

## Elektrofizjologiczne badania neuronalnych mechanizmów plastyczności kory baryłkowej myszy wywołanych uczeniem się

Krzysztof Tokarski<sup>1</sup>, Joanna Urban-Ciećko<sup>2</sup>, Grzegorz Hess<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Instytut Farmakologii, PAN, Kraków

<sup>2</sup> Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, PAN, Warszawa

<sup>3</sup> Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### Streszczenie

Awersyjne warunkowanie klasyczne, polegające na skojarzeniu stymulacji dotykowej jednego z rzędów wibrys, jako bodźca warunkowego (CS), z szokiem elektrycznym w ogon, jako bodźcem bezwarunkowym (UCS), wywołuje powiększenie rozmiarów funkcjonalnych reprezentacji stymulowanych wibrys w korze somatosensorycznej myszy, co wykazano przy zastosowaniu pomiarów aktywności metabolicznej tkanki nerwowej [13]. Efekt ten ma charakter uczenia asocjacyjnego. Dane literaturowe wskazują, że po zakończeniu treningu, w obszarach stanowiących reprezentacje stymulowanych wibrys dochodzi do wzrostu poziomu markerów GABAergicznego przekazywania synaptycznego. Jak dotąd, brak jednak danych na temat modyfikacji funkcji neuronów korowych i ich połączeń, które mogą być efektem zmian plastycznych. Celem wykonanych badań było określenie, które elementy sieci neuronalnej kory somatosensorycznej ulegają modyfikacjom w efekcie awersyjnego warunkowania klasycznego. Badania prowadzone były metodami rejestracji elektrofizjologicznej *ex vivo* z pojedynczych neuronów *whole-cell patch-clamp* w skrawkach kory somatosensorycznej myszy, poddanych wcześniej warunkowaniu awersyjnemu. W pierwszym etapie badań przeprowadzono charakterystykę elektrofizjologiczną glutaminianergicznych neuronów pobudzających i GABAergicznych neuronów hamujących. Następnie rejestrowano postsynaptyczne prądy hamujące i pobudzające, powstające spontanicznie. Uzyskane wyniki wykazały, że warunkowanie awersyjne nie spowodowało zmian podstawowych parametrów elektrofizjologicznych komórek GABAergicznych i glutaminianergicznych, w skrawkach kory pochodzących z mózgow zwierząt poddanych uprzednio procedurze warunkowania klasycznego. Wykazano, że warunkowanie klasyczne nasiliło częstotliwość spontanicznych postsynaptycznych prądów hamujących (sIPSC) rejestrowanych w komórkach glutaminianergicznych w skrawkach kory pochodzących z mózgow zwierząt poddanych procedurze warunkowania klasycznego. W przeciwieństwie do tego, nie stwierdzono istotnych zmian w częstotliwości

spontanicznych postsynaptycznych prądów pobudzających (sEPSC) rejestrowanych w komórkach GABA i glutaminianergicznych. Wyniki te potwierdzają hipotezę o nasileniu przekaźnictwa synaptycznego w połączeniach pomiędzy interneuronami GABAergicznymi a neuronami pobudzającymi, powstającym w efekcie treningu.

Zaobserwowane nasilenie przekaźnictwa GABAergicznego stanowi, prawdopodobnie, wyraz adaptacyjnej modyfikacji sieci neuronalnej połączeń pomiędzy neuronami baryłki, której sens polega na zapewnieniu niezbędnej równowagi pomiędzy przekaźnictwem pobudzającym a hamującym w zmienionych warunkach, związanych z awersyjnym warunkowaniem klasycznym. Mechanizm zaobserwowanych zmian nie jest znany i wymaga dalszych badań.

## Wstęp

Korę mózgową ssaków charakteryzuje organizacja kolumnowa, która przejawia się w postaci wybiórczej reakcji komórek nerwowych, położonych w wąskim obszarze zorientowanym prostopadle do powierzchni kory poprzez wszystkie jej warstwy, na działanie bodźca o określonej charakterystyce. U gryzoni, część kory somatosensorycznej zawierająca reprezentacje wibrys, będących długimi wąsami zatokowymi wyrastającymi na pyszczku i pełniących u tych zwierząt funkcję ważnego narządu czuciowego, nosi nazwę pola baryłkowego. W warstwie IV pola baryłkowego występują charakterystyczne skupiska neuronów, z racji kształtu nazwane baryłkami, z których każda otrzymuje pośrednio połączenia, w przeważającej mierze z pojedynczej, przeciwstronnej wibrysy [20]. Charakterystyczna organizacja układu wibrys na pyszczku zwierzęcia, na tzw. poduszce wibrysowej, w której wyróżnia się regularne rzędy i kolumny, jest w sposób topograficzny odzwierciedlona w korze baryłkowej w postaci układu baryłek. Neurony warstw położonych powyżej i poniżej baryłki również reagują najsilniej na pobudzenie jednej, określonej wibrysy, tworząc wspólnie kolumnę baryłkową, stanowiącą reprezentację korową tej wibrysy i przetwarzającą informację dotykową, pochodzącą z tej wibrysy.

Badania nad uczeniem się i pamięcią, oraz leżącymi u ich podłoża zjawiskami reorganizacji funkcjonalnej i anatomicznej szeregu struktur mózgu, stanowią jeden z głównych nurtów współczesnej neurobiologii. Z uwagi na łatwość, z jaką można wybiórczo pobudzać określone wibrysy, oraz na możliwość stosowania deprywacji sensorycznej poprzez usuwanie wybranych wibrys, kora baryłkowa gryzoni stała się obiektem licznych badań dotyczących zarówno plastyczności rozwojowej, jak i plastyczności kory mózgowej zwierząt

dorosłych. Najczęściej, mechanizm plastycznych reorganizacji kory przypisuje się zależnym od aktywności neuronalnej modyfikacjom przekazywania glutaminianergicznego w połączeniach wewnątrzkorowych [9, 6, 5].

Sugeruje się także istotny udział układu GABAergicznego w mechanizmach plastycznych reorganizacji pól recepcyjnych kory somatosensorycznej. Badania zespołu prof. Małgorzaty Kossut z Instytutu Nenckiego w Warszawie, oparte o pomiar aktywności metabolicznej kory mózgowej przy zastosowaniu autoradiografii znakowanej 2-deoksyglukozy wykazały, że trening, polegający na skojarzeniu stymulacji dotykowej jednego z rzędów wibrys, jako bodźca warunkowego (CS), z szokiem elektrycznym w ogon, jako bodźcem bezwarunkowym (UCS), wywołuje powiększenie rozmiarów reprezentacji korowych stymulowanych wibrys [12]. Efekt ten ma charakter uczenia asocjacyjnego, ponieważ nie występuje on u zwierząt otrzymujących jedynie bodziec warunkowy, ani u zwierząt, które otrzymują obydwie bodźce, lecz w sposób nieskoordynowany (pseudowarunkowanie). W 24 godziny po zakończeniu trzydniowego treningu, trwającego 10 minut dziennie, zaobserwowano dwukrotny wzrost liczby neuronów, wykazujących immunoreaktywność GABA, w baryłkach stanowiących reprezentację stymulowanych wibrys [13]. Wzrostowi liczby neuronów GABA-immunoreaktywnych towarzyszył wzrost poziomu mRNA oraz białka głównego enzymu syntetyzującego GABA, dekarboksylazy kwasu glutaminowego, GAD-67 [7], lecz nie GAD-65 [11]; wykazano także wzrost poziomu mRNA podjednostki alfa1 receptora GABA<sub>A</sub> w baryłkach [10]. Powstawanie zmian w obrębie układu GABAergicznego wykazano również w innym modelu doświadczalnym, w którym wibrysy myszy poddawano stymulacji mechanicznej przez 4 dni [19]. W efekcie takiej stymulacji zaobserwowano nasilenie immunoreaktywności GAD, a także zwiększenie liczby synaps GABAergicznych i nasilenie długolatencyjnych odpowiedzi na pobudzenie wibrys [8].

Jak dotąd, brak jednak danych na temat funkcjonalnej modyfikacji neuronów korowych i ich połączeń, które mogą być efektem zmian plastycznych. Celem przeprowadzonych badań było określenie za pomocą metod elektrofizjologicznych, które elementy sieci neuronalnej kory somatosensorycznej ulegają funkcjonalnym modyfikacjom w efekcie awersyjnego warunkowania klasycznego.

## Metodyka badań

### Trening zwierząt i grupy doświadczalne

Projektowane doświadczenia wykonywane były na samicach myszy Swiss, w wieku 3 tygodni na początku eksperymentu. W początkowej fazie

myszki były unieruchamiane przez 10 minut dziennie, przez okres 2-3 tygodni [12]. Po wystąpieniu habituacji, myszki były poddawane treningowi, polegającemu na stymulacji mechanicznej rzędu wibrys B, po jednej stronie ciała, przy pomocy niewielkiego pędzelka, trzykrotnie w czasie 9 sekund. Stanowi to bodziec warunkowy (CS). W ostatniej sekundzie trwania bodźca warunkowego, na ogon myszki podawany był szok elektryczny (0.5 mA, 0.5 sek), stanowiący bodziec bezwarunkowy (UCS). Po 6 sekundach przerwy CS i UCS były powtarzane, a całość sesji treningowej trwała 10 minut. Sesję powtarzano przez 3 kolejne dni. Druga grupa zwierząt otrzymywała tylko CS a trzecia, kontrolna („naive”) grupa myszki nie otrzymywała bodźców.

#### Doświadczenia elektrofizjologiczne.

W 24 godziny po zakończeniu treningu, po dekapitacji zwierzęcia, wypreparowano mózg z czaszki i zanurzano w zimnym (0°C) sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) o następującym składzie (mM): NaCl 126, KCl 4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 1.3, CaCl<sub>2</sub> 2.5, D-glukoza 10, przedmuchiwanym mieszaniną 95%O<sub>2</sub> –5%CO<sub>2</sub>. Skrawki, o grubości 400 μm, wycinano przy pomocy mikrotomu z wibrującym ostrzem z obszaru odpowiadającego korze baryłkowej, w płaszczyźnie nachylonej pod kątem 55° w stosunku do płaszczyzny strzałkowej [3, 15], co powoduje, że w obrębie skrawka znajdują się baryłki, zaliczające się do 5 rzędów (A – E). Po preparatyce, skrawki przechowywane były w komorze inkubacyjnej wypełnionej ACSF, w temperaturze 32°C, przez okres 1 – 6 godzin. Pojedynczy skrawek przenoszono do komory rejestracyjnej, umieszczonej na podstawie mikroskopu Zeiss Axioskop, przepłukiwanej ACSF w temperaturze 32 °C. W świetle przechodzącym, pod małym powiększeniem, możliwa była identyfikacja poszczególnych baryłek (ryc. 1A). Po zastosowaniu metody różnicowego kontrastu interferencyjnego w podczerwieni (IR-DIC) i obiektywu 40x identyfikowano pojedyncze neurony (ryc. 1B).

Mikropipetę szklaną, wypełnioną roztworem (mM): K-gluconate 130, NaCl 5, CaCl<sub>2</sub> 0.3, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 1, HEPES 10, Na<sub>2</sub>-ATP 5, Na-GTP 0.4; o osmolarności 290 mOsm; pH 7.2, o oporności 6-8 MΩ, zainstalowaną na mikromanipulatorze Burleigh, pod kontrolą wzrokową umieszczano na powierzchni neuronu i doprowadzano do powstania złącza wysokooporowego (ang. *gigaseal*) a następnie błonę neuronu przerywano [14]. Po uzyskaniu charakterystyki elektrofizjologicznej badanej komórki, poprzez podanie serii bodźców hiper- i depolaryzujących, od -0,5 do +0,5 nA (ryc. 1C, D), przechodzono w tryb rejestracji *voltage-clamp*. Rejestrację sIPSC (ryc. 2A) prowadzono przy potencjale błony komórki ustalonym na 0 mV a sEPSC (ryc. 2B, C) przy potencjale błony komórki ustalonym na -75 mV. Sygnały odbierano przy pomocy wzmacniacza NPI SEC 05L, rejestrowano przy pomocy

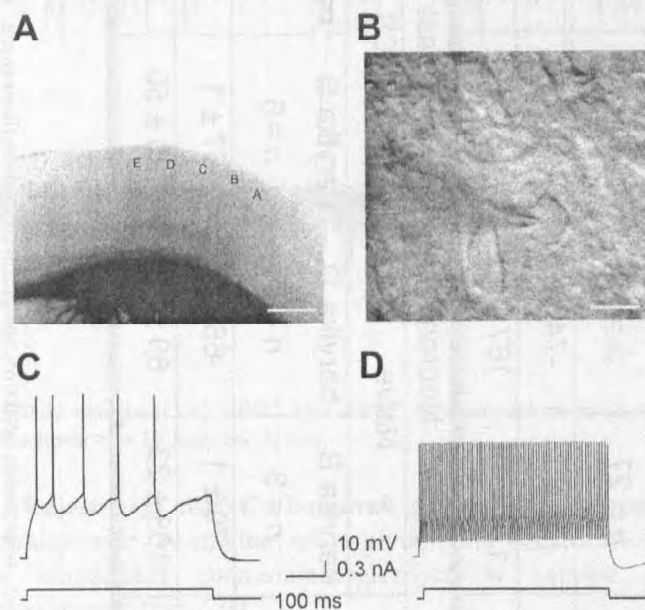


przetwornika analogowo/cyfrowego Axon Instruments Digidata 1322, współpracującego z komputerem PC, i analizowano przy użyciu oprogramowania pCLAMP (Axon Instruments).

## Wyniki

### Elektrofizjologiczna charakterystyka badanych komórek

Łącznie przeprowadzono rejestracje z 135 neuronów warstwy IV kory, wykazujących właściwości elektrofizjologiczne charakterystyczne dla komórek glutaminianergicznych, generujących regularnie potencjały czynnościowe (ang. *regular spiking*; [2]; ryc. 1C) oraz 37 neuronów warstwy IV kory, wykazujących właściwości elektrofizjologiczne charakterystyczne dla interneuronów szybko wyladowujących się (ang. *fast-spiking*; ryc. 1D). Uzyskane wyniki wykazały, że warunkowanie awersyjne nie spowodowało zmian mierzonych parametrów elektrofizjologicznych (oporność błony komórkowej i potencjał spoczynkowy) komórek GABA i glutaminianergicznych, w skrawkach kory pochodzących z mózgow zwierząt poddanych procedurze warunkowania klasycznego (tab. 1).



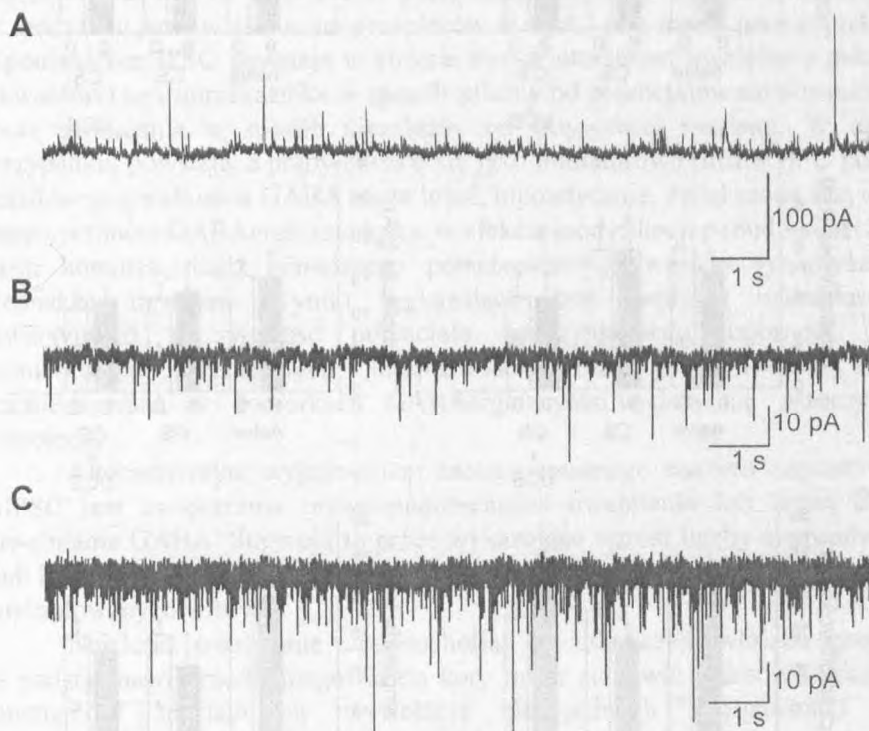
**Ryc. 1.** (A) Skrawek kory mózgowej myszy z widocznymi baryłkami. Skala 400  $\mu\text{m}$ . (B) Neurony warstwy IV kory baryłkowej myszy, obraz uzyskany przy użyciu IR-DIC. Widoczna jest końcówka mikropipety rejestrującej, umieszczona na powierzchni komórki glutaminianergicznej. Widoczne również 2 inne komórki o odmiennym kształcie, prawdopodobnie interneurony GABAergiczne. Skala: 10  $\mu\text{m}$ . (C) Odpowiedź komórki glutaminianergicznej i (D) interneuronu szybko wyladowującego się (ang. *fast-spiking*) na depolaryzujące bodźce prądowe.

Neurony glutaminianergiczne (regular spiking)						
	Naïve		CS		CS+UCS	
	baryłka B <i>n</i> = 27	baryłka D <i>n</i> = 21	baryłka B <i>n</i> = 19	baryłka D <i>n</i> = 15	baryłka B <i>n</i> = 24	baryłka D <i>n</i> = 29
$V_m$ (mV)	$-74 \pm 1$	$-74 \pm 1$	$-75 \pm 1$	$-76 \pm 1$	$-76 \pm 1$	$-75 \pm 1$
$R_m$ (M $\Omega$ )	$176 \pm 15$	$167 \pm 12$	$170 \pm 12$	$183 \pm 9$	$178 \pm 9$	$180 \pm 9$
Neurony GABAergiczne (fast spiking)						
	Naïve		CS		CS+UCS	
	baryłka B <i>n</i> = 3	baryłka D <i>n</i> = 5	baryłka B <i>n</i> = 6	baryłka D <i>n</i> = 5	baryłka B <i>n</i> = 11	baryłka D <i>n</i> = 7
$V_m$ (mV)	$-70 \pm 1$	$-66 \pm 2$	$-67 \pm 1$	$-66 \pm 1$	$-69 \pm 1$	$-68 \pm 1$
$R_m$ (M $\Omega$ )	$108 \pm 23$	$89 \pm 29$	$120 \pm 50$	$78 \pm 13$	$98 \pm 5$	$110 \pm 10$

**Tab. 1.** Porównanie właściwości elektrofizjologicznych zidentyfikowanych neuronów glutaminianergicznych i GABAergicznych w baryłkach B i D w korze somatosensorycznej przebadanych zwierząt. naïve – myszy kontrolne; CS – myszy, na które działano tylko bodźcem warunkowym: CS+UCS – myszy trenowane.

### Rejestracja sIPSC z komórek glutaminianergicznymi

Warunkowanie awersyjne nasiliło częstotliwość sIPSC, natomiast nie zmieniło amplitudy sIPSC (ryc. 3A) w komórkach glutaminianergicznymi w baryłce odpowiadającej głaskanym wibrysom. W przeciwieństwie do tego, nie stwierdzono istotnych zmian amplitudy sIPSC, które byłyby skorelowane z procedurą warunkowania. (ryc. 3A)



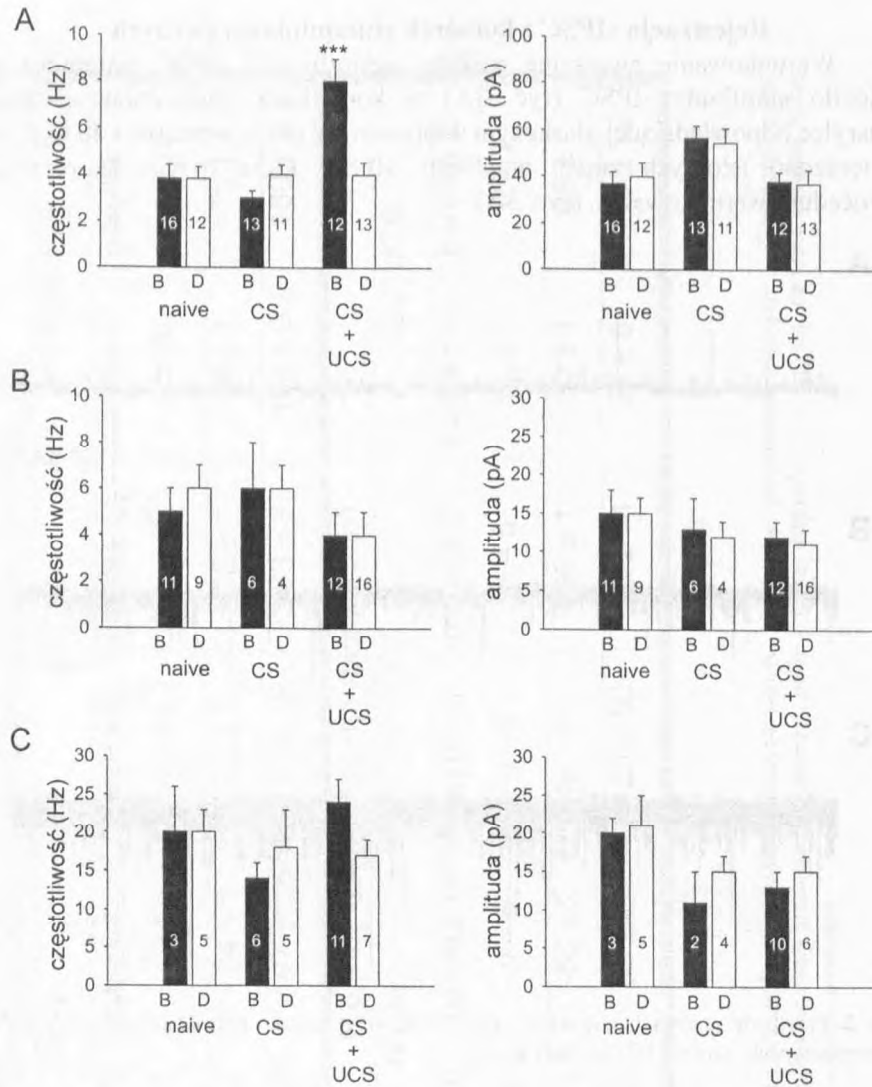
Ryc. 2. Przykłady rejestracji (A) sIPSC, (B) sEPSC w neuronach pobudzających i (C) sEPSC w interneuronach warstwy IV kory baryłkowej

### Rejestracja sEPSC z komórek glutaminianergicznymi

Warunkowanie awersyjne nie wpłynęło na częstotliwość i amplitudę sEPSC w komórkach glutaminianergicznymi w baryłce odpowiadającej głaskanym wibrysom (ryc. 3B).

### Rejestracja sEPSC z komórek GABAergicznymi

Warunkowanie awersyjne nie wpłynęło na częstotliwość i amplitudę sEPSC w komórkach GABAergicznymi w baryłce odpowiadającej głaskanym wibrysom (ryc. 3D).



**Ryc 3.** Wpływ warunkowania awersyjnego na (A) sIPSC w neuronach pobudzających warstwy IV kory baryłkowej. Częstotliwość sIPSC w neuronach baryłki B myszy trenowanych jest ok. dwukrotnie wyższa niż w pozostałych grupach, różnice średniej amplitudy sIPSC między grupami nie są związane z treningiem. (B) sEPSC w neuronach pobudzających warstwy IV kory baryłkowej. Warunkowanie awersyjne nie wpłynęło na częstotliwość i amplitudę sEPSC w neuronach baryłki B myszy trenowanych. (C) sEPSC w interneuronach warstwy IV kory baryłkowej. Warunkowanie awersyjne nie wpłynęło na częstotliwość i amplitudę sEPSC w interneuronach baryłki B myszy trenowanych.

naive – myszy kontrolne; CS – myszy, na które działano tylko bodźcem warunkowym; CS+UCS – myszy trenowane. \*\*\*  $P < 0.0001$ , ANOVA.



## Dyskusja

Przeprowadzone doświadczenia wstępne wykazały, że w efekcie treningu ulega powiększeniu częstotliwość sIPSC, rejestrowanych z neuronów pobudzających o regularnej aktywności (komórek gwiaździstych i piramidowych). Brak istotnych zmian średniej amplitudy rejestrowanych sIPSC wskazuje, że mechanizm postsynaptyczny tego efektu, związany np. z modyfikacjami właściwości receptorów GABA<sub>A</sub> jest mniej prawdopodobny. Spontaniczne IPSC powstają w efekcie dwóch procesów: uwalniania pakietów (kwantów) neuroprzekaźnika w sposób zależny od potencjałów czynnościowych oraz uwalniania w sposób niezależny od aktywności neuronu. W drugim przypadku, powstające prądy określa się jako miniaturowe (mIPSC). U podłoża nasilonego uwalniania GABA może leżeć, hipotetycznie, zwiększona aktywność interneuronów GABAergiczných, np. w efekcie modyfikacji pobudliwości błony tych komórek, bądź silniejszego pobudzeniowego wejścia synaptycznego. Jednakże uzyskane wyniki wykazujące brak wpływu warunkowania awersyjnego na wartość potencjału spoczynkowego, oporność błony komórkowej przebadanych interneuronów oraz częstotliwość sEPSC zarejestrowaną w komórkach GABAergiczných wydają się przeczyć tej hipotezie.

Alternatywnym wyjaśnieniem zaobserwowanego wzrostu częstotliwości sIPSC jest zwiększenie prawdopodobieństwa uwalniania lub liczby miejsc uwalniania GABA. Sugerują to prace wykazujące wzrost liczby neuronów [13] lub liczby synaps GABAergiczných [8] w baryłkach stanowiących reprezentacje stymulowanych wibrys

Nasilone uwalnianie acetylocholinę z zakończeń włókien projekcji z podstawnego przodomózgowia do kory może stanowić jeden z kluczowych elementów mechanizmu wywołania plastycznych reorganizacji kory somatosensorycznej [4]. Wykazano, że plastyczność odpowiedzi neuronów kory baryłkowej na stymulację wibrysy jest blokowana przez immunotoksyczne uszkodzenie jądra podstawnego Meynerta [1] a stymulacja elektryczna podstawnego przodomózgowia, sparowana ze stymulacją receptorów skórnych, wywołuje długotrwały wzrost amplitudy potencjałów wywołanych w korze somatosensorycznej [16]. Badania odpowiedzi neuronów kory słuchowej wykazały, że plastyczne zmiany pól recepcyjnych w efekcie apetytywnego lub awersyjnego warunkowania klasycznego są uzależnione od aktywacji jądra podstawnego i projekcji cholinergiczných do kory [18]. Dlatego też można przypuszczać, że wywołanie zaobserwowanego nasilenia uwalniania GABA przez interneurony kory baryłkowej, związanego z warunkowaniem klasycznym, jest przynajmniej częściowo oparte o aktywację układu cholinergicznego w trakcie treningu.

## Piśmiennictwo

1. Baskerville, K.A., Schweitzer, J.B., Herron, P. (1997) Effects of cholinergic depletion on experience-dependent plasticity in the cortex of the rat. *Neuroscience* 80, 1159-1169.
2. Beierlein, M., Gibson, J.R., Connors, B.W. (2003) Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex. *J. Neurophysiol.* 90, 2987-3000.
3. Chmielowska, J., Carvell, G.E., Simons, D.J. (1989) Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in rat Sml barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 285, 325-338.
4. Dykes, R.W. (1997) Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:535-545.
5. Foeller, E., Feldman, D.E. (2004) Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 89-95.
6. Fox, K. (2002) Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* 111, 799-814.
7. Gierdalski, M., Jablonska, B., Siucinska, E., Lech, M., Skibinska, A., Kossut, M. (2001) Rapid regulation of GAD67 mRNA and protein level in cortical neurons after sensory learning. *Cereb. Cortex* 11, 806-815.
8. Knott, G.W., Quairiaux, C., Genoud, C., Welker, E. (2002) Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34, 265-273.
9. Kossut, M. (1998) Experience-dependent changes in function and anatomy of adult barrel cortex. *Exp. Brain Res.* 123, 110-116.
10. Lech, M., Skibinska, A., Kossut, M. (2001) Delayed upregulation of GABA<sub>A</sub> alpha1 receptor subunit mRNA in somatosensory cortex of mice following learning-dependent plasticity of cortical representations. *Mol. Brain Res.* 96, 82-86.
11. Lech, M., Skibinska, A., Siucinska, E., Kossut, M. (2005) Learning-induced plasticity of cortical representations does not affect GAD65 mRNA expression and immunolabeling of cortical neuropil. *Brain Res.* 1044, 266-271.
12. Siucinska, E., Kossut, M. (1996) Short-lasting classical conditioning induces reversible changes of representational maps of vibrissae in mouse SI cortex A 2DG study. *Cereb Cortex* 6, 506-513.
13. Siucinska E., Kossut M., Stewart M.G. (1999) GABA immunoreactivity in mouse barrel field after aversive and appetitive classical conditioning training involving facial vibrissae. *Brain Res.* 843, 62-70.
14. Tokarski, K., Zahorodna, A., Bobula, B., Hess, G. (2003) 5-HT7 receptors increase the excitability of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res.* 993, 230-234.
15. Urban-Ciećko, J., Kossut, M., Hess, G. (2005) Effects of sensory learning in intracortical synaptic transmission in the barrel cortex of mice. *Acta Neurobiol. Exp.* 65, 195-200.
16. Verdier, D., Dykes, R.W. (2001) Long-term cholinergic enhancement of evoked potentials in rat hindlimb somatosensory cortex displays characteristics of long-term potentiation. *Exp. Brain Res.* 137, 71-82.
17. Weinberger, N.M. (2003) The nucleus basalis and memory codes: Auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80, 268-284.
18. Welker, E., Soriano, E., Van der Loos, H. (1989) Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation. *Exp. Brain Res.* 78, 659-664.

20. Woolsey, T.A., Van der Loos, H. (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. *Brain Res.* 17, 205-242.

Adres do korespondencji:

**Grzegorz Hess**

Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński

ul. Ingardena 6

30-060 Krakow

Tel.: (48 12) 662 32 12

e-mail: Hess@if-pan.krakow.pl