol. Exp.* 57 suppl.) 65.
- SARA S. J., DYON-LAURENT C., HERVE A., 1995. *Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system*. *Cognitive Brain Research.* 2, 18 1-187.
- VANKOV A., HERVE-MINVIELLE A., SARA S. J., 1995. *Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely-exploring rat*. *European Journal of Neuroscience* 7; 6, 1180—1187.
- VINCENT S. B., 1912. *The function of the vibrissae in the behavior of the white rat*. *Behav. Monogr.* 1, 7—85.
- WOOLSEY T. A., VAR DER LOOS H., 1970. *The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units*. *Brain Res.* 17, 205-242.
- WRÓBEL A., ACHIMOWICZ J., MUSIAŁ P., KUBLIK E., 1995. *Rapid phase shift of evoked potentials in barrel cortex accompanies conditioning*. *Acta Neurobiol. Exp.* 55, 147.
- WRÓBEL A., KUBLIK E., MUSIAŁ P., 1997. *Gating of the sensory activity within barrel cortex of the awake rat*. *Exp. Brain Res.*, w druku.

