

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Neurovědy



**MUDr. Martin Salaj**

**Srovnání inhibičního korového systému v přechodných  
neo – allokortikálních oblastech.**

**Comparison of the inhibitory cortical system in the transitory  
neo-allocortical regions**

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Rastislav Druga, DrSc.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.5.2016

MUDr. Martin Salaj

Identifikační záznam:

SALAJ, Martin. *Srovnání inhibičního korového systému v přechodných neo – allocortikálních oblastech. [Comparison of the inhibitory cortical system in the transitory neo-allocortical regions]*. Praha, 2016. 63 stran, 12 obrázků, 2 tabulky, 2 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Anatomický Ústav, 2016. Vedoucí práce Druga, Rastislav.

## Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Prof. MUDr. Rastislavu Drugovi, DrSc., za soustavnou a všestrannou podporu, trpělivost, důležité rady a četné konzultace v průběhu celého postgraduálního studia.

Mé poděkování dále patří pracovníkům Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR, zejména Doc. Pharm.Dr. Haně Kubové, DrSc., za cenné rady při přípravě a provádění imunohistochemických reakcí a za umožnění zpracování experimentálního materiálu v laboratoři oddělení. Zvláštní dík patří paní Blance Čejkové za technickou asistenci při přípravě a zpracování materiálu imunohistochemickými metodami.

Dále chci poděkovat MUDr. Filipovi Barinkovi, PhD. za pomoc při stereologické analýze a při přípravě společných publikací. Můj dík rovněž patří ostatním spoluautorům společných publikací, MUDr. Janu Rybářovi, MUDr. Jiřímu Czermanovi a Ing. Evě Krajčovičové.

Moje práce byla podpořena Grantovou agenturou Karlovy University (Grant č. 35407) které tímto děkuji za podporu.

Za trpělivost, pochopení a podporu po celou dobu mého studia zasluhuje zvláštní poděkování moje rodina.

## Abstrakt

**Cíle.** Naší hlavním cílem bylo popsat interneuronální populace exprimující kalcium vázící proteiny (calcium binding proteins – CaBP) calretinin (CR) a parvalbumin (PV) v perirhinální (PRC) a retrosplenální (RSC) kůře potkana. Tyto dvě oblasti tvoří přechod mezi neokortexem a hippokampální formací a nápadně se odlišují svým zapojením a funkcí, což by mohlo být podmíněno odlišnou strukturou interneuronální populace. Znalosti o přesném složení neuronální populace v jakékoli mozkové oblasti jsou nezbytným předpokladem pro modelování neuronálních sítí a pro pochopení různých patologických jevů, jako je například tvorba a šíření epileptické aktivity.

**Metody.** Pro účely této studie jsme použili mozky osmi potkanů kmene Wistar o stáří 3 měsíce. Mozky byli nakrájeny na řezy tlusté 50  $\mu\text{m}$  obarveny kresylvioletí podle Nissla, na CR a na PV. Následně jsme provedli kvalitativní a kvantitativní analýzu za použití stereologických a denzitometrických metod. Získané výsledky jsme pak statisticky vyhodnotili.

**Výsledky.** PRC obsahuje absolutně i relativně větší hustoty CR+ a PV+ neuronů než RSC. Na druhou stranu je poměr CR : PV vyšší v RSC a je podobný hodnotám v neokortexu. Nejčastějším typem neuronů CR+ populaci jsou vertikálně orientované bipolární /„bitufted“ neurony, zatímco většina PV+ populace vykazuje multipolární morfologii.

**Závěry.** V předložené studii jsme popsali imunoreaktivitu CaBP, hustotu CR+ a PV+ neuronů jako i celkovou neuronální hustotu v perirhinální a retrosplenální kůře potkana. Dosažené výsledky ukazují, že hlavním rozdílem mezi oběma analyzovanými oblastmi je hustota CR+ neuronů, která je výrazně vyšší v PRC. Naše výsledky spolu s pracemi jiných autorů naznačují, že jsou zde výrazné rozdíly ve složení a distribuci interneuronálních populací v dotud podle všeho stejných korových oblastech. Tyto výsledky by mohli napomoci k lepšímu pochopení mechanismu funkce těchto korových oblastí za normálních a patologických stavů.

## Abstract

**Aims.** The main aim was to describe interneuronal population expressing calcium binding proteins calretinin (CR) and parvalbumin (PV) in the perirhinal (PRC) and retrosplenial (RSC) cortex of the rat. These two cortical areas differ strikingly in their connectivity and function, which could be caused also by different structure of the interneuronal populations. Having a precise knowledge of the cellular composition of any cerebral area forms one of the basic input parameters and tenets for computational modeling of neuronal networks and for understanding some pathological conditions, like generating and spreading of epileptic activity.

**Methods.** The brains of 8 male 3-month-old Wistar rats were used in this study. The brains were cut into 50  $\mu\text{m}$  thick coronal section and these were stained for NISSL (cresyl violet), and immunostained for CR and PV. The qualitative and quantitative analysis was performed on these sections, using stereological and densitometric approach. All data acquired were statistically evaluated.

**Results.** PRC possesses higher absolute and relative densities of CR<sup>+</sup> and PV<sup>+</sup> neurons than RSC, but the CR : PV ratio is higher in the RSC, which is similar to the neocortex. The bipolar/bitufted neurons are most common type of CR<sup>+</sup> population, while the majority of PV<sup>+</sup> neurons show multipolar morphology.

**Conclusion.** In presented study we described the pattern of CaBP immunoreactivity, the density of CR<sup>+</sup> and PV<sup>+</sup> neurons as well as the overall neuronal density in perirhinal and retrosplenial cortex of the rat brain. Current results indicate that main difference between analyzed areas is in density of CR<sup>+</sup> neurons, which was significantly higher in the PRC. Our results coupled with works of other authors show that there are significant differences in the interneuronal composition and distribution of heretofore seemingly similar transitional cortical areas. These results may contribute to the better understanding of the mechanism of function of this cortical region in normal and diseased states.

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Interneurony</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Perirhinální kůra</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1. Uložení a cytoarchitektonika perirhinální korové oblasti</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2. Spoje perirhinální korové oblasti</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2.1. Area 35</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2.2. Area 36</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Retrosplenální kůra</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1. Uložení a cytoarchitektonika retrosplenální korové oblasti</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2. Spoje retrosplenální korové oblasti</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2.1. Area 29a, b</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2.2. Area 29c</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2.3. Area 30</b>	<b>19</b>
<b>2. OTÁZKY A CÍLE PRÁCE</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Pokusná zvířata</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Příprava materiálu</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Imunochemické barvení</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Ohraničení korových oblastí a vrstev</b>	<b>23</b>
<b>3.5. Kvalitativní analýza</b>	<b>24</b>
<b>3.6. Kvantitativní analýza</b>	<b>25</b>
<b>3.6.1. Denzitometrické hodnocení</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2. Stereologická analýza</b>	<b>26</b>
<b>3.6.3. Statistické hodnocení</b>	<b>28</b>
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Obecná charakteristika imunoreaktivity calretininu a parvalbuminu</b>	<b>29</b>
<b>4.1.1. Calretinin v PRC</b>	<b>29</b>
<b>4.1.2. Calretinin v RSC</b>	<b>30</b>
<b>4.1.3. Parvalbumin v PRC</b>	<b>31</b>
<b>4.1.4. Parvalbumin v RSC</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Neuronální morfologie</b>	<b>32</b>
<b>4.2.1. Morfologie neuronů v PRC</b>	<b>32</b>

4.2.1.1. Calretinin	33
4.2.1.2. Parvalbumin	33
4.2.2. Morfologie neuronů v RSC	34
4.2.2.1. Calretinin	34
4.2.2.2. Parvalbumin	35
4.3. Denzitometrická analýza calretininové a parvalbuminové imunoreaktivity	36
4.3.1 Denzitometrie v PRC	36
4.3.2. Denzitometrie v RSC	36
4.4. Kvantitativní analýza hustoty imunoreaktivních neuronů	36
4.4.1. Hustoty CR+ a PV+ neuronů	36
4.4.1.1. Hustoty CR+ a PV+ neuronů v PRC	37
4.4.1.1.1. Calretinin	37
4.4.1.1.2. Parvalbumin	37
4.4.1.2. Hustoty CR+ a PV+ neuronů v RSC	37
4.4.1.2.1. Calretinin	37
4.4.1.2.2. Parvalbumin	38
4.4.2. Celková neuronální hustota a procenta CR+ a PV+ neuronů z celkové neuronální hustoty	38
4.4.2.1. Celková neuronální denzita v PRC	38
4.4.2.1.1. Calretinin	38
4.4.2.1.2. Parvalbumin	38
4.4.2.2. Celková neuronální denzita v RSC	39
4.4.2.2.1. Calretinin	39
4.4.2.2.2. Parvalbumin	39
5. DISKUZE	41
5.1. Začlenění obou typů neuronů do korových okruhů	41
5.2. Funkce PRC	43
5.3. Funkce RSC	44
6. ZÁVĚR	46
7. OBRÁZKY	47
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
9. PŘÍLOHY	63
9.1. Seznam publikací autora ve vztahu k tématu práce	63



<b>9.2. Seznam ostatních publikací autora</b>	<b>63</b>
<b>9.3. Publikace autora ve vztahu k tématu práce</b>	<b>63</b>

## Seznam použitých zkratk

A (+číslo) – příslušná korová oblast  
ACg - přední cingulární kůra  
AD – anterodorzální jádro thalamu  
AM – anteromediální jádro thalamu  
AmgBA - bazální akcesorní jádro amygdaly  
AmgBL - bazolaterální jádro amygdaly  
AmgBM - bazomediální jádro amygdaly  
AP – anteroposteriorně  
asf – area sampling fraction  
AV – anteroventrální jádro thalamu  
CaBP – kalcium-vážící proteiny  
CB – calbindin  
CE – koeficient chyby  
CGM - corpus geniculatum mediale  
CL - claustrum  
CR – calretinin  
cROD – korigovaná relativní optická denzita  
DAB - 3,3'-diaminobenzidin  
EC – entorhinální kůra  
FrC - frontální kůra  
GABA – kyselina gama amino máselná  
INS - insulární kůra  
LC - locus coeruleus  
LD – laterodorzální jádro thalamu  
NAc - ncl. accumbens  
NRph - ncll. rapheales  
PaC - parietální kůra  
PBS – fosfátový pufr s chloridem sodným  
Pir - piriformní kůra  
PostRH - postrhinální kůra  
PostSUB - postsubikulum  
PRC – perirhinální kůra

Put - putamen

PV – parvalbumin

ROD – relativní optická denzita

ROI – oblast zájmu

RSC – retrosplenální kůra

S.E.M. – směrodatná chyba odhadu průměru

ssf – section sampling fraction

SUB - subikulum

TeC - temporální kůra

tsf – tissue sampling fraction

# 1. Úvod

## 1.1. Interneurony

Mozková kůra savců se skládá ze dvou nesterajně velkých neuronálních populací. Větší z nich tvoří pyramidové neurony, exprimující excitační mediátor glutamát. Jsou to projekční neurony, s dlouhými axony, jejichž funkcí je propojovat kůru s jinými korovými a podkorovými oblastmi CNS. Druhou, menší skupinou (25-30% z celkového počtu neuronů) jsou lokální interneurony. Jsou značně nesourodou skupinou, a liší se morfologií, zapojením, funkcí či expresí různých neuropeptidů. Většinu z nich však tvoří inhibiční, GABA-ergní neurony (Markram et al., 2004). Pro jejich podrobnější popis a klasifikaci se vychází z konvence přijaté v r. 2005 v Petilla de Aragon v rodišti R. y Cajala (Yuste, 2005). Je zřejmé, že klasifikace není konečná a lze očekávat objevy i přesnější definice dalších korových interneuronů (Barinka a Druga, 2009; DeFelipe et al., 1997; Markram et al., 2004). Na podkladě exprese kalcium vázicích proteinů (calcium binding proteins – CaBP) calretininu (CR), parvalbuminu (PV) a calbindinu (CB) je s určitými omezeními možné rozdělit korové GABA-ergní interneurony do tří velkých, vzájemně se nepřekrývajících buněčných populací (del Rio a DeFelipe, 1996; Gabbott a Bacon, 1996; Kawaguchi a Kubota, 1997; Kubota et al., 1994; Toledo-Rodriguez et al., 2004; Toledo-Rodriguez et al., 2005; Zaitsev et al., 2005; Zaitsev et al., 2009). Neurony exprimující calretinin (CR+) a parvalbumin (PV+) tvoří izolované subpopulace, které se nepřekrývají. CR+ a PV+ interneurony se od sebe liší v několika aspektech:

**a) morfologií** – CR+ neurony jsou typicky bipolární nebo „bitufted“, s oválným tělem a vertikálně orientovanými výběžky, zatímco PV+ neurony mají nejčastěji multipolární morfologii.

**b) synaptickým zakončením** - cílovou strukturou PV+ interneuronů jsou obvykle proximální (kmenové) dendrity, buněčná těla, nebo iniciální segmenty axonů pyramidových neuronů. Axony CR+ mají terminace na dendritech okolních neuronů, ale převažují synaptické kontakty na okolních interneuronech.

**c) elektrofyziologickými vlastnostmi** – PV+ interneurony patří do skupiny tzv. „fast spiking“ neuronů. Na proti tomu CR+ interneurony tvoří nehomogenní skupinu tzv. „non-fast spiking“ neuronů.

**d) místem původu** – CR+ neurony mají svůj původ v kaudálním gangliovém hrbolku, zatímco PV+ interneurony migrují do vyvíjející se kůry z mediálního gangliového hrbolku (Barinka a Druga, 2010; Druga, 2009).

Mezi jednotlivými korovými oblastmi (areami) byly popsány významné rozdíly v zastoupení jednotlivých subpopulací inhibičních interneuronů týkající se exprese kalcium vázících proteinů, exprese a koexprese neuropeptidů. V řadě studií byly prokázány i značné mezidruhové rozdíly (Hof et al., 1999). Tyto rozdíly je třeba vzít v úvahu při analýze funkčních charakteristik jednotlivých korových oblastí (areí). Například v lidském mozku byl prokázán velký rozdíl v hustotě CR+ neuronů mezi frontální kůrou na jedné straně a v parietální, okcipitální a temporální kůrou na straně druhé (Barinka et al., 2012 ; Hof et al., 1993).

## **1.2. Perirhinální kůra**

### **1.2.1. Uložení a cytoarchitektonika perirhinální korové oblasti.**

Perirhinální kůra (PRC) je přechodná korová oblast na laterálním povrchu hemisféry potkana, podél kaudální poloviny sulcus rhinalis. Sousedí mediálně s entorhinální korovou oblastí (EC) a kaudálně s postrhinální oblastí (PostRH) (Brodmann, 1909). Pro tyto tři korové oblasti obklopující hippokampální formaci se někdy používá označení „ parahippokampální oblast“.

PRC se dále člení na area 35 (A35) a area 36 (A36). Obě arey mají tvar protáhlých proužků, a jejich dlouhá osa je orientována rostrokaudálním směrem. Jsou situovány do kaudální poloviny sulcus rhinalis, přičemž A35 leží ventrálně od A36. Rostrálněji PRC zabírá spodinu a obě stěny sulcus rhinalis a přilehlou dorsální korovou oblast. Kaudálněji pak už jen spodinu a dorsální stěnu sulcus rhinalis spolu se sousedícím korovým okrskem. Area 35 má charakteristiky agranulární kůry s výraznou V. korovou vrstvou a s velmi slabou, nebo chybějící IV. korovou vrstvou. Naproti tomu A36 má charakteristiky dysgranulárního kortexu s nesouvisle vyvinutou IV. korovou vrstvou. Ve II. vrstvě jsou v A36 patrné ostrůvky tmavě se barvících neuronů. Tato úprava II. vrstvy byla popsána u hlodavců i u primátů (Burwell et al., 1995; Burwell, 2000). Přejít III. vrstvy do V. vrstvy je velmi podobný v obou areách (Witter a Amaral, 2004).

Jak bylo uvedeno, dorsálně od A35 je A36 a ventrálně a kaudálně ji ohraničuje entorhinální kůra. I když jsou obě oblasti PRC více méně rovnoběžné, A35 se může objevit rostrálněji než A36. První vrstva A35 je obvykle silnější než stejná vrstva v A36, ale v I. vrstvě není žádné rozhraní mezi oběma areami (Burwell, 2001). Neurony v II.-III. vrstvě tvoří shluky a v dorzální části A35 mají nižší denzitu, co vytváří úzkou mezeru mezi III. a V.

vrstvou. Tato úprava je zřetelnější v kaudálnějším úseku A35. Pro V. vrstvu jsou charakteristické velké, tmavě se barvící pyramidové neurony srdčitého tvaru. Povrchověji uložené neurony jsou menší a směrem do hloubky se zvětšují. Zároveň se jejich celková velikost kaudálním směrem zmenšuje. Podobné neurony se nalézají i ve ventrálním oddílu A36, ale je jich méně, jsou menší a srdčitý tvar není tak výrazný. VI. vrstva je homogenní, na rozdíl od A36 bez bilaminárního uspořádání (Burwell a Amaral, 1998; Burwell, 2001; Witter a Amaral, 2004).

A36 je dorzálně ohraničena ventrální temporální kůrou (area TeV), ventrálně od ní je A35 a kaudálně postrhinální area. II. a III. vrstva jsou od sebe ve srovnání s A35 více odděleny. II. vrstva se skládá se shluků kulatých nebo polygonálních, světle se barvících, středně velikých buněk, což jí dává nehomogenní vzhled, typický pro A36. Většinou ji tvoří malé tmavé pyramidy promíchané s většími, kulatými buňkami. Celkově jsou však tyto neurony menší ve srovnání se stejnou vrstvou A35. Zastoupení pyramidových neuronů se zvyšuje kaudálním směrem. Buněčná populace ve III. vrstvě je svým tvarem a velikostí podobná té ve II. vrstvě, nicméně jsou tyto neurony rozloženy rovnoměrněji, bez nehomogenního vzhledu II. vrstvy a jejich hustota je nižší. V A36 se nalézají granulózní buňky, ale netvoří samostatnou, souvislou vrstvu, spíše se zdá, že IV. vrstva splynula s V. vrstvou. Tuto tvoří středně velké, tmavě se barvící pyramidové neurony bez specifické orientace. Kaudálním směrem se postupně zmenšují, silněji se barví a ztrácejí pyramidový tvar. VI. vrstva je silná a má typické, bilaminární uspořádání, a je tak zřetelně odlišená od dorzálně uložené temporální kůry a ventrálně ležící A35. Zevní podvrstva je hustotou neuronů a jejich zbarvením podobná V. vrstvě. Vnitřní podvrstva obsahuje oploštěné neurony orientované paralelně s povrchem capsula externa. Právě toto uspořádání VI. vrstvy spolu se nehomogenním vzhledem II. vrstvy jsou typickými znaky A36, které umožňují její bezpečnou identifikaci (obr. 4) (Burwell a Amaral, 1998; Burwell, 2001; Witter a Amaral, 2004).

### **1.2.2. Spojení perirhinální korové oblasti.**

Přehledné zobrazení nejdůležitějších spojů PRC je na obr. 10.

#### **1.2.2.1. Area 35**

Korové projekce do A35 tvoří přibližně polovinu z celkové aferentace do této arey. Nejpočetnější jsou projekce z insulární a piriformní kůry. Každý z nich představuje jednu třetinu korových vstupů (Burwell a Amaral, 1998a). Tyto projekce končí v povrchových

vrstvách A35. Silná projekce je rovněž z laterální entorhinální kůry, s preferenčním zakončením v I. a V. vrstvě. Dalším významným zdrojem je A36, zejména její ventrální oddíl. Axony vystupují z II., III. a z hluboké zóny VI. vrstvy a končí ve všech vrstvách A35. Středně silné vstupy do všech korových vrstev přicházejí z postrhinální kůry, ze subikula (jenom do V. a VI. vrstvy) a z CA1 pole hippocampu. Slabší aferentace pak přichází z frontální, temporální, parietální a okcipitální kůry. Z podkorových aferentů je významné spojení s amygdalou. Zejména její ncl. basalis lateralis a ncl. basalis accesorius vydávají silné projekce do I.-V. vrstvy A35. Důležitý je i vstup z čichové kůry a ncl. endopiriformis a z claustra. Thalamické přívody pocházejí z AM jádra a ncl. reuniens. Striatum a hypothalamus mají jenom slabé projekce do A35.

Nejsilnější eferentace z A35 směřuje rostrálně, do většiny oblastí insulární kůry a do primární motorické a doplňkové motorické oblasti frontální kůry. Početné projekce do laterální entorhinální kůry vystupují hlavně z II.-III. vrstvy, s menším příspěvkem V. a VI. vrstvy, zatímco vlákna pro A36 mají svůj původ v II. a VI. vrstvě. Silná projekce směřuje do subikula a mnohem slabší do CA1 pole hippocampu. Postrhinální kůra dostává středně silnou projekci z kaudálního oddílu A35, z II. a VI. vrstvy. Podkorová eferentace z A35 je poměrně slabá. Výjimku tvoří velmi silná projekce do bazálních ganglií, zejména ncl. accumbens. Slabší spojení je s amygdalou, eferentní vlákna vystupují z II. a V. vrstvy a končí hlavně v ncl. basomedialis, slabší projekce pak v ncl. basolateralis a lateralis accesorius. Z rostrálního oddílu A35 běží středně silná projekce do claustra, zatímco projekce do thalamu a hypothalamu jsou slabé. (Burwell a Amaral, 1998a; Burwell a Amaral, 1998b; Furtak et al., 2007; Witter a Amaral, 2004).

#### **1.2.2.2. Area 36**

Téměř polovina korové aferentace do A36 přichází ze sousedící temporální kůry. Tyto vstupy jsou ve srovnání s A35 vyššího řádu, přivádějí sluchové, čichové, senzitivní a zrakové informace. Nejvíce jich přichází z ventrální temporální asociační oblasti, z area Te3V. Významné jsou přívody z laterální entorhinální kůry, i když jsou ve srovnání s A35 slabší. Končí v II., III. a VI. vrstvě A36. Jiným důležitým aferentem je postrhinální kůra. Na rozdíl od aferentace z entorhinální kůry jsou tyto vstupy silnější pro A36 než pro A35. Končí převážně v dorzálním oddílu A36, ve všech korových vrstvách. V I., II. a VI. vrstvě končí silné projekce z A35. Aferentace z CA1 pole hippocampu a subikula jsou slabší, končí

výlučně v V. a VI. korové vrstvě. Menší počet vláken pak přichází z insulární kůry a zrakových asociačních oblastí okcipitálního laloku.

Podkorové vstupy se podílejí na celkové aferentaci asi z jedné třetiny. Nejvýznamnější je projekce z amygdaly, zejména její ncl. basalis lateralis vytváří masivní projekci do I. vrstvy v rostrální části A36. Středně silná projekce je z thalamu, LD jádro projikuje zejména do kaudálního oddílu A36, zatímco do rostrální části přicházejí vstupy z corpus geniculatum mediale. Septum a hypothalamus se na celkové aferentaci podílejí jenom okrajově.

Korová eferentace směřuje do parietální, temporální a frontální kůry. Nejsilnější projekce vystupuje z rostrálního oddílu A36 a je určena pro somatosenzitivní korovou oblast. Z kaudálního oddílu pak vystupují silné projekce do temporálních oblastí a piriformní kůry. Z II., III. a VI. vrstvy ventrálního oddílu A36 jdou silné spoje určeny pro A35, z V. a VI. vrstvy vystupují vlákna pro postrhinální kůru. Z rostrální části A36 jdou axony pro kaudální oddíly postrhinální kůry, zatímco aferentace pro rostrální postrhinální oblasti má svůj původ v kaudálním oddílu A36. Projekce pro entorhinální kůru je ve srovnání s A35 slabší, a většina vláken je určena pro její laterální oddíl. Odstupují z II., V. a VI. vrstvy. Subikulum a CA1 pole hippocampu dostávají z A36 slabší projekce.

Většina podkorových projekcí z A36 je středně silná, s výjimkou masivní projekce do kaudálního oddílu putamen. Další ze silnějších spojů vychází z celé tloušťky A36 a končí v amygdale, v jejím ncl. lateralis a ncl. basalis a ve III. vrstvě periamygdalární kůry. Středně silné spoje původem ze VI. vrstvy A36 pak mají svá zakončení v LD jádře thalamu a v zona incerta (Burwell a Amaral, 1998a; Burwell a Amaral 1998b; Furtak et al., 2007; Witter a Amaral, 2004).

### **1.3. Retrospleniální kůra**

#### **1.3.1. Uložení a cytoarchitektonika retrospleniální korové oblasti**

Retrospleniální kůra (retrosplenial cortex - RSC) je přechodná neboli mezokortikální korová oblast nacházející se na mediokaudálním povrchu hemisféry (obr. 1). Skládá se podle Brodmanna (Brodmann, 1909) ze dvou areí - area 29 (A29) a area 30 (A30). Area 29 leží na mediální ploše hemisféry a také bývá označována jako granulární retrospleniální kůra (RSG), zatímco area 30 se rozkládá dorzolaterálně od předchozí oblasti a je označována jako agranulární nebo dysgranulární retrospleniální kůra (RSA, RSD) (Vogt, 1993)



Granulární area 29 se dále člení na tři pododdíly. Rostrálně a dorsálně leží A29c, od ní ventrokaudálně se nalézají A29b a nejventrálněji je uložena A29a (obr. 3) (Vogt a Peters, 1981).

Area 29a sousedí kaudálně s postsubikulem (area 48) a tento přechod je charakterizován řadou cytoarchitektonických známek. Zevní vrstvy A29a (II., III., IV.) jsou tenké přičemž IV. vrstva je stěží rozlišitelná (Vogt a Peters, 1981). Hluboké vrstvy jsou homogenní, i když se dá rozlišit tenčí, z malých neuronů se skládající VI. vrstva. Naproti tomu v A29b je zřetelná velmi denzní a silná II. vrstva, která se obvykle skládá ze tří až pěti řad neuronů, dále rozptýlená granulární III. vrstva a tenká, na neurony chudá IV. vrstva. Existenci tenké IV. vrstvy potvrzuje tenká vrstvička thalamických vláken, která je viditelná právě v A29b a A29c. V. vrstva obsahuje velké typické pyramidové neurony a pod ní je zřetelná, i když tenká VI. vrstva.

Area 29c se vyznačuje nejlépe diferenciovanými granulárními vrstvami a její neurony jsou obecně menší ve srovnání s A29a a A29b. Převažujícím typem neuronů jsou zde hvězdovité pyramidy a větvenovité neurony. Apikální dendrity těchto neuronů tvoří svazečky, které se větví a vytvářejí apikální chomáčky v Ia. vrstvě. Tato struktura se v průběhu stárnutí mění a u starších jedinců je větvení chomáčků chudší. Tyto změny by mohly souviset se zhoršením prostorového učení a paměti, které jsou zabezpečovány funkcemi A29. (Van Groen et al., 1993). Část těchto apikálních dendritických svazečků pochází z neuronů II. vrstvy a vykazují PV – imunopozitivitu. Tyto dendritické svazečky jsou cílem projekcí z anteriorních thalamických jader. (Ichinohe a Rockland, 2002; Ichinohe, 2012). V hlubších vrstvách A29c je zřetelná V. vrstva. Povrchověji uložená vrstva Va je obsazena středně velkými pyramidovými neurony, které jsou rozloženy difusněji než neurony v hlubší Vb. vrstvě. Takové uspořádání V. vrstvy připomíná strukturu „motorické“ korové oblasti. Silná VI. vrstva obsahuje neurony zajišťující kortikothalamické projekce do anteriorních thalamických jader (obr. 4) (Vogt et al., 2004).

### **1.3.2. Spojení retrosplenální korové oblasti**

Retrospeniální kůra je situována ve významné pozici mezi hipokampální formací a neokortexem. Díky tomu má bohaté aferentní a eferentní, ipsilaterální i kontralaterální spojení s dalšími korovými oblastmi a podkorovými strukturami. Z těch nejvýznamnějších korových spojení je to především zapojení jednotlivých oblastí a podoblastí RSC (A29a, b, A29c, A30)

navzájem mezi sebou a dále jsou to aferentní spoje z hippocampu, subikula a z postsubikula, ze zrakové korové oblasti A17 a A18 a z přední cingulární kůry.

Z podkorových struktur je to zejména thalamus, jeho anteromediální (AM), anteroventrální (AV), anterodorzální jádro (AD), dále laterodorzální thalamické jádro (LD), claustrum a hypothalamická corpora mamillaria (Van Groen a Wyss, 1990; Van Groen a Wyss, 1992; Van Groen a Wyss, 2003). Všechny aferentní nebo eferentní spoje projikují do nebo vycházejí z odlišných korových vrstev. Pro další popis můžeme rozdělit A29 na dvě podoblasti: kaudálnější A29a, b a rostrálnější A29c. Přehledné zobrazení nejdůležitějších spojů RSC je na obr. 11.

### **1.3.2.1. Area 29 a, b**

Aferentní korové projekce do A29a, b přicházejí ze stejnostranné přední cingulární kůry, z A29c a A30, z hippocampu, ventrálního subikula a z kontralaterální A29a, b.

Podkorové vstupy pocházejí z claustra, diagonálního Brocova svazku, rapheálních jader, locus coeruleus a z thalamu. Thalamické projekce vystupují především z AD a LD jádra, a slabší spoje z AV jádra a z ncl. reuniens. Vlákná z AD jádra končí primárně v I., III. a IV. vrstvě, zatímco axony z LD jádra se větví jenom v I. vrstvě. Subikulum projikuje hlavně do II. vrstvy, zatímco vlákna z postsubikula končí v I. a III.-V. vrstvě. Homotopické axony z kontralaterální A29a, b vytvářejí hustou terminální pleteň ve IV. a V. vrstvě, s menším počtem zakončení v I. a VI. vrstvě.

Korová eferentace běží do přední cingulární kůry, do A29c, A30 a do postsubikula. Tyto korové eferenty začínají ve II., III., V. a VI. vrstvě A29a, b. Kontralaterální eferentace vystupuje ze II., III. a V. vrstvy a směřuje do A30 a A29. Podkorové eferentní projekce směřují do stejnostranných AV (tato projekce je bilaterální) a LD (do jeho dorzální části) jader thalamu. Tato vlákna vystupují ze VI. korové vrstvy (Van Groen a Wyss, 1990).

### **1.3.2.2. Area 29c**

Korové aferentace do A29c přichází z přední cingulární kůry, zrakové korové oblasti A18, z A29a, b, A29c, z hippocampu (pole CA1), z dorzálního subikula a postsubikula. Přívody z cingulární kůry končí převážně v rostroventrální části A29c (v hloubce I. vrstvy a v III.-V. vrstvě). Vlákná ze zrakové oblasti směřují do dorzální části A29c, do hluboké části I.

vrstvy a do IV.-V. vrstvy. Subikulum projikuje do II. a III. vrstvy, zatímco terminace z postsubikula jsou omezeny na I. a III. vrstvu.

Podkorové aferentní projekce vystupují hlavně z claustra, horizontálního raménka Brocova diagonálního svazku, z thalamických jader AV, AD, LD a z ncl. reuniens, a dále z kmenových struktur (ncl. rapheales a locus coeruleus). Vlákná z AD jádra thalamu končí v I., II. a IV. vrstvě, z LD jádra pak v I., III. a IV. vrstvě. Projekce z AV jádra je slabá a vytváří jenom ohraničené shluky terminací v povrchové zóně I. vrstvy.

Hlavní eferentní korové projekce z A29c směřují do ipsilaterální kaudální oblasti přední cingulární kůry, do area A18, A29a, b, do postsubikula a menší porce vláken pak směřuje do prelimbické a kaudální okcipitální kůry. Eferentace začíná typicky v IV. a V. vrstvě (pro zřetelovou kůru), v V. vrstvě má svůj původ postsubikulární projekce a z V. a VI. vrstvy vystupují vlákna pro cingulární a retrosplenální korové oblasti. Tato vlákna končí typicky v I. a III.-V. vrstvě jmenovaných cílových oblastí. Kontralaterální projekce je z větší části homotopická a končí převážně v druhostranné A29c, a v menší míře směřuje do A29a, b a do postsubikula. Tyto spoje končí zejména v V. korové vrstvě, s menším počtem zakončení v I. a VI. vrstvě.

Eferentní podkorové projekce směřují do thalamu, zejména jeho AV a LD jader, slabé projekce pak do AD jádra, do ncl. reuniens a ncl. reticularis. Jejich zdrojem je VI. vrstva. Velmi malá cílová pole jsou v kaudální dorzomediální části striata a v corpora mammilaria (z malé skupiny neuronů V. vrstvy ve ventrální části A29c) (Van Groen a Wyss, 2003).

### **1.3.2.3. Area 30**

Korové aferentní projekce do A30 mají svůj původ v přední cingulární, postsubikulární a kontralaterální retrosplenální kůře a v zřetelových korových oblastech A17 a A18. Aferentace z postsubikula končí v I. a III.-V. vrstvě, vlákna ze zřetelových korových polí mají svá zakončení hlavně v I. vrstvě, axony z kontralaterální A30 vytvářejí hustou terminální pletěň v I.-IV. vrstvě s jenom minimem terminací v hlubších vrstvách. Vlákná vystupující z A29 mají terminace v I. a III. vrstvě. Projekce z přední cingulární kůry pak končí v I. a V.-VI. vrstvě A30.

Podkorové spoje vystupují z thalamických jader, ale i z dalších podkorových struktur. Projekce z thalamických jader vystupuje hlavně z AM a LD jádra. Výrazná zakončení v I. a III.-IV. vrstvě vytvářejí vlákna z LD, hlavní porce vláken z AM končí v I. a IV.-VI. vrstvě. Další thalamická jádra, AV, AD nebo ncl. reuniens, vydávají jenom slabé projekce do I. a III.-

IV. vrstvy A30. Z ostatních podkorových vstupů můžeme zmínit claustrum, kde vlákna pro A30 pocházejí z celého jeho rozsahu, Brocův diagonální svazek (primárně horizontální raménko, v malé míře i vertikální raménko), a kmenové ncll. rapheales a locus coeruleus.

Korová eferentace z A30 směřuje do stejnostranné přední cingulární kůry, do retrosplenálních, zrakových (A17, A18) a postsubikulárních korových oblastí. Zdrojem jsou neurony v II., III. a V. vrstvě. Z posledně uvedené vrstvy vybíhají dlouhá vlákna směřující do vzdálenějších oblastí RSC a do přední cingulární kůry. Naproti tomu na eferenci do postsubikula se podílí jenom V. vrstva. Hlavním cílem kontralaterálních projekcí je druhostranná A30, menší počet vláken pak končí v A29a v přední cingulární a postsubikulární kůře. Tato vlákna vystupují z II. a III. vrstvy A30, menší složka vystupuje V. vrstvy.

Podkorové eferentní spoje směřují hlavně do thalamu. Axony přicházející z A30 se intenzivně větví a končí zejména v LD a v AM jádře, přičemž některá vlákna překračují střední čáru a končí v homotopické oblasti druhostranného AM jádra. Projekce do LD jádra je však výlučně ipsilaterální. Menší projekce pak končí v AV, LP a ncl. reticularis thalami. Všechna vlákna pro thalamus pocházejí ze VI. vrstvy A30. Z V. a VI. vrstvy vychází svazeček dlouhých vláken, který probíhá skrze LP jádro thalamu a končí ve střední části colliculus superior. Eferentace z A30 směřuje rovněž do dorzomediální části striata, do ncll. rapheales a substantia grisea centralis středního mozku (Van Groen a Wyss, 1992; Vogt et al., 2004).

## 2. Otázky a cíle práce

Perirhinální a retrosplenální korová oblast jsou přechodným typem kůry tvořícím přechod mezi neokortexem na jedné straně a allokortikální hippokampální oblastí na straně druhé. Obě mají významnou roli v paměťových funkcích, podílí se na přenosu epileptických aktivit a na navigaci organismu v prostoru. Až dosud publikované výsledky o inhibičním mechanismu těchto oblastí mají pouze orientační charakter a zcela chybí kvantitativní údaje o laminární distribuci PV+ a CR+ neuronů v obou oblastech a podrobnější údaje o morfologických charakteristikách obou typů neuronů. Pro přesné pochopení funkcí obou studovaných korových oblastí je nezbytně nutná znalost základních vlastností těchto neuronů za fyziologické situace. Naším cílem bylo tedy:

1. provést podrobnou kvalitativní a zejména kvantitativní analýzu inhibičních interneuronů v PRC a v RSC za pomoci stereologické a densitometrické analýzy.
2. ověřit, zda tyto dvě přechodné korové oblasti mají odobné složení interneuronálních populací nebo zda se v zastoupení CR+ a PV+ neuronů liší.

Vzhledem k tomu že jsme srovnávali interneuronální výbavu dvou přechodných korových oblastí, předpokládali jsme, že zastoupení CR a PV interneuronů a exprese obou proteinů budou v obou oblastech obdobné.

### 3. Materiál a metody

V naší studii jsme vyšetřovali perirhinální a retrosplenální korové oblasti mozku potkana. Použito bylo celkem 8 potkanů kmene Wistar. Mozky byly nařezány na 50  $\mu\text{m}$  tlusté koronální řezy, které byly barveny podle Nissla a imunohistochemicky pomocí monoklonálních protilátek proti CR a PV. Na těchto řezech byly kvantitativně a kvalitativně hodnoceny interneuronální populace. Na Nissl-barvených řezech byla stereologicky změřena celková hustota neuronů ve zkoumaných oblastech. Denzitometricky byla hodnocena optická denzita neuropilu. Změřené hodnoty v jednotlivých oblastech byly porovnány za použití statistického testu Tukey-Kramer.

#### 3.1. Pokusná zvířata

V této studii byly použity mozky šesti potkanů kmene Wistar (samci) stáří 3 měsíců o tělesné hmotnosti 350 až 400 gramů. Pro kvalitativní hodnocení barvení na CaBP byly použity ještě 2 archivní případy (samci, 4 měsíce, kmen Wistar). Zvířata byla chována za standardních podmínek (cyklus 12 hodin světlo / 12 hodin tma, teplota vzduchu  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , vlhkost vzduchu 50-60 %, volný přístup k vodě a potravě). Experimenty byly schváleny Odbornou komisí Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. a byly provedeny v souladu s platnými směrnici Evropské rady (*The guidelines of the European Community Council directives 86/ 609/EEC and NIH Guidelines (Assurance No. #A5820-01)*).

#### 3.2. Příprava materiálu

Potkanům byla intraperitoneálně podána nadměrná dávka uretanu (2g/kg). Po preparaci hrudního koše a zavedení intraaortálního katétru byl cévní systém perfundován 0,01 M fosfátovým pufrům (pH 7,4) a následně 4% paraformaldehydem v roztoku 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Mozky byly opatrně v celku vypreparovány z lebeční dutiny, dále postfixovány v pufovaném 4% paraformaldehydu po dobu tří hodin a poté vloženy do vzestupné řady sacharózy (10%, 20%, 30%) v PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným; PBS - phosphate buffered saline) při  $4^\circ\text{C}$ . Mozky byly následně zamrazeny na suchém ledu a nakrájeny na 50  $\mu\text{m}$  silné koronární řezy na kryostatu Leica CM 1900.

### 3.3. Imunohistochemické barvení

Sousední sériové koronární řezy byly v sériích „jeden z pěti“ nabarveny čtyřmi metodami: kresylvioletí podle Nissla, u dalších řezů byly provedeny imunohistochemické reakce na průkaz calretininu (CR), parvalbuminu (PV) a calbindinu (CB). Pátý řez z každé série nebyl zpracován a byl archivován pro případné další použití. Vznikly tedy za sebou následující série po pěti 50 µm silných řezech, u nichž mezi dvěma za sebou následujícími řezy nabarvenými stejným barvením byla vzdálenost 250 µm. Tímto způsobem byl zpracován vždy celý mozek. Vzhledem k velmi variabilní a zčásti velmi nízké intenzitě barvení na CB-imunoreaktivní neurony, řezy barvené na CB, nevhodné pro kvalitativní i kvantitativní analýzu nebyly použity.

Imunohistochemická barvení na průkaz CaBP byla provedena následujícím způsobem: řezy byly postupně inkubovány metodou free-floating v 0,15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PBS po dobu 10 minut, propláchnuty pětkrát v PBS, permeabilizovány s 0,3% Tritonem X100 a následně jednu hodinu inkubovány při pokojové teplotě v blokovacím roztoku obsahujícím 2% normálního koňského séra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Řezy byly dále inkubovány s primární protilátkou (myší anti-CR monoklonální protilátka, Millipore, ředění 1:8000, kat. č. MAB 1568 nebo myší anti-PV monoklonální protilátka, Millipore, ředění 1:10000, kat. č. MAB 1572) v PBS obsahujícím 1,5% normálního koňského séra a 0,1% Tritonu X100 po dobu 48 hodin při teplotě 4°C a potom propláchnuty pětkrát v PBS. Řezy byly dále inkubovány jednu hodinu při pokojové teplotě se sekundární protilátkou, biotinylovanou koňskou protilátkou proti myšimu antigenu (Vector) ředěnou 1:50, kat. č. BA2001, v PBS obsahující 1,5 % normálního koňského séra. Následně byly řezy propláchnuty pětkrát v PBS, inkubovány jednu hodinu při pokojové teplotě s Avidin-Biotin komplexem (Vectastatin Kit, Vector) a po propláchnutí inkubovány 8 minut s roztokem 0,02% diaminobenzidinu a 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PBS. Řezy byly následně přeneseny na standardní podložní sklíčka potažená želatinou, dehydratovány a přikryty krycím sklíčkem.

Příklady barvení kresylvioletí a imunohistochemické barvení na CR a PV jsou znázorněny na obrázku 2.

### 3.4. Ohraničení korových oblastí a vrstev

Většinu znaků potřebných k určení hranic studovaných oblastí jsme byli schopni spolehlivě rozlišit na řezech barvených Nisslovým barvením. Na řezech barvených CR a PV

jsme pak identifikovali další strukturální charakteristiky umožňující přesnější stanovení hranic jednotlivých oblastí a korových vrstev. Detaily budou popsány ve výsledcích.

Při identifikaci cytoarchitektonických hranic perirhinálních korových oblastí A35 a A36 jsme vycházeli z popisu R. Burwellové (Burwell, 2001). Pro rozlišení retrospleniálních korových polí jsme vycházeli z klasifikace Vogta (Voght et al., 2004), jež je považována za ekvivalentní Brodmannově popisu lidských korových oblastí (Brodmann, 1909). Vycházeli jsme z členění retrospleniální oblasti na granulární areu A29 a dysgranulární areu A30. Area 29 je dále rozdělena na A29a, 29b a 29c. Nicméně hranice mezi jednotlivými podoblastmi A29 nemohly být na použitém materiálu spolehlivě rozlišeny. Proto jsme pro potřeby kvantitativní analýzy považovali A29 za jednolitou oblast. V nejnovější modifikaci výše zmiňované nomenklatury RSC, Vogt a Paxinos (2014) navrhují na podkladě jemných rozdílů v cytoarchitektonice a zapojení rozdělit A29c a A30 na rostrální a kaudální oddíl. Ani v tomto případě nebylo možné na řezech barvených podle Nissla důsledně rozlišit cytoarchitektonické charakteristiky nezbytné pro toto rozdělení.

U PRC byla kvantitativní analýza provedena rostrokaudálně v rozsahu od -2,75 mm do přibližně -7,0 mm AP (anteroposteriorně) od bregmatu, s použitím atlasu (Paxinos a Watson, 2007). Uvedený rozsah pokrývá téměř celou PRC.

V případě RSC kvantitativní analýza zahrnovala rostrokaudální rozsah oblasti od -1,80 mm po přibližně -6,55 mm AP (anteroposteriorně) od bregmatu (Paxinos a Watson, 2007). Uvedený rozsah zahrnuje téměř celou retrospleniální kůru. Ve zbývajících malé kaudální části RSC rovina řezu neumožňovala tuto část RSC zahrnout do kvantitativní analýzy. Hranice a rozsah vyšetřovaných korových areí jsou znázorněny na řezech vedených několika rostrokaudálními úrovněmi hemisféry viz obrázek 1.

### **3.5. Kvalitativní analýza**

Kvalitativní analýza byla provedena na obou hemisférách. Hodnocení cytoarchitektoniky a imunoreaktivity v jednotlivých areách a vrstvách a rovněž hodnocení somatodendritické morfologie imunoreaktivních neuronů bylo provedeno na řezech barvených Nisslovým barvením a na řezech kde byly provedeny imunohistochemické reakce na CR a PV. Byl použit program pro analýzu obrazu (Cell\*F, Olympus) a digitální kamery Olympus DP 72 připojené k mikroskopu Olympus BX 51.



### 3.6. Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza se skládala z denzitometrické a stereologické analýzy a byla provedena na pravé mozkové hemisféře.

#### 3.6.1. Denzitometrické hodnocení

Denzitometrická analýza imunoreaktivity neuropilu a neuronů pro CR a PV v korových areách 35, 36, 29 a 30 byla provedena na koronárních řezech rovnoměrně vzdálených rostrokaudálních úrovní. Pro PRC jsme použili 3 koronární řezy (AP -3.96 mm, AP -5.04 mm a AP -6.00 mm), pro RSC jich bylo 5 (AP -2.05 mm, AP -3.05 mm, AP -4.05 mm, AP -5.05 mm a AP -6.05 mm od bregmatu, (Paxinos a Watson, 2007). Úhrnem bylo hodnoceno 18, respektive 30 řezů (3 resp. 5 řezů z každého ze 6 potkanů). Snímky byly zhotoveny za pomoci programu na zpracování obrazu QuickPHOTO MICRO 2.3, Promicra a digitální kamery DP 72 připojené na mikroskop Olympus BX 51. Pro tento účel byl použit objektiv s desetinásobným zvětšením. Abychom zabránili rozdílům v intenzitě osvětlení, všechny snímky byly pořízeny při stejném nastavení intenzity osvětlení na mikroskopu a při manuálně nastavené fixní expoziční době kamery. Snímky byly následně převedeny na snímky v odstínech šedé.

Denzitometrické hodnocení bylo provedeno za pomoci softwaru pro kvantitativní analýzu optické denzity v biologické tkáni (Denzita, MBF Bioscience -MicroBrightField, Inc.). Pro kalibraci hodnot luminance (úrovně jasu) a pro umožnění výpočtu relativní optické denzity (ROD) byly použity snímky kalibračního proužku s oblastmi s definovanou hodnotou odstínu šedé. Relativní optická denzita byla vypočtena pomocí vzorce:

kde  $F$  je hodnota odstínu šedé na pozadí ( $F = 255$ ),  $P_i$  je hodnota odstínu šedé daného pixelu / pixelů a  $N$  vyjadřuje počet pixelů. Nízké hodnoty ROD znamenají, že tkáni prochází více světla a vysoké hodnoty naopak, že je více světla pohlceno v tkáni a tudíž není zachyceno kamerou.

Za použití regresní přímky byla vypočtena ROD pro každou vyšetřovanou oblast na všech použitých řezech. Korová vrstva I byla z denzitometrické analýzy vyloučena. Abychom eliminovali možný vliv rozdílů v intenzitě imunohistochemického barvení mezi jednotlivými řezy a mezi jednotlivými zvířaty, ROD byla korigována vydělením hodnot naměřených

v jednotlivých vyšetřovaných oblastech hodnotou naměřenou v corpus callosum na stejném řezu. Tato korigovaná relativní optická denzita (cROD) umožnila porovnání naměřených hodnot mezi jednotlivými řezy a zvířaty. Jako referenční struktura bylo vybráno právě corpus callosum, protože vykazuje jen velmi nízkou intenzitu imunohistochemického barvení na CR a PV a je zřetelně ohraničené.

### **3.6.2. Stereologická analýza**

Pro stanovení celkové neuronální a interneuronální denzity byla použita stereologická analýza, umožňující přesný výpočet neuronů v daném objemu tkáně při analýze omezené části celkového objemu. Detailní popis této metodiky a principy, ze kterých vychází, včetně vysvětlení výpočtů, je možné najít ve studii Westa a kol (West et al., 1991).

Celková neuronální denzita byla měřena na řezech barvených podle Nissla. Byly použity řezy ze všech šesti zvířat. V případě PRC bylo u každého zvířete použito 17-18 koronárních řezů, u RSC to bylo 20-22 koronárních řezů vzdálených od sebe vždy 250  $\mu\text{m}$ , ve výše zmíněných rostrokaudálních intervalech AP -2,75 mm až AP -7,0 mm pro PRC a AP -1.80 až -6.55 pro RSC. Neurony byly počítány na každém druhém řezu. Jako první vyhodnocený řez byl vždy po náhodném výběru použit první nebo druhý řez z rostrálního konce vyšetřovaného AP intervalu. Celkem tedy bylo u každého zvířete vyhodnoceno 8- 11 řezů barvených podle Nissla. Neurony byly počítány zvlášť pro vrstvy II+IV a pro vrstvy V+VI a nakonec sumárně ve všech vrstvách (II-VI). Korová vrstva I nebyla hodnocena vzhledem k velmi nízkému počtu interneuronů imunopozitivních na CR a PV. Především PV+ interneurony nejsou ve vrstvě I prakticky přítomné.

Pro PRC byl použit mikroskop Olympus BX 50 vybavený motorizovaným stolkem a CAST Grid stereologickým systémem verze 2.1.5.8 (Olympus, 1999). RSC pak byla analyzována na mikroskopu Olympus BX51 s motorizovaným stolkem a stereologickým programem Stereo Investigator verze 11.01.2 (MBF Bioscience). Rozměry pomocné mřížky a optického disektoru byly přizpůsobeny zvlášť pro každou z vyšetřovaných oblastí, aby bylo dosaženo relativně konstantního počtu počítaných neuronů a koeficientu chyby  $< 0,1$  u PRC a  $< 0,07$  pro RSC (coefficient of error – CE) (Gundersen a Jensen, 1987). Rozměry pomocné mřížky byly 133,2 x 133,2  $\mu\text{m}$  pro areu 35, 172 x 172  $\mu\text{m}$  pro areu 36, 100 x 100  $\mu\text{m}$  pro povrchové vrstvy RSC a 150 x 150  $\mu\text{m}$  pro hluboké vrstvy RSC. U RSC byla pomocná mřížka otočena o 17 stupňů proti směru hodinových ručiček. V rámci každého posuvu záběru mikroskopu po pomocné mřížce byly spočítány jádra neuronů ve výřezu (optický disektor) o

rozměrech 25,79 x 34,4 μm u obou oblastí PRC, 25 x 25 μm u povrchových a 30 x 30 μm u hlubokých vrstev RSC. Neuronální jádra byla počítána v celé tloušťce řezu za použití imerzního objektivu o zvětšení 100x (numerická apertura 1,35, resp. 1,4). Vyloučena byla jenom ta jádra, která byla při postupném přeastřování podél osy z zaostřena již na horním povrchu daného řezu. Neuroglie a endotelové buňky nebyly počítány. Neurony byly od glií a endotelových buněk rozlišeny na základě jejich typických cytomorfologických znaků (Barger et al., 2012; Morgan et al., 2014). Celkový počet neuronů v každé z vyšetřovaných oblastí (přesněji ve frakci každé oblasti, zavzaté do kvantitativního hodnocení) byl vypočten podle vzorce:

$$N = \Sigma Q \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$$

kde ssf (section sampling fraction, tedy podíl řezů zavzaných do hodnocení z celkového počtu řezů obsahujících průřez danou oblastí) byla 1/10, asf (area sampling fraction, tedy povrch optického disektoru v rovinách xy / povrch jednoho čtverce pomocné mřížky) byla 0,05 v případě A35, 0,03 v případě A36, 0,0625 pro vrstvy II-IV a 0,04 pro vrstvy V-VI u oblastí A29 a A30 a nakonec tsf (tissue sampling fraction, tedy tloušťka řezu / výška optického disektoru v rovině z) byla 1. Celková neuronální denzita byla následně vypočtena vydělením celkového počtu neuronů vypočteného dle popsaného vzorce celkovým objemem tkáně, ve kterém byly tyto neurony počítány. Celkový objem tkáně byl vypočten podle vzorce:

$$\Sigma \text{ všech vyznačených oblastí zájmu v každém řezu (tedy povrchu dané oblasti na konkrétním řezu) } \times \text{ interval mezi jednotlivými řezy } \times \text{ tloušťka řezů}$$

Pro počítání interneuronů byla použita mírně pozměněná metoda. Byl použit stejný počet řezů jako při hodnocení celkové neuronální hustoty, ssf se tedy rovnala 1/10. Imunoreaktivita cytoplasmy v neuronech imunoreaktivních na CR a PV byla obecně vysoká a nezářídka i vyšší než imunoreaktivita jádra. Z tohoto důvodu byly při počítání detekována celá neuronální těla a ne pouze jádra. Opět byla proostřena celá tloušťka řezu (tsf = 1) a neurony, jejichž tělo bylo zaostřeno již na horním povrchu daného řezu byly vyloučeny z hodnocení. Vzhledem k relativně malému počtu imunoreaktivních neuronů ve vyšetřovaných oblastech byly započítány všechny imunoreaktivní neurony v hodnocené oblasti na každém hodnoceném řezu, při použití imerzního objektivu se 40násobným zvětšením (numerická apertura 1,0), tedy asf = 1. Interneuronální denzita byla vypočtena stejným postupem jako celková neuronální denzita.

### **3.6.3. Statistické hodnocení**

Analýza variance (ANOVA – analysis of variance) následována Tukey-Kramer multiple comparison testem byla použita pro vyhodnocení statistické významnosti rozdílů v korigované relativní optické denzitě, celkové neuronální i interneuronální denzitě a procentuálních podílů interneuronů. P hodnoty  $< 0,05$  byly hodnoceny jako statisticky významné.

## 4. Výsledky

### 4.1. Obecná charakteristika imunoreaktivity calretininu a parvalbuminu

Na obrázcích 1, 4, 5 a 6 jsou vyznačeny hranice kortikálních oblastí, tak jak jsme je na použitém materiálu stanovili na základě charakteristik popsaných v literatuře (Burwell, 2001; Vogt et al., 2004; Paxinos a Watson, 2007) a také na základě rozdílů v imunohistochemickém barvení popsaných níže. Charakteristiky imunohistochemického barvení, tak jak jsou popsány v následujícím oddílu, jsou znázorněny na obrázcích 2, 5 a 6. Výsledky dosažené při studiu distribuce CR+ a PV+ neuronů a část obrazové dokumentace byly publikovány ve dvou studiích (Barinka et al., 2012; Salaj et al., 2015).

#### 4.1.1. Calretinin v PRC

Celková hladina CR imunopozitivity v PRC je výrazně vyšší než v sousedící entorhinální korové oblasti. Výrazný a náhlý pokles CR imunopozitivity na přechodu perirhinální a entorhinální kůry spolehlivě určuje ventrální hranici PRC (obr. 5A). Vysoká intenzita barvení I. vrstvy, typická pro všechny korové oblasti, je v PRC a zvláště v A35 mnohem více zřetelnější než v sousedním temporálním neokortexu. V A35 je intenzita barvení v II., III., V. a VI. vrstvě (v A35 chybí IV. vrstva) relativně homogenní s jenom nepatrně vyšší intenzitou v hlubokých oblastech III. a VI. vrstvy. V A36 je zřetelně patrné trilaminární uspořádání CR imunopozitivity s výrazně vyšší intenzitou barvení v I. vrstvě, v hluboké zóně III.-IV. vrstvy a v hloubce VI. vrstvy a s nízkou intenzitou barvení ve II., povrchové zóně III. a v V. vrstvě. Směrem k dorsálněji uložené temporální oblasti Te3V můžeme pozorovat pokles imunopozitivity, nicméně přechod A36 / ATe3V je méně výrazný než výše zmiňovaná hranice A35 / entorhinální kůra (obr. 5A).

Nepozorovali jsme žádné významné změny v rozložení CR imunopozitivity podél rostrokaudální osy PRC (obr. 7). Rostrálně uložená insulární kůra se od PRC odlišuje nízkou intenzitou barvení (jenom mírně vyšší než okolní entorhinální kůra a neokortex) a také přítomností claustra pod VI. vrstvou insulární kůry. Hranici s kaudálně ležící postrhinální kůrou je obtížné spolehlivě stanovit pro podobnou intenzitu barvení a obdobné laminární rozložení imunopozitivity.

#### 4.1.2. Calretinin v RSC

Na rozdíl od perirhinální kůry, v níž byla intenzita CR positivity neuropilu výrazně vyšší než v sousedním temporálním neokortexu (Barinka et al., 2012), jsme zaznamenali jen malé rozdíly v celkové intenzitě barvení mezi RSC a okolním neokortexem (obr. 2B). Nicméně rozdíly v imunoreaktivitě v rámci jednotlivých korových vrstev jasně odlišují retrosplenální oblasti 29 a 30 od sousedících korových polí (obr. 6A). Vysoká intenzita barvení v I. korové vrstvě, typická pro všechny oblasti je v RSC méně výrazná než v okolním neokortexu a zejména ve srovnání s PRC (obr. 2A a 6A). Pod I. vrstvou můžeme vidět světlý pruh nízké CR imunoreaktivitě ve II. vrstvě a v povrchové části III. vrstvy (obr. 6A). Tento pruh je v A29 ostře ohraničen směrem k povrchu i do hloubky, v A30 jsou jeho hranice méně ostré. Tento rozdíl je výrazný a umožňuje spolehlivé rozlišení obou korových oblastí. Dále můžeme v A29 vidět tenký a jasně ohraničený proužek vyšší CR imunoreaktivitě zabírající celou tenkou IV. vrstvu a stejně tak nej povrchnější část V. vrstvy (obr. 6A). Stejně jako v předchozím případě je ohraničení tohoto proužku vyšší CR positivity v A30 méně jasné, zato se stává výrazně tlustší v porovnání s A29. Hluboká část V. vrstvy a celá VI. vrstva se vyznačují nízkou intenzitou CR imunoreaktivitě (s výjimkou nejhlubší části VI. vrstvy v A29, jak je popsáno níže), která se mezi A29 a A30 výrazněji nemění (obr. 6A).

V rostrální části RSC hraničí A29 ventrálně s corpus callosum (obr. 1A-E). Samotné corpus callosum je CR negativní, zatímco na přechodu mezi ním a A29 nalezneme velmi tenký proužek silně CR pozitivního neuropilu, který zasahuje skrz celou tloušťku kůry. Pod tímto proužkem můžeme vidět v nejmediálnější části cingula pole s výraznou CR pozitivitou, pokračující do nejhlubších oblastí VI. vrstvy oblasti 29. Zdá se, že toto pole se skládá z transverzálně přetáých CR pozitivních vláken, které probíhají podél rostrokaudální osy pod RSC a nakonec vymizí v její nejkaudálnější části (obr. 8A, C).

V kaudální části RSC hraničí A29 ventrálně s dorzálním subikulem a kaudálněji s postsubikulem (obr. 1F-I). Hranice mezi A29 a dorzálním subikulem je jasně rozlišitelná. V postsubikulu je celková intenzita barvení na CR podobná jako v A29, ale chybí zde zmiňovaný pruh nízké intenzity II. a III. vrstvy A29 (obr. 8E)

A30 hraničí laterálně v rostrokaudálním směru nejdříve se sekundární motorickou kůrou, pak s mediální parietální asociační kůrou a nakonec se sekundární zrakovou kůrou (obr. 1). I když každá ze jmenovaných oblastí má svoje vlastní charakteristické uspořádání CR imunoreaktivitě, můžeme najít určité obecné znaky, které umožňují určit hranici mezi nimi a retrosplenální A30. Zprv A30 vykazuje poněkud nižší intenzitu CR barvení v I.

vrstvě, zadruhé výše popsaný pruh intenzivního barvení v povrchové části V. vrstvy A30 přechází do rovnoměrněji vyšší intenzity barvení v V. a VI. vrstvě sousedících neokortikálních oblastí (obr. 6A).

Rostrálně od RSC se rozkládá cingulární kůra, ve které je intenzita CR barvení mnohem homogennější ve všech korových vrstvách. Jasně ohraničený pruh nízké intenzity barvení typický pro II./III. vrstvu RSC v cingulární kůře chybí.

Celková intenzita a rozložení CR barvení se v RSC podél rostrokaudální osy výrazněji nemění s jednou výjimkou vyšší intenzity barvení v oblasti 29a, která se nachází jen v kaudálních řezech (obr. 8E). Nepozorovali jsme žádné rozdíly v rozložení barvení mezi oblastmi 29b a 29c, nicméně jak už bylo řečeno výše, jednoznačné vymezení hranic mezi jednotlivými podoblastmi A29 nebylo na CR barvených řezech možné.

#### **4.1.3. Parvalbumin v PRC**

V protikladu k CR- imunoreaktivitě jsou řezy barvené na PV charakteristické výrazně nižší imunopozitivitou ve srovnání s přílehlou entorhinální a temporální kůrou. VI. korové vrstvě PRC je PV- imunopozitivita minimální. V A35 můžeme vidět ve II. a III. vrstvě jenom mírnou intenzitu zbarvení, což zřetelně ohraničuje tuto oblast od sousední entorhinální kůry s vysokou intenzitou zbarvení v povrchových vrstvách. Tenký proužek vysoké intenzity PV barvení je konstantně přítomen v V. vrstvě A35. Nicméně v hlubokém oddílu V. vrstvy a v VI. vrstvě je intenzita PV barvení podobně nízká jako ve II. a III. vrstvě. V A36 úroveň imunopozitivity mírně vzrůstá ve II.-IV. vrstvě (zejména v II. vrstvě) a méně výrazně také v VI. vrstvě (obr. 5B).

Podobně jako u CR jsme ani u PV nepozorovali žádné významné změny v rozložení PV imunopozitivity podél rostrokaudální osy PRC. (obr. 7D-F) I když je intenzita zbarvení v rostrálněji uložené insulární kůře mírně vyšší než u PRC, její rozložení je velice podobné jako u PRC a neumožňuje tak přesné určení hranice mezi PRC a insulární kůrou. Stejně tak je nemožné určit přesně kaudální hranici PRC jenom s použitím PV barvených řezů, protože navazující postrhinální kůra vykazuje velice podobnou intenzitu a distribuci barvení.

#### **4.1.4. Parvalbumin v RSC**

Na řezech barvených na parvalbumin jsme v RSC nepozorovali tak výrazné rozdíly oproti sousedícímu neokortexu jako v případě materiálu barveného na CR (obr. 2C a 6B).

V A29 I. vrstva vykazuje jenom nízkou intenzitu zbarvení. Hluběji můžeme najít pruh vysoké intenzity ve II. vrstvě, ostře ohraničený proti vrstvě I., jehož intenzita postupně klesá směrem k III. vrstvě. Tato spolu s vrstvou IV. vykazují jenom nízkou PV imunopozitivitu, postupně přecházející do vyšší intenzity v V. vrstvě. Nakonec můžeme vidět nižší intenzitu v VI. vrstvě.

Na hranici mezi A29 a A30 je patrný náhlý a výrazný vzestup tloušťky pruhu vysoké intenzity ve II. a III. vrstvě, společně s mírným zúžením vysoce intenzivního pruhu v V. vrstvě (obr. 6B) Díky těmto výrazným změnám v rozložení imunoreaktivity můžeme jasně rozlišit hranici mezi A29 a A30 na PV barvených řezech. Nenašli jsme žádný rozdíl v úrovni PV imunoreaktivity mezi oblastmi A29b a A29c. V A29a se jednotlivé pruhy vyšší / nižší intenzity PV barvení částečně spojují a vytvářejí jednolitý vzorec barvení. Jak dorsální subikulum, tak postsubikulum vykazují ve srovnání se sousední A29 vyšší celkovou intenzitu barvení ve všech korových vrstvách (obr. 8F).

Hranici mezi A30 a sekundární motorickou kůrou, mediální parietální asociační kůrou a sekundární zrakovou kůrou nebylo možné v případě materiálu barveného na PV spolehlivě určit (obr. 6B a 8B, D a F). Stejně tak jsme nenalezli významné rozdíly v celkové intenzitě barvení PV imunoreaktivních řezů v průběhu rostrokaudální osy (obr. 8B, D, F)

## **4.2. Neuronální morfologie**

### **4.2.1. Morfologie neuronů v PRC**

Obecně somatodendritická morfologie CR+ a PV+ neuronů v obou studovaných oblastech byla méně rozlišitelná než v okolních neokortikálních oblastech. U značné části vyšetřovaných neuronů bylo nabarveno jenom buněčné tělo s proximálními dendritickými segmenty. Ve všech případech byli dendritické stromy neuronů ze V. a VI. vrstvy lépe nabarvené a viditelné než ve II. a III. vrstvě. Mezi neurony jejichž dendrity byli dostatečně nabarveny jsme mohli rozeznat tři základní morfologické typy: Vertikálně orientované bipolární / „bitufted“ neurony, multipolární neurony a horizontálně orientované bipolární / „bitufted“ neurony. Nízký počet nekompletně nabarvených neuronů v I. vrstvě neumožnil jejich podrobnější analýzu a proto jsme se zaměřili na morfologii imunopozitivních neuronů z II.-VI. vrstvy. CR+ a PV+ neurony v obou vyšetřovaných oblastech vykazovali ve všech případech morfologii nepyramidového typu.



#### 4.2.1.1. Calretinin

Celkově bylo popsáno 102 CR+ neuronů ze 6 histologických řezů a tyto pak následně rozděleny do tří skupin na základě jejich morfologického typu. Ukázka relativního zastoupení každého typu v různých oblastech nebo vrstvách je na (obr. 12)

##### 1. Vertikálně orientované bipolární nebo „bitufted“ neurony

Nejčastěji se vyskytující typ CR+ neuronů byl bipolární typ. (obr. 9A) Tyto buňky tvořili největší skupinu v jak v povrchových (II.-IV.), tak v hlubokých korových vrstvách (V.-VI.) obou oblastí. Dva dendrity (bipolární) nebo méně často dva svazky/trsy dendritů („bitufted“) odstupující z protilehlých pólů oválného nebo vřetenitého těla. Dendritické větve často zasahují do sousedících povrchovějších a hlubokých korových vrstev.

##### 2. Multipolární neurony

Buněčná těla multipolárních CR+ neuronů měli nejčastěji tvar mnohoúhelníku, se třemi nebo čtyřmi hlavními dendrity radiálně odstupujícími z těla a mířícími všemi směry do okolí (obr. 9B). Méně často jsme našli neurony typu obrácené pyramidy. Tyto buňky byli nicméně zřetelně menší než běžné pyramidové neurony.

##### 3. Horizontálně orientované bipolární nebo „bitufted“ neurony

U tohoto vzácného typu CR+ neuronů většinou protilehlých pólů fusiformního těla odstupovaly 2 svazky/trsy dendritů, řidčeji jenom dva primární dendrity (obr. 9C). Na rozdíl od vertikálně orientovaných CR+ neuronů, kde si dendrity zachovávali svojí původní orientaci, se směr dendritických výběžků u těchto neuronů často měnil na diagonální, případně na úplně vertikální.

#### 4.2.1.2. Parvalbumin

Celkově bylo popsáno 184 PV+ neuronů ze 6 histologických řezů a tyto pak následně rozděleny do tří skupin na základě jejich morfologického typu. Ukázka relativního zastoupení každého typu v různých oblastech nebo vrstvách je na (obr. 12)

##### 1. Vertikální bipolární nebo „bitufted“ neurony

Tento typ PV+ neuronů jsme nacházeli jenom vzácně. Obvykle měly oválné perikaryon s dendrity odstupujícími z horního a dolního pólu buněčného těla (obr.

9D). Proximální dendrity byli většinou tlustší ve srovnání s CR+ neurony stejného morfologického typu. Prakticky ve všech případech byly dostatečně nabarveny jenom proximální úseky dendritického stromu.

## 2. Multipolární neurony

Neurony tvořící nejpočetnější PV+ typ neuronů ve všech vyšetřovaných oblastech a vrstvách. Buněčná těla měla typicky kulatý nebo oválný tvar, často se čtyřmi nebo i více dendrity, radiálně se větvícími do všech směrů (obr. 9E). Dendrity byly většinou velmi tenké a slabě zbarvené, a tak jsme mohli pozorovat jenom jejich proximální úseky.

## 3. Horizontální bipolární nebo „bitufted“ neurony

Málo častý morfologický typ PV+ neuronů jsme pozorovali častěji v hlubších korových vrstvách. Stejně jako u jiných PV+ morfologiích typů byly obvykle výrazněji zbarveny jen proximální segmenty dendritů (obr. 9F).

### 4.2.2. Morfologie neuronů v RSC

Obecně byla neuronální morfologie lépe rozlišitelná u neuronů barvených na CR než u těch barvených na PV. (obr. 9) Buněčná těla, proximální dendrity i distální části dendritických segmentů byly rozeznatelné u naprosté většiny CR barvených neuronů. Intenzivněji zbarvený dendritický strom spolu s delšími dendritickými segmenty byly častější ve vrstvách V.-VI. nežli v supragranulárních vrstvách. Naproti tomu u PV barvených neuronů bylo možno pozorovat jenom buněčná těla a příležitostně proximální dendrity. Jejich distálnější úseky nebylo možno rozlišit proti silně imunopozitivnímu neuropilu.

Celkový počet imunoreaktivních neuronů v I. vrstvě RSC byl velice nízký a z tohoto důvodu nedovoloval systematickou morfologickou analýzu. Stejně tak by zahrnutí této vrstvy do kvantitativní analýzy vneslo chybu / nepřesnost do srovnání celkové neuronální denzity mezi RSC a PRC z důvodu rozdílné relativní tloušťky I. vrstvy (ve vztahu k celkové tloušťce kůry). Z uvedených důvodů se analyzovali jenom vrstvy II.-VI.

#### 4.2.2.1. Calretinin

Celkově bylo popsáno 505 CR+ neuronů ze 16 histologických řezů a tyto pak následně rozděleny do tří skupin na základě jejich morfologického typu. Ukázka relativního zastoupení každého typu v různých oblastech nebo vrstvách je na (obr. 12)

#### 1. Vertikálně orientované bipolární nebo „bitufted“ neurony

Nejčastěji se vyskytující typ CR+ neuronů byl bipolární typ. (obr. 9A) Tyto buňky tvořily největší skupinu v hlubokých korových vrstvách (V.-VI.) obou oblastí, ale ne v povrchových vrstvách II.-IV., kde byly nejčastější multipolární neurony. Jejich perikarya byla obvykle oválna nebo vřetenitá, se dvěma bipolárními dendrity odstupujícími z protilehlých pólů buněčného těla. Méně často se vyskytovaly buňky se dvěma svazky/trsy dendritů („bitufted“), které pokračovaly do sousedních korových vrstev.

#### 2. Multipolární neurony

Multipolární neurony (obr. 9B) byly druhou největší skupinou celkem a nejčastěji se vyskytujícím buněčným typem v povrchových korových vrstvách (II.-IV.) obou oblastí. Obvykle jsme rozlišili 3 nebo 4 dendrity radiálně odstupující z kulatého buněčného těla. Méně často jsme pozorovali morfologii oválnou nebo typu obrácené pyramidy.

#### 3. Horizontálně orientované bipolární nebo „bitufted“ neurony

Horizontálně orientované CR+ neurony (obr. 9C.) tvořily jenom malou část celkové populace v obou studovaných oblastech. Zpravidla měly oválné tělo a buď dva svazky/trsy dendritů nebo dva primární dendrity odstupující z obou protilehlých pólů buněčného těla.

### 4.2.2.2. Parvalbumin

Pokud jde o PV+ neurony v RSC, u naprosté většiny pozorovaných neuronů bylo rozlišitelné pouze buněčné tělo případně krátké segmenty primárních dendritů. Buněčné výběžky byly dobře nabarvené, ale jenom výjimečně je bylo možno odlišit od silně PV imunopozitivního neuropilu. Většina rozlišitelných neuronů měla tělo okrouhlé, nebo tvaru obrácené pyramidy, připomínající morfologii multipolárních neuronů. Méně často jsme pozorovali v hlubokých vrstvách neurony s vertikálně orientovaným tělem oválného tvaru.

### **4.3. Denzitometrická analýza calretininové a parvalbuminové imunoreaktivity**

Denzitometrická analýza sloužila kvantifikaci rozdílů v CR a PV imunoreaktivitě neuropilu v PRC a RSC. Měřili jsme korigovanou optickou denzitu (cROD) v obou studovaných oblastech (viz. Materiál a metody). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

#### **4.3.1 Denzitometrie v PRC**

Na CR barvených řezech byla nejvyšší cROD v A35 ( $4.7 \pm 0.5$ ). Mírně, ale nesignifikantně, nižší hodnoty pak byli naměřeny v A36 ( $4.4 \pm 0.6$ ). Na řezech barvených PV byli hodnoty cROD  $3.7 \pm 0.4$  pro A35 a  $5.1 \pm 0.7$  pro A36, opět bez statisticky významného rozdílu. Pro určení případných rozdílů v CR a PV imunopozitivitě podél rostrokaudální osy jsme porovnali cROD ze tří různých rostrokaudálních úrovní pro všechny studované oblasti. Nepozorovali jsme žádné statisticky významné rozdíly v hodnotách cROD ze zmiňovaných oblastí (bez číselných dat, pro představu obr. 7)

#### **4.3.2. Denzitometrie v RSC**

V CR barvených řezech byla hodnota cROD 2.1 v obou popisovaných oblastech. V řezech barvených na PV byla hodnota cROD výrazně vyšší, 4.5 v A29 a 4.4 v A30 (obr. 6). Pro určení možných rozdílů v imunoreaktivitě pro CR a PV podél rostrokaudální osy jsme dále změřili cROD z 5 různých úrovní v obou zkoumaných oblastech. Nebyla nalezena žádná statisticky významná odchylka v hodnotách cROD ve všech vyšetřovaných řezech (obr 8).

### **4.4. Kvantitativní analýza hustoty imunoreaktivních neuronů**

#### **4.4.1. Hustoty CR+ a PV+ neuronů**

Hustota CR+ a PV+ neuronů v A29, A30, A35 a A36 byla určena stereologicky a vyjádřena jako počet neuronů na  $1 \text{ mm}^3$  mozkové kůry  $\pm$  směrodatná odchylka (S.E.M.) samostatně a zvlášť pro korové vrstvy II.-IV., V.-VI. a nakonec celkově II.-VI. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1.

#### **4.4.1.1. Hustoty CR+ a PV+ neuronů v PRC**

##### **4.4.1.1.1. Calretinin**

Distribuce CR+ neuronů byla podobná v obou studovaných oblastech, s vysokou neuronální hustotou v povrchových a výrazně nižší hustou v hlubokých korových vrstvách. Dále jsme pozorovali rozdíly v neuronální hustotě mezi studovanými oblastmi. Tato hodnota klesá podél ventrodorzální osy, s nejvyšší hodnotou v A35 ( $3194 \pm 211$  neuronů/mm<sup>3</sup> pro vrstvy II.-VI.) a mnohem nižší hodnotou v A36 ( $2520 \pm 363$  neuronů na mm<sup>3</sup>) a jeví klesající tendenci směrem dorzálně (Barinka et al., 2012). Tento pokles je zvláště výrazný v povrchových vrstvách II. a III. (II.-IV.) (tab. 1 pro číselné hodnoty, příp obr. 7).

##### **4.4.1.1.2. Parvalbumin**

V obou studovaných oblastech byli PV+ neurony rozloženy podobně jako CR+ neurony, s vyšším počtem buněk v povrchovějších korových vrstvách i když rozdíl mezi jednotlivými vrstvami nebyl tak markantní jako v případě CR+ neuronů. Na rozdíl od CR+ neuronů byly PV+ neurony rozloženy rovnoměrněji mezi studované oblasti. Neuronální hustota v A35 byla  $3805 \pm 120$  neuronů/mm<sup>3</sup> pro II.-VI. vrstvu a jenom nesignifikantně vyšší byla v případě A36 ( $4336 \pm 223$  neuronů /mm<sup>3</sup>) (tab.1).

#### **4.4.1.2. Hustoty CR+ a PV+ neuronů v RSC**

##### **4.4.1.2.1. Calretinin**

Rozložení CR+ neuronů bylo velice podobné v A29 a A30, s vysokou hustotou v povrchových korových vrstvách a výrazně nižší hustotou v hlubokých vrstvách. Nicméně, celkově byla vyšší hustota neuronů v A29 ve srovnání s A30. Tento rozdíl byl statisticky významný.

#### **4.4.1.2.2. Parvalbumin**

Hustota PV+ neuronů v V.-VI. vrstvě byla výrazně vyšší v A29 ve srovnání s A30. Rozdíly v neuronálních hustotách zbývajících oblastí (vrstvy II.-IV. a II.-VI.) nedosáhly statistické významnosti.

#### **4.4.2. Celková neuronální hustota a procenta CR+ a PV+ neuronů z celkové neuronální hustoty**

Abychom vyloučili možnou chybu při srovnání jednotlivých korových oblastí, která by mohla být způsobena různou hustotou neuronů v sulcus rhinalis a na konvexitě hemisféry, stanovili jsme celkový počet neuronů na řezech barvených podle Nissla a poté jsme vyjádřili relativní počty interneuronů ve všech jednotlivých studovaných oblastech jako procenta celkové neuronální populace.

##### **4.4.2.1. Celková neuronální denzita v PRC**

Celková neuronální hustota byla konzistentně vyšší v povrchovějších vrstvách obou studovaných oblastí. Ve srovnání obou oblastí byla jak celková neuronální hustota ve II.-IV. vrstvě tak neuronální hustoty jednotlivě změřeny pro povrchové i hluboké vrstvy vyšší v A35 a nižší v A36. Jednotlivé hodnoty a úrovně statistické významnosti jsou v tab.1.

##### **4.4.2.1.1. Calretinin**

Trend výrazného poklesu CR+ neuronální hustoty podél ventrodorzální osy byl zachován i v případě že jsme vyjádřili její hodnoty v procentech celkové neuronální populace. CR+ interneurony tvoří 6,4% v A35 a 5,5% v A36 z celkové neuronální populace II.-VI. vrstvy (tab. 1).

##### **4.4.2.1.2. Parvalbumin**

Na rozdíl od CR+ neuronů jsme pozorovali jenom statisticky nevýznamné rozdíly v procentuálním vyjádření neuronální hustoty PV+ neuronů z celkové hustoty neuronů ve studovaných oblastech (tab.1).

#### **4.4.2.2. Celková neuronální denzita v RSC**

Celková neuronální hustota (určena stereologicky na řezech barvených podle Nissla) byla výrazně vyšší v povrchových vrstvách v A29 ve srovnání s A30. Díky tomuto markantnímu rozdílu v II.-IV. vrstvě byla i celková hustota v II.-VI. vrstvě výrazně vyšší v A29 proti A30, i když celková hustota v V.-VI. vrstvě obou studovaných oblastí byla podobná.

##### **4.4.2.2.1. Calretinin**

Trend poklesu CR+ neuronální hustoty podél ventrodorsální osy nebyl zachován, když se hodnoty vyjádřily jako procenta z celkové neuronální populace. CR+ interneurony tvořily 2.2% v A29 a 2.1% v A30 z celkové populace II.-VI. vrstvy (tab. 1).

##### **4.4.2.2.2. Parvalbumin**

V případě PV+ neuronů nebyl nalezen žádný významnější rozdíl. Z celkové populace II.-VI. vrstvy tvořily PV+ interneurony 4.4% v A29 a 4.5% v A30 (tab. 1).

## Tabulka 1

### (A) Absolutní neuronální hustota na mm<sup>3</sup> kůry ± S.E.M.

	A29			A30		
	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.
Nissl	145969 ± 8304 <sup>x</sup>	68815 ± 2160	93477 ± 3456 <sup>x</sup>	97484 ± 3468	67146 ± 2265	79904 ± 1098
CR	5363 ± 165 <sup>x</sup>	1174 ± 30 <sup>x</sup>	2050 ± 54 <sup>x</sup>	3330 ± 221	953 ± 62	1656 ± 106
PV	4461 ± 223	3932 ± 310 <sup>x</sup>	4059 ± 282	4715 ± 247	3064 ± 206	3578 ± 196

	A35			A36		
	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.
Nissl	53803 ± 842 <sup>a</sup>	47716 ± 2359	50365 ± 1257	47926 ± 863	45442 ± 1286	46500 ± 1053
CR	4967 ± 428 <sup>a</sup>	1439 ± 90	3194 ± 211	3617 ± 296	1143 ± 85	2520 ± 363
PV	4805 ± 202	2930 ± 150	3805 ± 120	5240 ± 297	3550 ± 210	4336 ± 223

### (B) Procentuální podíly CR a PV imunoreaktivních neuronů z celkové neuronální populace ± S.E.M.

	A29			A30		
	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.
CR	3,7 ± 0,3	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1
PV	3,1 ± 0,3 <sup>x</sup>	5,7 ± 0,5	4,4 ± 0,4	4,9 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,3

	A35			A36		
	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.	II.-IV.	V.-VI.	II.-VI.
CR	9,2 ± 0,7	3 ± 0,2	6,4 ± 0,4	7,6 ± 0,7	2,5 ± 0,2	5,5 ± 0,9
PV	8,9 ± 0,4	6,2 ± 0,2	7,6 ± 0,2	11 ± 0,8	7,9 ± 0,7	9,4 ± 0,7

x – statisticky významný rozdíl ve srovnání s A30, p < 0,05.

a – statisticky významný rozdíl ve srovnání s A36, p < 0,05.

## Tabulka 2

Korigovaná relativní optická denzita neuropilu ± S.E.M. u CR a PV imunoreaktivity

	A29	A30	A35	A36
CR	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	4,7 ± 0,5	4,4 ± 0,6
PV	4,5 ± 0,7	4,4 ± 0,6	3,7 ± 0,4	5,1 ± 0,7



## 5. DISKUZE

Neokortikální formace savčího mozku se skládá ze dvou základních typů neuronů. 20 – 30 % korových neuronů tvoří lokální interneurony, exprimující inhibiční mediátor GABA, 70 – 80 % představuje excitační (projekční) glutamatergní neurony s prevažující pyramidovou morfologií. Další klasifikace korových interneuronů je založená na jejich neurochemickém fenotypu, na jejich funkčních vlastnostech a synaptologii. Expresí kalcium-vázáčích proteinů se ukázala jednou z možností na další parcelaci korových interneuronů. Calretinin a parvalbumin které jsou exprimovány výlučně v korových interneuronech, charakterizují dvě subpopulace, které se nepřekrývají, a významně se liší morfologií, synaptickými kontakty a funkčními vlastnostmi. Neurony exprimující CR a PV byly vybrány pro podrobnější stereologickou a denzitometrickou analýzu v PRC a RSC ve snaze porovnat inhibiční systém obou oblastí a přispět k objasnění jejich odlišných funkcí. Podrobná analýza CR+ a PV+ neuronů v těchto oblastech dosud nebyla provedena (Druga, 2009) a teprve nedávno byly publikovány naše výsledky (Barinka et al., 2012; Salaj et al., 2015).

Obě studované korové oblasti sice patří mezi přechodné korové formace mezi neokortexem a hippokampální formací, ale přechod do hippokampální formace je u obou odlišný. PRC je součástí korových oblastí, ke kterým patří entorhinální a postrhinální korová oblast, které věncovitě obkružují hippokampální formaci a které jsou někdy označovány jako „parahippokampální oblast“ (Furtak et al., 2007). PRC je v přímém kontaktu s entorhinální korovou oblastí na kterou navazují hippokampální pole. Naproti tomu retrosplenální oblast tvoří rozhraní mezi neokortexem a hippokampální formací, se kterou přímo sousedí. V přímém kontaktu s RSC jsou subikulární pole hippokampu.

Závažným nálezem naší studie je vyšší koncentrace CR+ neuronů a vyšší denzita CR v PRC ve srovnání s okolními neokortikálními oblastmi i ve srovnání s RSC. Naproti tomu počty PV+ neuronů a denzita PV byla v obou vyšetřovaných oblastech obdobná a příliš se nelišila od okolních neokortikálních oblastí, s výjimkou A35 kde byla denzita PV a procentuální zastoupení PV+ neuronů nižší, viz obr. 2 a 5 a tab. 1B a 2.

### 5.1. Začlenění obou typů neuronů do korových okruhů

PV+ neurony jsou významnou populací lokálních inhibičních (GABAergních) interneuronů a představují cca 25% všech GABAergních neuronů. Převažují ve III. a IV.

korové vrstvě. Jejich morfologickým korelátém jsou košíčkové buňky (basket cells) a svícnové buňky (chandelier cells). Jejich axonální ramifikace je orientována převážně horizontálně. V mnoha korových oblastech byly prokázány na PV+ neuronech kromě chemických synapsí i synapse elektrické. V neokortikální formaci jsou PV neurony pod synaptickým vlivem lokálních excitačních interneuronů a pod vlivem excitační thalamokortikální projekce. Inhibiční působení PV+ neuronů je přenášeno převážně na excitační pyramidové a hvězdčité neurony (spiny stellate cells). Vliv excitační thalamokortikální projekce je z PV+ interneuronů přenášen na excitační interneurony (spiny stellate cells) a na pyramidové neurony, které jsou následně inhibovány. Tento vliv je dobře prostudován ve IV. korové vrstvě, která je považována za „inhibiční bránu“ a základní mechanismus při zpracování sensorické informace. Z funkčního hlediska patří do kategorie „fast-spiking neurons“. Na základě mnoha experimentálních údajů pořízených in vivo i in vitro je možno PV+ neurony považovat za základní a velmi výkonný inhibiční korový mechanismus zodpovědný za perisomatickou a v menší míře i za axo-axonální inhibici eferentních (excitačních) korových neuronů. Výsledky získané kvantitativní analýzou v této studii svědčí pro to, že je tomu tak i v PRC a RSC (Barinka et al. 2012; Druga, 2009; Hirsch a Martinez, 2006; Salaj et al., 2015; Winer et al., 2005).

CR+ neurony se v mnoha ohledech odlišují od neuronů exprimujících PV. Vyskytují se ve všech korových vrstvách s převahou ve vrstvách supragranulárních (II.-III.), což potvrdili i naše výsledky v obou studovaných korových oblastech. Představují cca 10-30 % z celkové populace GABAergních interneuronů.

Většina (70 – 90%) CR+ korových neuronů u potkana koexprimuje neuropeptid VIP, u zbývajících byla prokázána koexprese somatostatinu. Většina CR+ neuronů vykazuje bipolární morfologii somatodendritické domény, méně častá je multipolární morfologie. Axonální ramifikace je u bipolárních neuronů orientována vertikálně, zatímco u multipolárních neuronů spíše horizontálně. Membránové charakteristiky CR+ neuronů podmiňují jejich snadnou depolarizaci malými excitačními synaptickými proudy a jejich specifické integrativní vlastnosti.

Synaptické kontakty dostávají z mnoha zdrojů, mezi nimiž jsou excitační korové neurony, inhibiční korové interneurony a z mnoha podkorových struktur (thalamus, serotoninergní, dopaminergní, noradrenergní a cholinergní projekce). Axonální terminace byly prokázány převážně na dendritech ostatních interneuronů, včetně CR+ neuronů. CR+ neurony patří do kategorie „non-fast spiking neurons“ a generují vzruchovou aktivitu, která má nepravidelný charakter, nebo jsou vytvářeny shluky vzruchů (adapting bursting).

CR+ neurony mají inhibiční vliv na ostatní inhibiční neurony a potlačují tak inhibici pyramidových neuronů. V poslední době se prosazuje názor, že CR+ neurony patří mezi elementy s komplexními funkcemi, které jsou součástí všech významných mechanismů podporujících neuronální funkce včetně kontroly cirkulace a metabolismu (Cauli et al., 2014; Druga, 2009; Gonchar a Burkhalter, 1997; Zaitsev et al., 2005;).

## 5.2. Funkce PRC

Area 35 a 36 mají kromě strukturálních rozdílů i rozdíly v uspořádání spojů. Zatímco area 35 dostává silné spoje z čichové korové oblasti (piriformní kůra), area 36 dostává silné spoje z ventrální asociační temporální oblasti (area TeV). Spoje mezi postrhinální korovou oblastí a area 36 jsou silnější než mezi PostRH a area 35. PRC vysílá silné projekce do laterální EC, která následně projikuje do hippocampu. PRC dostává thalamické aferentace z LD a z AM jader a další podkorové projekce z amygdaly. PRC je považována za jednu z konečných stanic „ventrálního proudu zrakových informací“ jehož funkcí je analýza objektu, jeho tvar, barva a povrchové charakteristiky (Watson a Lee, 2013).

Při definování funkcí PRC se zdůrazňuje percepce a identifikace objektů, rozlišení objektů a vyhodnocování podobnosti objektů. V zásadě jde o změny neuronálních aktivit na otázku „CO“. PRC je kromě toho považována za zdroj sensorických informací pro laterální entorhinální oblast (LEC). PRC se pravděpodobně neúčastní procesu identifikace objektu v prostoru. (Deshmukh et al., 2012).

Kromě uvedených funkcí je PRC považována za přechodnou neo-allokortikální oblast, která má tlumivý vliv na přenos signálů mezi neokortikální formací a hippocampem. Analýza šíření signálů z neokortexu via PRC do entorhinální kůry (EC) prokázala velmi nízkou pravděpodobnost vzruchové aktivity mezi PRC a EC. PRC tedy může být považován za filtr, který významně omezuje obousměrný transfer signálů mezi neokortexem a hippocampem (de Curtis a Paré, 2004). Pro vysvětlení tohoto fenoménu tito autoři předpokládají specifický inhibiční mechanismus, jehož substrátem jsou pravděpodobně GABAergní interneurony exprimující kalcium-vážící proteiny v povrchních vrstvách PRC. Autoři předpokládají účast PV+ a CR+ neuronů (de Curtis a Pare, 2004; Wouterlood et al., 2000). Tento předpoklad můžeme potvrdit. Inhibiční mechanismus PRC je tvořen základním populací PV+ neuronů, která se v PRC příliš neliší od okolního neokortexu a vysokou koncentrací CR+ neuronů. Perisomatická a axo-axonální inhibice zajišťovaná PV+ neurony má tlumivý vliv na aktivitu pyramidových neuronů v dané korové oblasti, ale pravděpodobně sama nestačí na utlumení

přenosu aktivity v PRC. Pro vysvětlení působení CR+ neuronů je však třeba znát vliv této populace na aktivity korových mikrookruhů v PRC. Struktura těchto okruhů však zatím není známa.

### 5.3. Funkce RSC

V celé řadě funkčních experimentů byla opakovaně prokázána účast RSC na navigaci v prostoru a na prostorové paměti. RSC integruje prostorové charakteristiky okolního prostředí (allothetické) s informacemi, které monitorují pohyb organismu (idiothetické). Při vyřazení allothetických informací jsou pro navigaci důležité informace z proprioreceptorů, vestibulárních receptorů a somatosensorické informace. Idiothetické informace jsou transportovány do hippocampu prostřednictvím parietální, entorhinální a RSC korové oblasti (Elduayen a Save, 2014).

Mezi granulární a dysgranulární oblastí RSC existují funkční rozdíly. Granulární oblast se účastní prostorového učení a paměti ve světle i ve tmě, zatímco dysgranulární oblast je aktivována při řešení úkolů prostorové paměti pouze ve světle. Granulární oblast přispívá k prostorovému učení a k navigaci s využitím informací ze zevního i vnitřního prostředí organismu, zatímco dysgranulární oblast je selektivně aktivována při úkolech využívajících informací ze zevního prostředí (např. vzdálené zrakové podněty) (Pothuizen et al., 2009). Nicméně celá řada experimentálních výsledků svědčí pro významnou účast RSC při řešení úkolů prostorové navigace při vyřazení zrakových podnětů (ve tmě) (Cooper et al., 2001; Whishaw et al., 2001).

I když výsledky experimentálního poškození RSC nejsou jednoznačné a rozdíly jsou připisovány výběru testů a kmeni experimentálních potkanů je zřejmé, že léze vyvolává poruchy navigace v prostoru (Morrisovo vodní bludiště, radiální bludiště) (pro přehled viz Harker a Whishaw, 2004a; Harker a Whishaw, 2004b).

Léze RSC u pacientů (zpravidla krvácení nebo tumory v oblasti splenium corporis callosi) prokázaly poruchy při používání značek (landmarks) pro navigaci v prostoru. Obdobné jsou výsledky funkční MR. RSC podporuje allocentrickou reprezentaci zpracováním stabilních (konstantních-neproměnných) znaků (charakteristik) v zevním prostředí a jejich prostorových vztahů. RSC rovněž přispívá společně s hippocampální formací k vypracování a konsolidaci dlouhodobé prostorové a kontextuální paměti. Allocentrická reprezentace v RSC se vyvíjí pomalu a je závislá na opakovaných aktivitách hippocampových „place cells“ (Warburton a Brown, 2015). Burgess (Burgess, 2008) vypracoval koncept prostorového

učení a orientace, podle kterého hippokampus a další mediální temporální struktury zajišťují allocentrickou reprezentaci okolního prostředí, parietální lalok (kůra) zajišťuje egocentrickou reprezentaci a integrace mezi oběma reprezentacemi se odehrává v retrosplenální korové oblasti. Pokud se pravdivost tohoto modelu potvrdí, bude to znamenat další podporu konceptu, podle kterého RSC integruje informace několika prostorových reprezentací.

## 6. Závěr

V předkládané studii jsou shrnuty výsledky naší práce zaměřené na studium inhibičního systému ve dvou korových oblastech – perirhinální a retrosplenální, které tvoří přechod mezi neokortexem a hippokampální formací. Analýza byla zaměřena na dvě populace korových inhibičních (GABAergních) interneuronů exprimujících kalcium-vážíci proteiny Parvalbumin a Calretinin. Obě studované populace interneuronů jsou v literatuře definovány z hlediska somatodendritické morfologie, funkčních vlastností a zapojení do korových mikrookruhů.

Naše analýza byla zaměřena na laminární distribuci těchto interneuronů, na jejich somatodendritickou morfologii, na jejich densitu a na optickou densitu parvalbuminu a calretininu v perirhinální a retrosplenální korové oblasti.

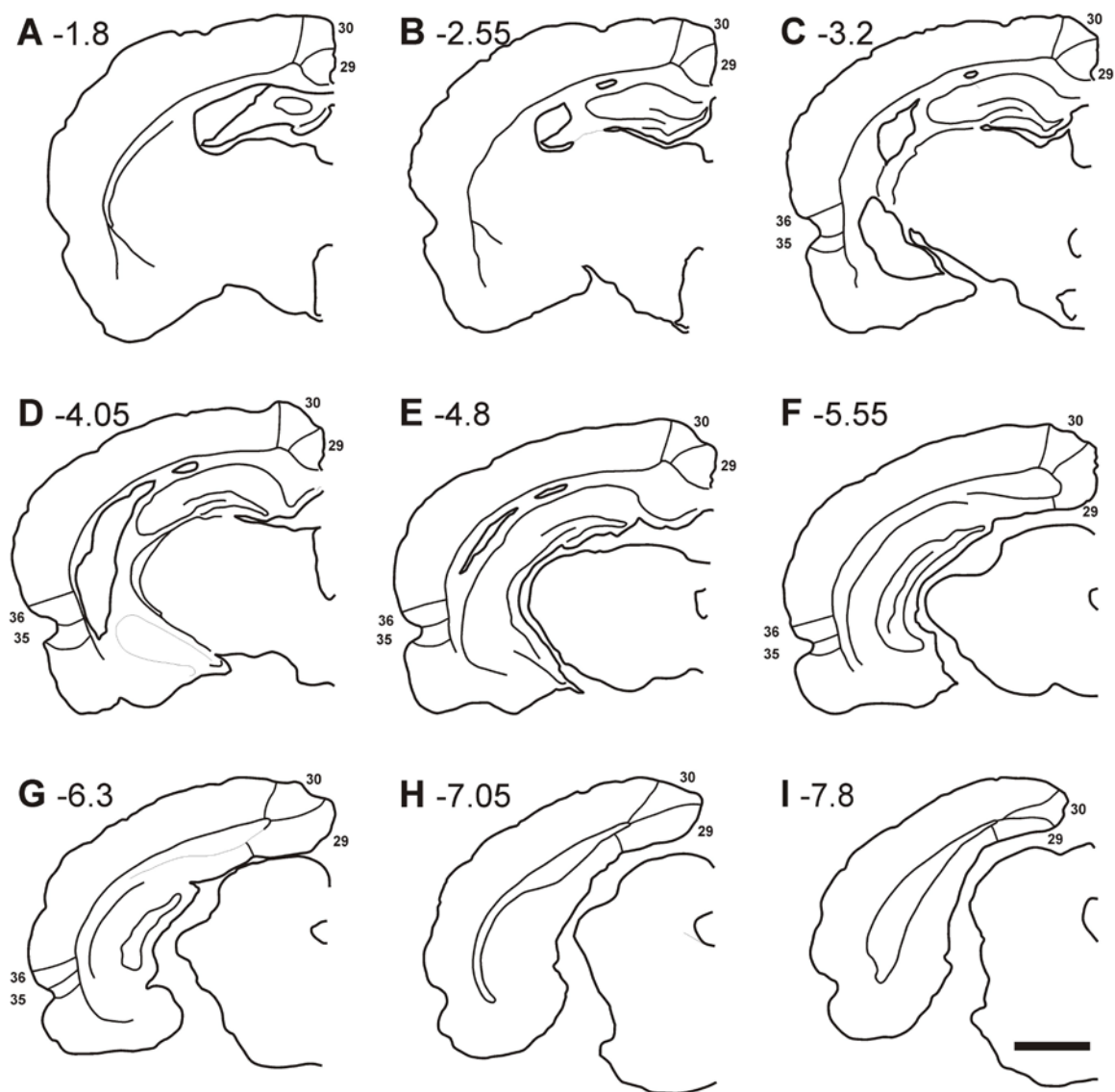
Kvalitativní i kvantitativní analýza byla provedena na mozcích osmi dospělých potkanů kmene Wistar. Mozek experimentálních zvířat byl perfundován a fixován a po postfixaci byly řezy obarveny kresylvioletí a zpracovány imunohistochemickými metodami na průkaz calretininu a parvalbuminu. Po kvalitativní analýze materiálu byly obě vybrané oblasti zpracovány stereologickou a denzitometrickou metodou. Byly tak získány údaje o denzitě CR a PV pozitivních neuronů a údaje o denzitě obou proteinů ve studovaných korových oblastech.

Denzitometrická analýza prokázala vyšší hodnoty optické denzity calretininu a nižší hodnoty parvalbuminu v perirhinální oblasti ve srovnání s okolním neokortexem. Obdobně byla prokázána vyšší denzita calretinin- pozitivních neuronů. Naproti tomu v retrosplenální oblasti byly prokázány vyšší hodnoty optické denzity parvalbuminu a nižší hodnoty calretininu. V retrosplenální oblasti je nižší denzita calretinin i parvalbumin pozitivních neuronů.

I když jsou si retrosplenální a perirhinální oblasti v mnoha ohledech podobné, byly prokázány významné rozdíly ve složení interneuronálních populací. Vysoká koncentrace calretininu a vysoké hodnoty denzity calretinin-positivních neuronů v perirhinální oblasti mohou být substrátem mechanismu, který je zodpovědný za tlumení přenosu neuronálních aktivit z neokortexu do hippokampu prostřednictvím perirhinální a entorhinální korové oblasti.

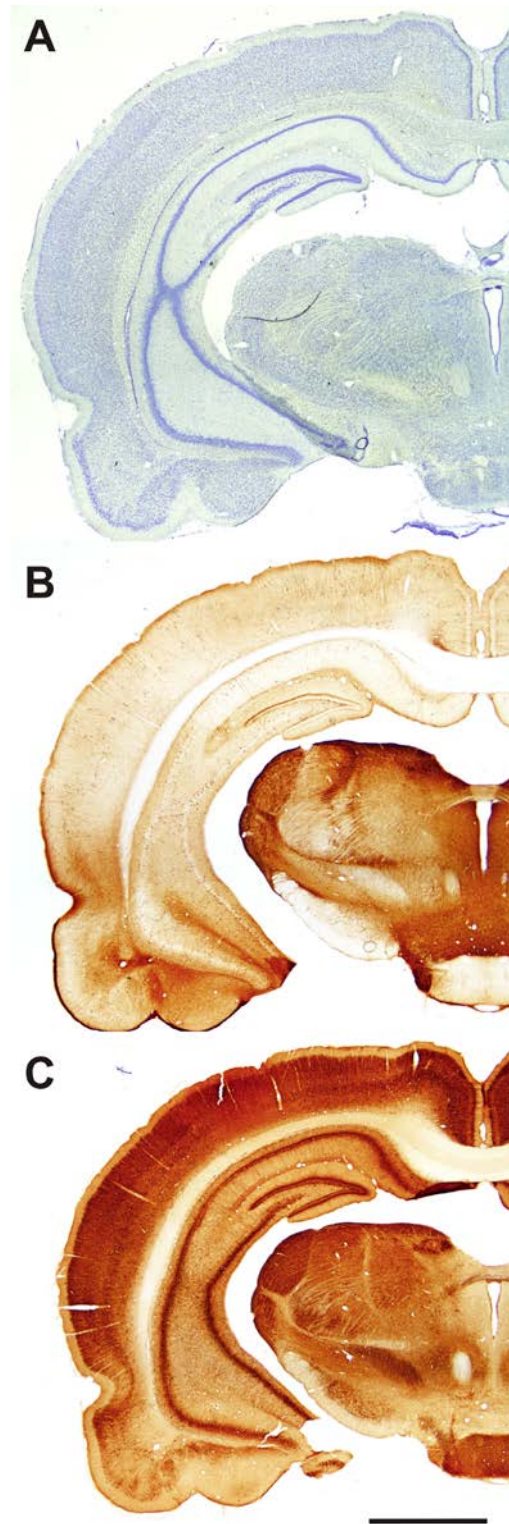
## 7. Obrázky

Obr. 1.



Obr. 1 Schematické znázornění polohy perirhinálních oblastí A35 a A36 a retrospleniálních oblastí A29 a A30 na frontálních řezech v různých rostrokaudálních úrovních. Vzdálenosti od bregmatu jsou dle atlasu (Paxinos a Watson, 2007). Měřítko = 2 mm.

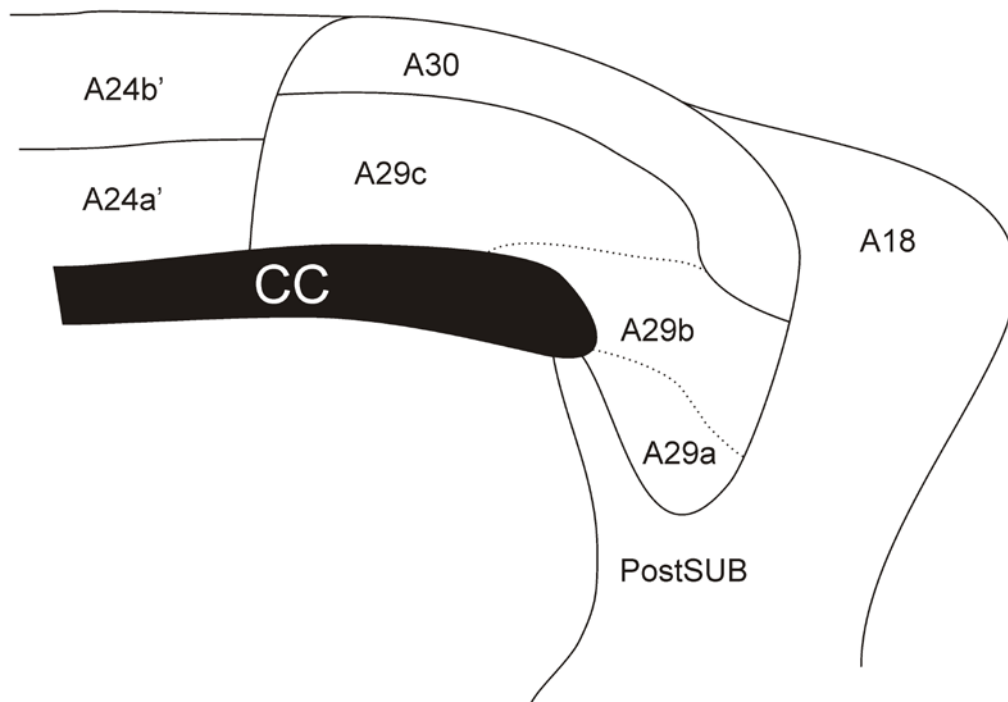
Obr. 2



Obr. 2 Reprezentativní mikrofotografie demonstrující barvení celé hemisféry potkaního mozku barvením podle Nissla (A) a pomocí imunohistochemického průkazu calretininu (B) a parvalbuminu (C). Znáznorněné jsou za sebou následující koronární řezy, ve vzdálenosti přibližně -4,6 mm AP (anteroposteriorně) od bregmatu (podle atlasu Paxinos a Watson, 2007). Měřítko = 2 mm.

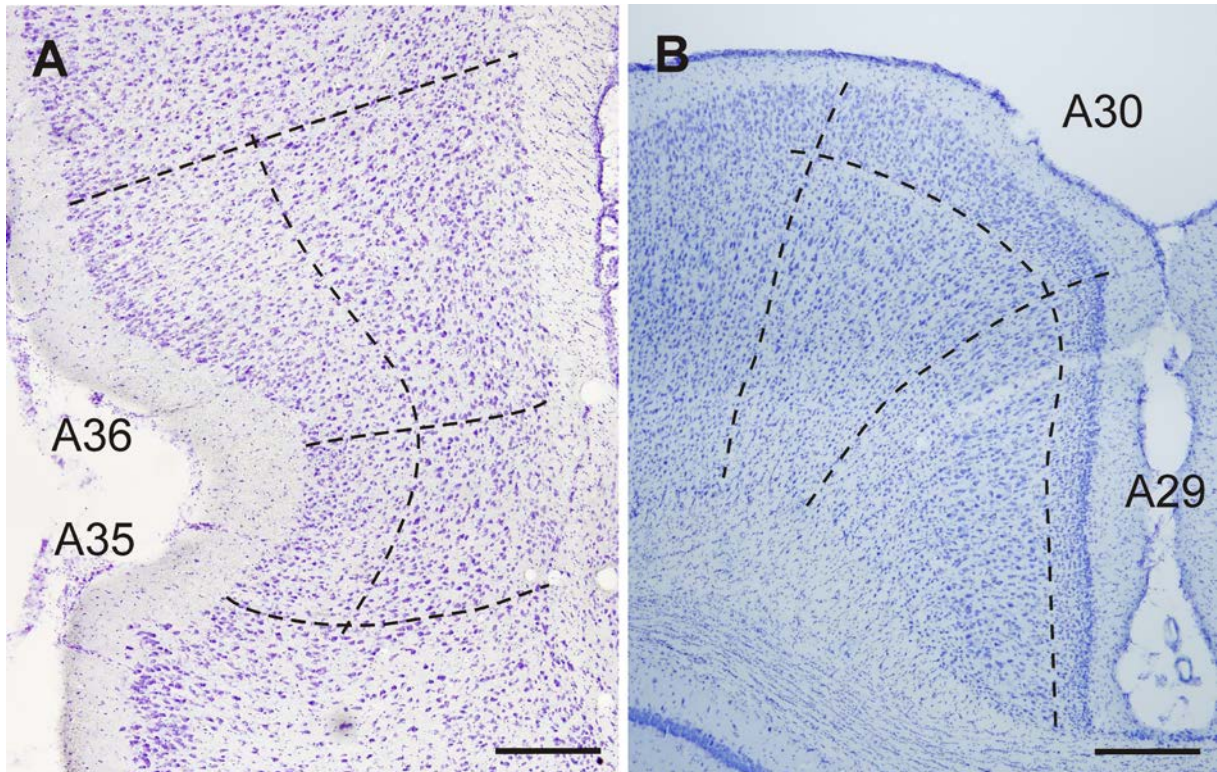


**Obr. 3**



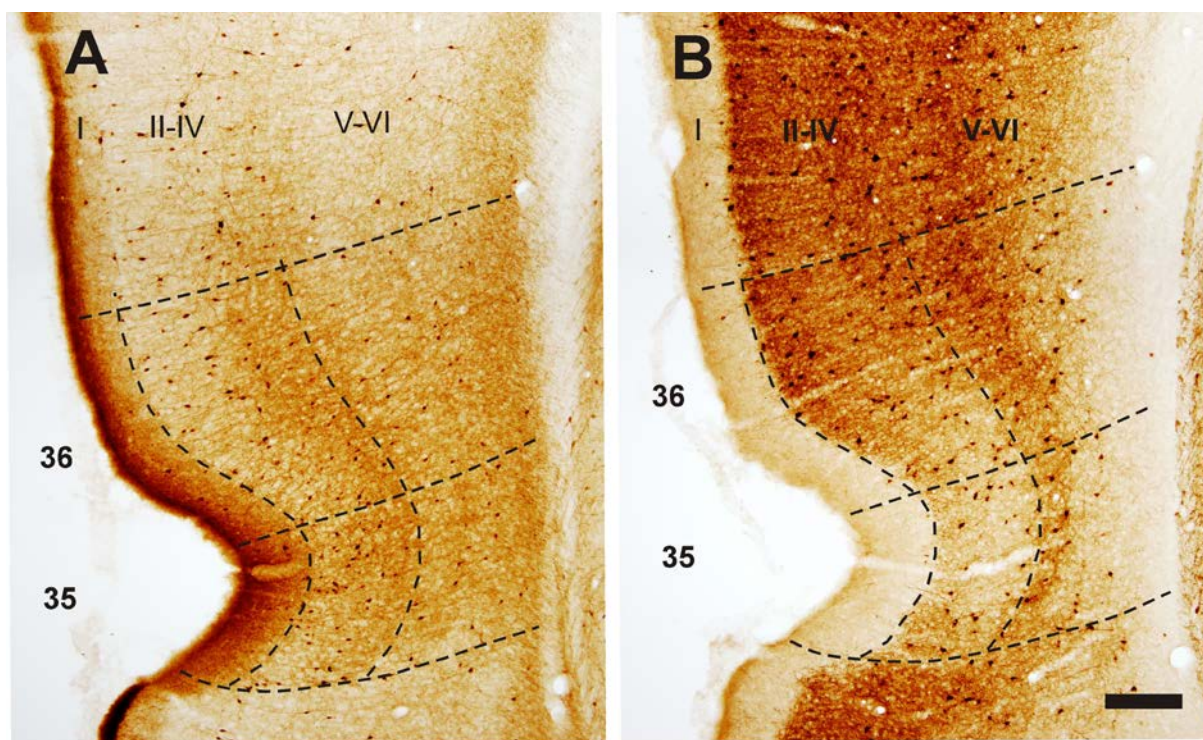
Obr. 3 Schematické znázornění vzájemné polohy jednotlivých retrosplenálních oblastí, mediální pohled.

Obr. 4



Obr. 4 Reprezentativní mikrofotografie demonstrující cytoarchitektoniku v PRC (A) a v RSC (B) na řezech barvených podle Nissla. Vyznačeny jsou hranice mezi jednotlivými korovými oblastmi a mezi povrchovými (II.-IV.) a hlubokými (V.-VI.) korovými vrstvami. Pro přehlednost není vyznačena hranice mezi I. a II. korovou vrstvou. Lokalizováno na úrovni -4,05 mm (A) a -3,55 mm (B) anteroposteriorně od bregmatu. Měřítko = 300  $\mu$ m

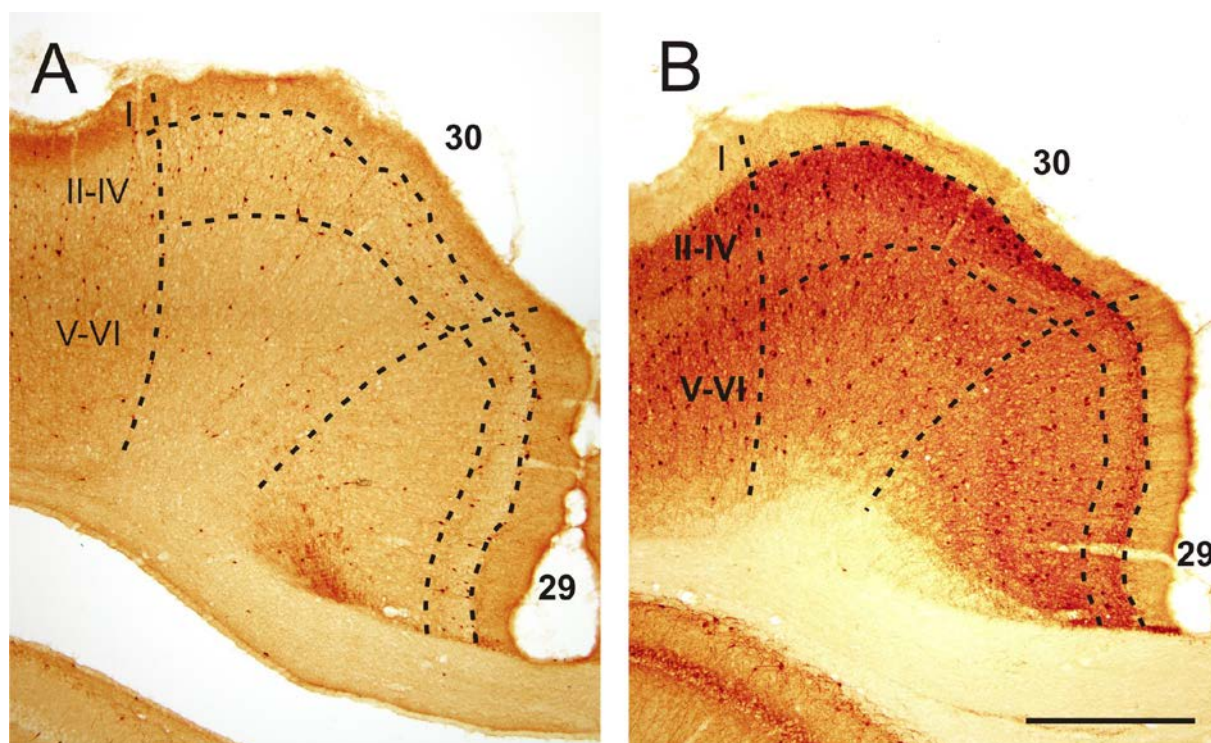
Obr. 5



Obr. 5 Reprezentativní mikrofotografie ilustrující rozložení imunoreaktivity calretininu (A), a parvalbuminu (B) v korových areách A35 a A36 s vyznačením hranic oblastí a korových vrstev. Lokalizováno na úrovni -5,05 mm anteroposteriorně od bregmatu. Měřítko = 200  $\mu$ m.

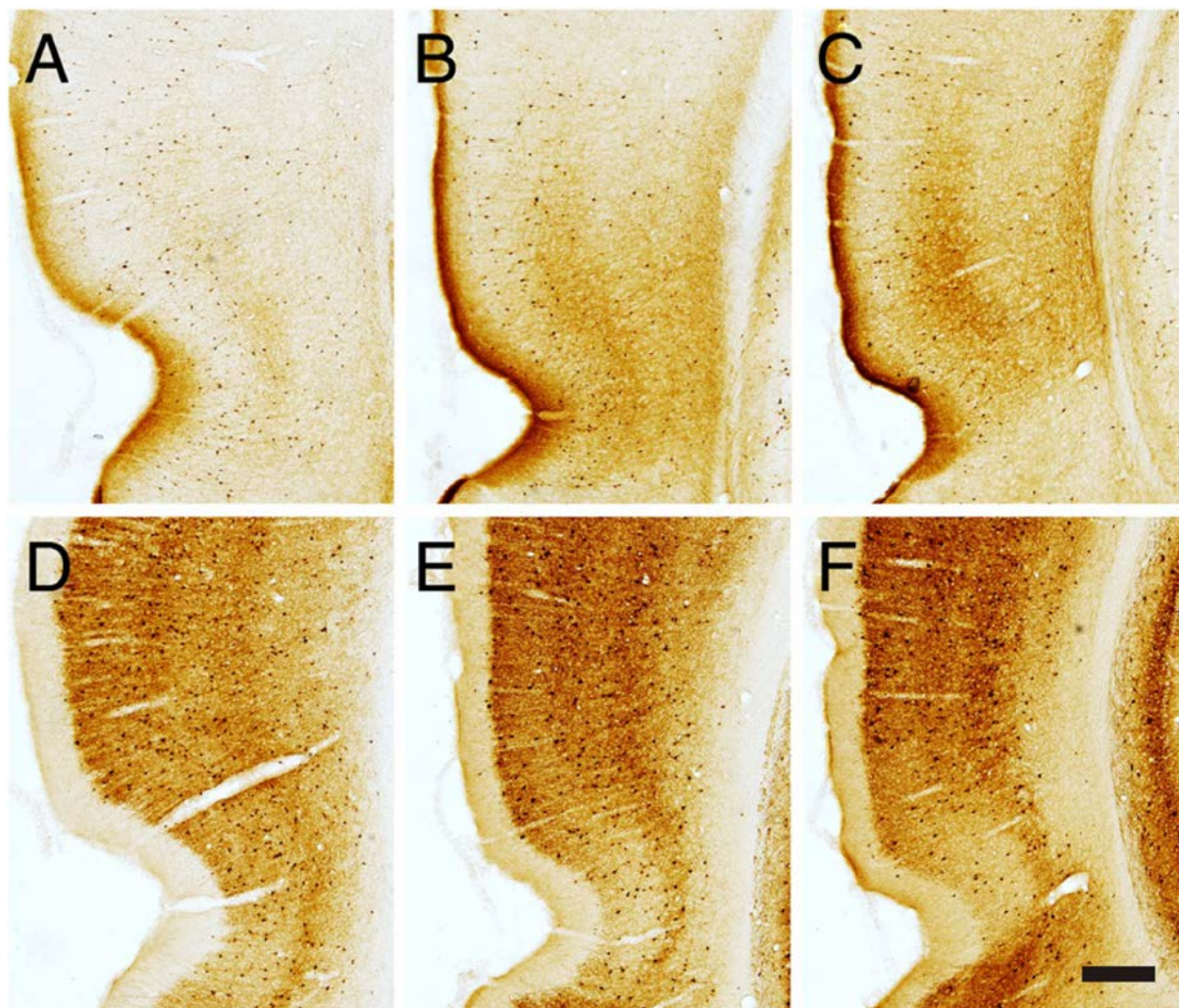


Obr. 6



Obr. 6 Reprezentativní mikrofotografie ilustrující rozložení imunoreaktivity calretininu (A), a parvalbuminu (B) v korových areách A29 a A30 s vyznačením hranic oblastí a korových vrstev. Lokalizováno na úrovni -4,05 mm anteroposteriorně od bregmatu. Měřítko = 500  $\mu$ m.

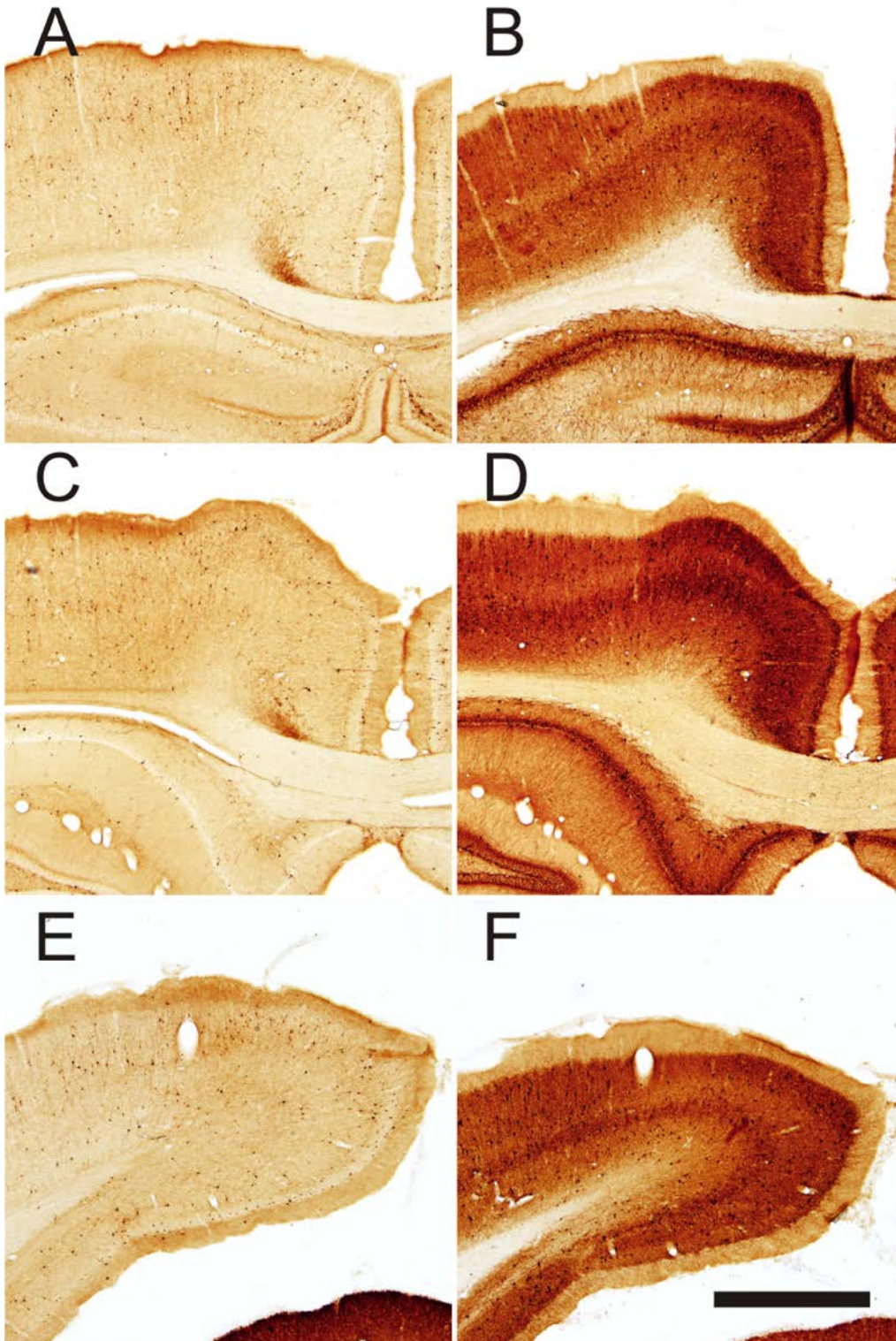
Obr. 7



Obr. 7 Reprezentativní mikrofotografie ilustrující rozložení imunoreaktivitu calretininu (A, B, C), a parvalbuminu (D, E, F) ve studovaných oblastech PRC v různých rostrocaudálních úrovních. Lokalizace přibližně -3,96 mm (A, D), -5,04 mm (B, E) a -6,00 mm (C, F) anteroposteriorně od bregmatu (Paxinos a Watson, 2007). Měřítko = 100  $\mu$ m.

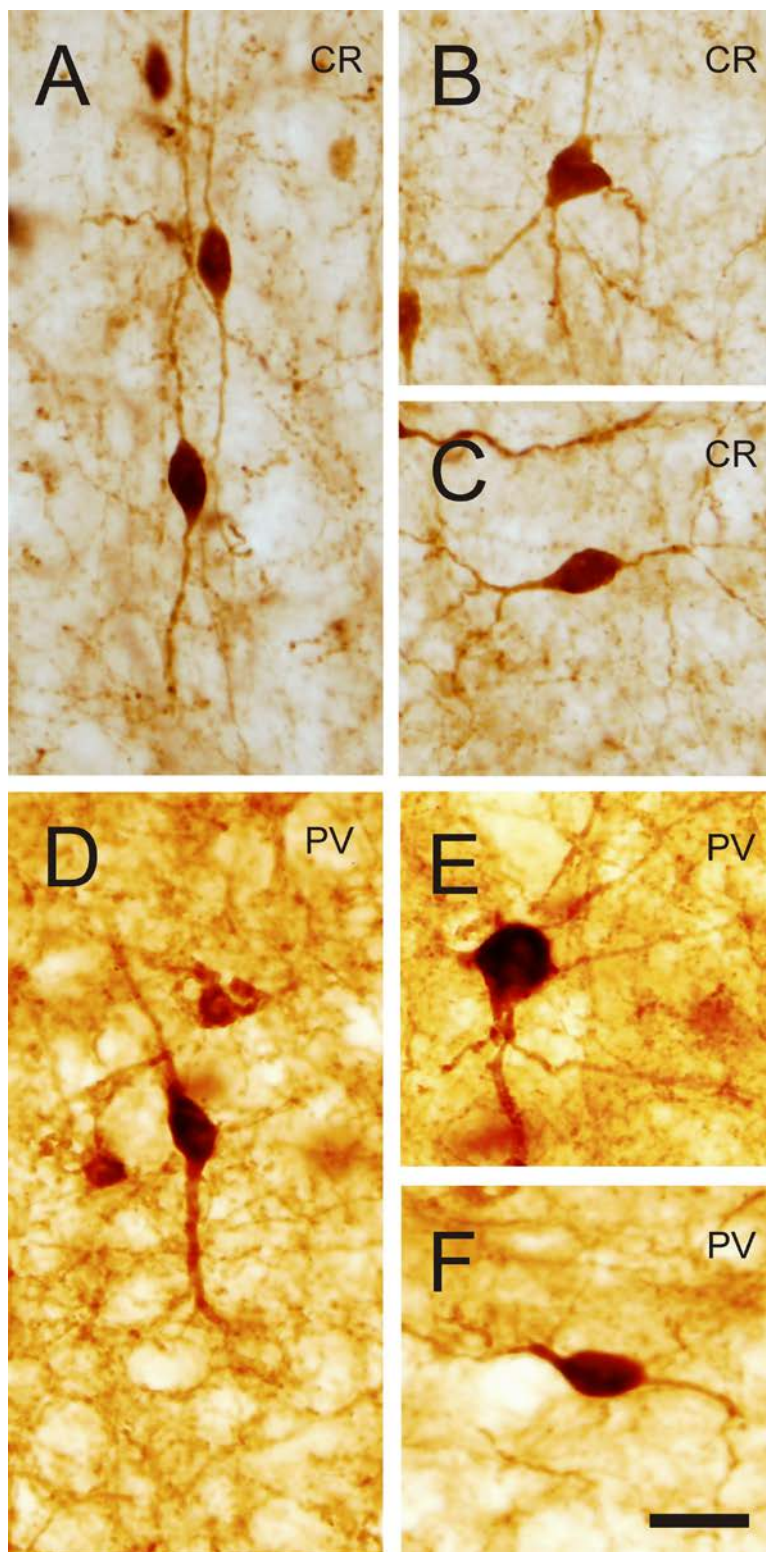


Obr. 8



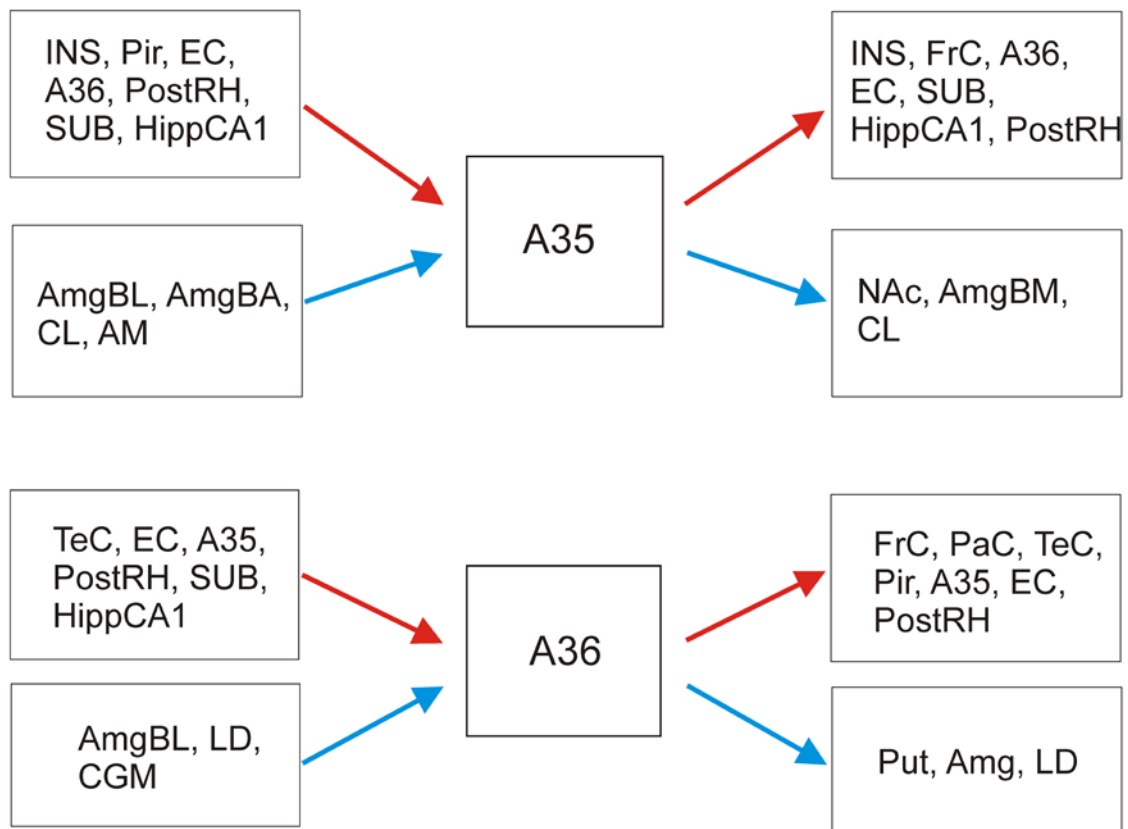
Obr. 8 Reprezentativní mikrofotografie ilustrující rozložení imunoreaktivitu calretininu (A, C, E), a parvalbuminu (B, D, F) ve studovaných oblastech RSC v různých rostrokaudálních úrovních. Lokalizace přibližně -2,3 mm (A, B), -4,3 mm (C, D) a -7,05 mm (E, F) anteroposteriorně od bregmatu (Paxinos a Watson, 2007). Měřítka = 500  $\mu$ m.

Obr. 9



Obr. 9 Příklady různých morfoložických typů CR+ (A, B a C) a PV+ (D, E, F) neuronů ve studovaných oblastech. Vertikálně orientované bipolární / „bitufted“ neurony (A, D), multipolární neurony (B, E) a horizontálně orientované bipolární / „bitufted“ neurony (C, F). Měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .

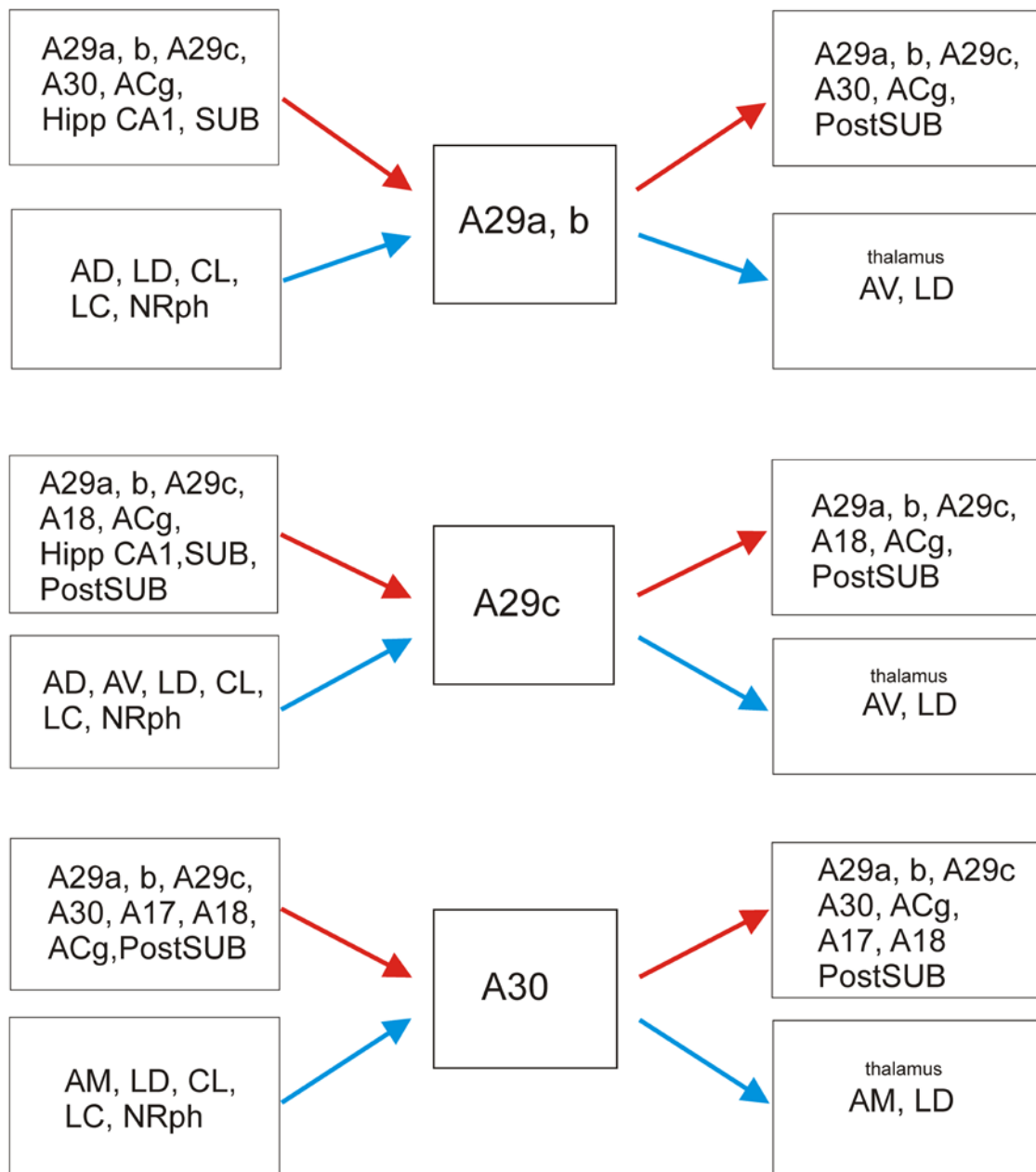
Obr. 10



Obr. 10 Schematické znázornění nejdůležitějších aferentních (vlevo) a eferentních (vpravo) spojení v perirhinální kůře. Červené šipky – korové spoje, modré šipky – podkorové spoje.

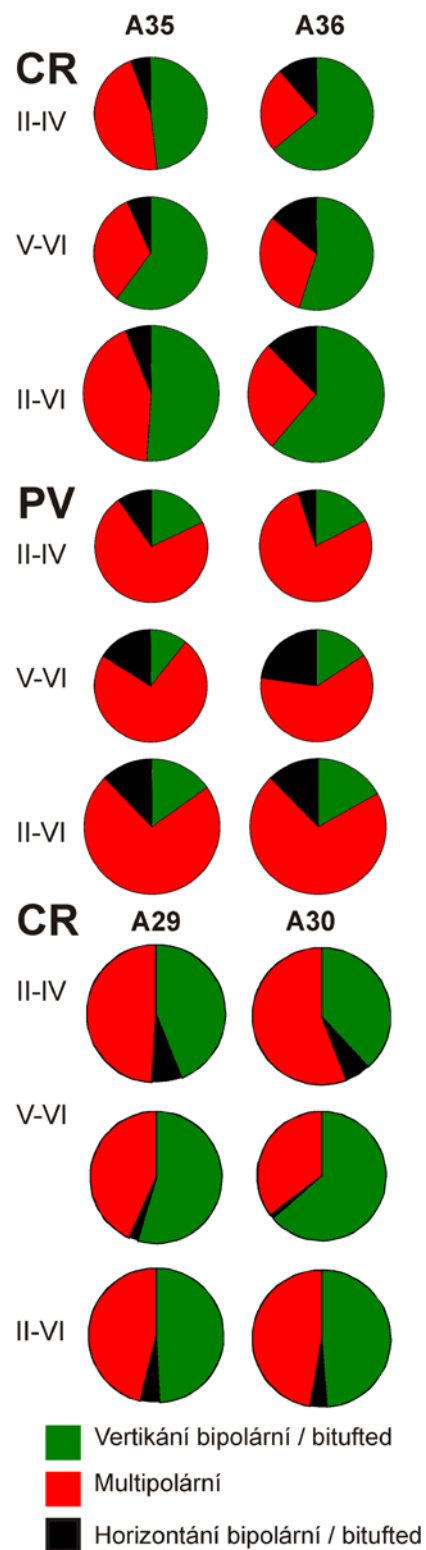


Obr. 11



Obr. 11 Schematické znázornění nejdůležitějších aferentních (vlevo) a eferentních (vpravo) spojení v retrosplenální kůře. Červené šipky – korové spoje, modré šipky – podkorové spoje.

Obr. 12



Obr. 12 Výšečové grafy ilustrující zastoupení jednotlivých morfologických typů studovaných CR+ a PV+ neuronů v jednotlivých oblastech a vrstvách. II-VI. korové vrstvy. Nejsou zahrnuty PV+ neurony v RSC, viz. kapitola 4.2.2. Morfologie neuronů.

## 8. Seznam použité literatury

- Barger, N., L. Stefanacci, et al. (2012) "Neuronal populations in the basolateral nuclei of the amygdala are differentially increased in humans compared with apes: a stereological study." J Comp Neurol 520(13): 3035-54.
- Barinka, F. and R. Druga (2010). "Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review." Physiol Res 59(5): 665-77.
- Barinka, F., M. Salaj, et al. (2012). "Calretinin, parvalbumin and calbindin immunoreactive interneurons in perirhinal cortex and temporal area Te3V of the rat brain: qualitative and quantitative analyses." Brain Res 1436: 68-80.
- Brodman K. (1909). Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth, 1909.
- Burgess, N. (2008). "Spatial cognition and the brain." Ann N Y Acad Sci 1124: 77-97.
- Burwell, R. D. (2000). "The parahippocampal region: corticocortical connectivity." Ann N Y Acad Sci 911: 25-42.
- Burwell, R. D. (2001). "Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat." J Comp Neurol 437(1): 17-41.
- Burwell, R. D. and D. G. Amaral (1998). "Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat." J Comp Neurol 398(2): 179-205.
- Burwell, R. D. and D. G. Amaral (1998). "Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex." J Comp Neurol 391(3): 293-321.
- Burwell, R. D., M. P. Witter, et al. (1995). "Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain." Hippocampus 5(5): 390-408.
- Cauli, B., X. Zhou, et al. (2014). "Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons." Front Neuroanat 8: 52.
- Cooper, B. G., T. F. Manka, et al. (2001). "Finding your way in the dark: the retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues." Behav Neurosci 115(5): 1012-28.
- de Curtis, M. and D. Pare (2004). "The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus." Prog Neurobiol 74(2): 101-10.
- DeFelipe, J., P. L. Lopez-Cruz, et al. (1997). "New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons." Nat Rev Neurosci 14(3): 202-16.

- del Rio, M. R. and J. DeFelipe (1996). "Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex." J Comp Neurol 369(3): 472-82.
- Deshmukh, S. S., J. L. Johnson, et al. (2012). "Perirhinal cortex represents nonspatial, but not spatial, information in rats foraging in the presence of objects: comparison with lateral entorhinal cortex." Hippocampus 22(10): 2045-58.
- Druga, R. (2009). "Neocortical inhibitory system." Folia Biol (Praha) 55(6): 201-17.
- Elduayen, C. and E. Save (2014). "The retrosplenial cortex is necessary for path integration in the dark." Behav Brain Res 272: 303-7.
- Furtak, S. C., S. M. Wei, et al. (2007). "Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices." Hippocampus 17(9): 709-22.
- Gabbott, P. L. and S. J. Bacon (1996). "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 364(4): 567-608.
- Gonchar, Y. and A. Burkhalter (1997). "Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex." Cereb Cortex 7(4): 347-58.
- Gundersen, H. J. and E. B. Jensen (1987). "The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction." J Microsc 147(Pt 3): 229-63.
- Harker, K. T. and I. Q. Whishaw (2004). "Impaired place navigation in place and matching-to-place swimming pool tasks follows both retrosplenial cortex lesions and cingulum bundle lesions in rats." Hippocampus 14(2): 224-31.
- Harker, K. T. and I. Q. Whishaw (2004). "A reaffirmation of the retrosplenial contribution to rodent navigation: reviewing the influences of lesion, strain, and task." Neurosci Biobehav Rev 28(5): 485-96.
- Hirsch, J. A. and L. M. Martinez (2006). "Circuits that build visual cortical receptive fields." Trends Neurosci 29(1): 30-9.
- Hof, P. R., Glezer, II, et al. (1999). "Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns." J Chem Neuroanat 16(2): 77-116.
- Hof, P. R., E. A. Nimchinsky, et al. (1993). "Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease." Neurosci Lett 152(1-2): 145-8.
- Ichinohe, N. (2012). "Small-scale module of the rat granular retrosplenial cortex: an example of the minicolumn-like structure of the cerebral cortex." Front Neuroanat 5: 69.

- Ichinohe, N. and K. S. Rockland (2002). "Parvalbumin positive dendrites co-localize with apical dendritic bundles in rat retrosplenial cortex." Neuroreport 13(6): 757-61.
- Kawaguchi, Y. and Y. Kubota (1997). "GABAergic Cell Subtypes and their Synaptic Connections in Rat Frontal Cortex." Cerebral Cortex 7(6): 476-486.
- Kubota, Y., R. Hattori, et al. (1994). "Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex." Brain Res 649(1-2): 159-73.
- Markram, H., M. Toledo-Rodriguez, et al. (2004). "Interneurons of the neocortical inhibitory system." Nat Rev Neurosci 5(10): 793-807.
- Morgan, J. T., N. Barger, et al. (2014). "Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder." PLoS One 9(10): e110356.
- Paxinos, G., Watson, C., (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Oxford: Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Pothuizen, H. H., M. Davies, et al. (2009). "Granular and dysgranular retrosplenial cortices provide qualitatively different contributions to spatial working memory: evidence from immediate-early gene imaging in rats." Eur J Neurosci 30(5): 877-88.
- Salaj, M., R. Druga, et al. (2015). "Calretinin and parvalbumin immunoreactive interneurons in the retrosplenial cortex of the rat brain: Qualitative and quantitative analyses." Brain Res 1627: 201-15.
- Toledo-Rodriguez, M., B. Blumenfeld, et al. (2004). "Correlation maps allow neuronal electrical properties to be predicted from single-cell gene expression profiles in rat neocortex." Cereb Cortex 14(12): 1310-27.
- Toledo-Rodriguez, M., P. Goodman, et al. (2005). "Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat." J Physiol 567(Pt 2): 401-13.
- Van Groen, T. and J. M. Wyss (1990). "Connections of the retrosplenial granular a cortex in the rat." J Comp Neurol 300(4): 593-606.
- Van Groen, T. and J. M. Wyss (1992). "Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat." J Comp Neurol 315(2): 200-16.
- Van Groen, T., Vogt, B. A., Wyss, J. M., (1993). Interconnections between the thalamus and retrosplenial cortex in the rodent brain. In: Vogt, B. A. and Gabriel, M., (Eds.), *Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus*. Birhauser, Boston, pp. 19-70.
- Van Groen, T. and J. M. Wyss (2003). "Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat." J Comp Neurol 463(3): 249-63.

- Vogt, B. A. and G. Paxinos (2014). "Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies." Brain Struct Funct 219(1): 185-92.
- Vogt, B. A. and A. Peters (1981). "Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24, and 29." J Comp Neurol 195(4): 603-25.
- Vogt, B. A., (1993). Structural organization of cingulate cortex: Areas, neurons and somatodendritic transmitter receptors. In: Vogt, B. A. and Gabriel, M., (Eds.), *Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus*. Birhauser, Boston, pp. 19-70.
- Vogt, B. A., Vogt, L., Farber, N.B., (2004). Cingulate cortex and disease models. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System 3th Edition* Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 705–727 London.
- Warburton, E. C. and M. W. Brown, (2015). "Neural circuitry for rat recognition memory." Behav Brain Res 285: 131-9.
- Watson, H. C. and A. C. Lee, (2013). "The perirhinal cortex and recognition memory interference." J Neurosci 33(9): 4192-200.
- West, M. J., L. Slomianka, et al. (1991). "Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator." Anat Rec 231(4): 482-97.
- Whishaw, I. Q., H. Maaswinkel, et al. (2001). "Deficits in allothetic and idiothetic spatial behavior in rats with posterior cingulate cortex lesions." Behav Brain Res 118(1): 67-76.
- Winer, J. A., L. M. Miller, et al. (2005). "Auditory thalamocortical transformation: structure and function." Trends Neurosci 28(5): 255-63.
- Witter, M.P., Amaral, D.G., (2004). Hippocampal formation. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System 3th Edition* Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 635–704 London.
- Wouterlood, F. G., J. C. van Denderen, et al. (2000). "Calretinin in the entorhinal cortex of the rat: distribution, morphology, ultrastructure of neurons, and co-localization with gamma-aminobutyric acid and parvalbumin." J Comp Neurol 425(2): 177-92.
- Yuste, R. (2005). "Origin and classification of neocortical interneurons." Neuron 48(4): 524-7.
- Zaitsev, A. V., G. Gonzalez-Burgos, et al. (2005). "Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex." Cereb Cortex 15(8): 1178-86.

Zaitsev, A. V., N. V. Povysheva, et al. (2009). "Interneuron diversity in layers 2-3 of monkey prefrontal cortex." Cereb Cortex 19(7): 1597-615.

## 9. Přílohy

### 9.1. Seznam publikací autora ve vztahu k tématu práce

1. Barinka F, **Salaj M**, Rybář J, Kubová H, Druga R.  
Calretinin, parvalbumin and calbindin immunoreactive interneurons in perirhinal cortex and temporal ares Te3V of the rat brain: qualitative and quantitative analysis.  
Brain res 2012; 1436: 68-80.

#### IF 2. 728

2. **Salaj M.**, Druga R., Cerman J., Kubová H., Barinka F.  
Calretinin and parvalbumin immunoreactive interneurons in the retrosplenial cortex of the rat brain: qualitative and quantitative analyses  
Brain res 2015; 1627:201-15.

#### IF 2.843

### 9.2. Seznam ostatních publikací autora

1. Szczurowska E, Ergang P, Kubová H, Druga R, **Salaj M**, Mareš P.  
Influence of early life status epilepticus on the developmental expression profile of the GluA2 subunit of AMPA receptors.  
Exp Neurol. 2016 Jun 7; 283(Pt A):97-109.

#### IF 4.657

2. Druga R., **Salaj M.**, Barinka F., Edelstein L., Kubová H.  
Calretinin immunoreactivity in the claustrum of the rat  
Front Neuroanat. 2015 Jan 20;8:160.

#### IF 4.2

3. Chládek P., **Salaj M.**, Druga R., Trč T.  
Cévní zásobení kyčelního kloubu a jeho význam pro záchovnou chirurgii kyčelního kloubu (přehled literatury a vlastní pozorování) / Blood Supply of the Hip Joint and Its Consequences for the Hip Preserving Surgery (Literature Overview and Own Observations)  
Ortopedie 1/2013

4. **M. Salaj**, H. Malíková, B. Drugová, F. Barinka, R. Druga.  
Two cases of the retroaortic left renal vein. An anatomical and MRI study.  
Plzeň. Lék. Sborn., Suppl. 82, 2009:115-119