

Μέθοδοι Χαρτογράφησης του Εγκεφάλου: εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση και σύγχρονες προσεγγίσεις

Θεόδωρος Πάνου^{1,2}, Δημήτριος Τσιπτσιός², Κωνσταντίνος Βαδικολίας², Ιωάννης Ηλιόπουλος², Όλγα Παγωνοπούλου¹

¹ Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Νευροφυσιολογίας, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα

² Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Ιατρικής και Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα

Περίληψη

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελείται από 10^{11} νευρώνες. Ο φιλόδοξος στόχος της σύγχρονης νευροεπιστήμης είναι η ολική χαρτογράφηση των συνδέσεων του εγκεφάλου, έτσι ώστε να γίνει αντιληπτός ο τρόπος με τον οποίο ο εγκέφαλος καθορίζει κάθε πτυχή της ανθρώπινης ύπαρξης. Για τον σκοπό αυτό αξιοποιούνται διάφορες μέθοδοι απεικόνισης και εφαρμόζονται σε πτωματικά παρασκευάσματα, πειραματόζωα και υγιείς εθελοντές. Επιπλέον οι επιστήμονες εστιάζουν σε διαφορετικά επίπεδα οργάνωσης του εγκεφάλου. Στόχος της εργασίας είναι η ανασκόπηση των κυριότερων- παλαιότερων και νεότερων- μεθόδων χαρτογράφησης του Εγκεφάλου, η καταγραφή των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων τους σε συνάρτηση με το ερευνητικό ερώτημα και η σύγκριση της μεθοδολογίας των διαφόρων προγραμμάτων χαρτογράφησης του Εγκεφάλου στον κόσμο. Η εργασία στηρίχθηκε σε ένα σύνολο δημοσιευμένων άρθρων που περιλαμβάνουν καινοτόμα πειράματα νευροφυσιολογίας, τη βελτίωση παλαιότερων μεθόδων (Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ), Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού (MRI) και άλλα), την πολυδιάστατη εφαρμογή νεότερων μεθόδων (Διακρανιακή Μαγνητική Διέγερση (TMS), Οπτογενετική) και τη χρήση της Βιοπληροφορικής και αυτοματοποιημένων εργαλείων στην επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων. Για την αντιπροσωπευτική δομική και λειτουργική χαρτογράφηση του Εγκεφάλου απαιτείται συνδυασμός πολλών μεθόδων και στοιχείων από τον άνθρωπο και άλλα είδη σε επίπεδο μακροσυνδέσεων (μείζονες ανατομικές συνδέσεις), μεσοσυνδέσεων (κυτταροαρχιτεκτονική/ μυελοαρχιτεκτονική) και μικροσυνδέσεων (καθορισμός πυκνότητας υποδοχέων, νευροδιαβιβαστών). Τα προσωρινά αποτελέσματα των διαφόρων προγραμμάτων χαρτογράφησης του Εγκεφάλου έδειξαν ότι απαιτείται συνδυασμός μεθόδων και διεπιστημονική συνεργασία για την επίτευξη αυτού του στόχου. Η προοπτική των μελετών αυτών είναι πολλή υποσχόμενη για το μέλλον, με τη διερεύνηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών στην παθοφυσιολογία διαφόρων νευρολογικών παθήσεων, με την εφαρμογή νέων θεραπειών και τη μελέτη του ανθρώπου σε ποικίλα νευροαναπτυξιακά και συμπεριφορικά επίπεδα.

Λέξεις ευρητηρίου: Χαρτογράφηση Εγκεφάλου, Λειτουργική Νευροαπεικόνιση, Χάρτης Νευρωνικών Συνδέσεων, Οπτογενετική, Διακρανιακή Μαγνητική Διέγερση

Methods of Brain Mapping: Extended bibliographic review and contemporary approaches

Theodoros Panou^{1,2}, Dimitrios Tsiptsios², Konstantinos Vadikolias², Ioannis Iliopoulos², Olga Pagonopoulou¹

¹ Democritus University of Thrace, Department of Medicine, Laboratory of Neurophysiology, Alexandroupolis, Greece

² Democritus University of Thrace, Department of Medicine and University General Hospital of Alexandroupolis, Department of Neurology, Alexandroupolis, Greece

Abstract

The human brain consists of 10^{11} neurons. The ambitious aim of modern neuroscience is the entire mapping of the brain connections, so that it becomes clear the way the brain determines every aspect of the human life. Therefore multiple methods of brain imaging are being used and applied to post-mortem samples, laboratory animals and healthy volunteers. Moreover, scientists focus on different levels of brain organization. The aim of the present study is to review the major- recent and older- brain mapping methods, the listing of their advantages and disadvantages in relation to the research aim and the comparison of the methodology utilized by different brain mapping programs around the world. The study

was based on a number of published articles which include innovative experiments of neurophysiology, the improvement of older methods (e.g. Electroencephalogram (EEG), Magnetic Resonance Imaging (MRI) and other), the multidimensional application of recent methods (Transcranial Magnetic Stimulation (TMS), Optogenetics) and the use of Bioinformatics and automated tools in big data editing. A combination of multiple methods and data from human and other species on different levels (macroconnectomic for major anatomic brain structures, mesoconnectomic for cyto- and myeloarchitecture and microconnectomic for defining the density of receptors and neurotransmitters) is required, in order to achieve a representative –structural and functional – brain mapping process. The preliminary results of the different brain mapping programmes showed that a combination of methods and interdisciplinary cooperation is required. The prospect of these studies is very promising for the future by exploring the underlying mechanisms in various neurological diseases, the application of novel treatments and the studying of the human brain on many neurodevelopmental and behavioral states.

Key Words: Brain Mapping, Functional Neuroimaging, Connectome, Optogenetics, Transcranial Magnetic Stimulation

1. Εισαγωγή

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελεί μέχρι και σήμερα- και θα αποτελέσει και για το μέλλον- αντικείμενο εντατικής μελέτης για το σύνολο της κοινότητας των νευροεπιστημόνων. Η πολυπλοκότητα του και η άρρηκτη σύνδεση μεταξύ δομής και λειτουργίας- ανατομίας και φυσιολογίας- που τον διακρίνει οδήγησε τους επιστήμονες στην ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων για τη χαρτογράφηση του με απώτερο σκοπό την αποκρυπτογράφηση του. Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους περιορίζονται σε πειραματικά πρότυπα, άλλες κατέχουν σταθερή θέση στην κλινική πράξη, ενώ άλλες συνδυάζονται αρμονικά τόσο για την προαγωγή της γνώσης όσο και για την διάγνωση παθήσεων ή και τη θεραπεία ασθενών.

Τα τελευταία χρόνια ξεκίνησαν κρατικές και διεθνείς πρωτοβουλίες για την χαρτογράφηση του εγκεφάλου σε μικροσκοπικό, μακροσκοπικό και λειτουργικό επίπεδο^{[1],[2],[3]}. Έχουν καταρτιστεί πολυαπλές και τεράστιες βάσεις δεδομένων που στόχο έχουν να καλύψουν ολιστικά την ανατομία και τη φυσιολογία του Εγκεφάλου.

Οι επιστήμονες προσπαθούν να προσεγγίσουν και να χαρτογραφήσουν ολοκληρωτικά τους εγκεφάλους άλλων ειδών, με απώτερο στόχο να αναπτύξουν μια κατάλληλη μεθοδολογία ολικής μελέτης του ανθρώπινου εγκεφάλου με το σύνολο των νευρικών κυκλωμάτων που τον χαρακτηρίζει.

Επισημαίνεται ότι μέχρι σήμερα ο εγκέφαλος ενός μόνο οργανισμού έχει πλήρως αποκωδικοποιηθεί. Πρόκειται για τον νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*^{[4],[5],[6],[7]}. Το 1986 προσδιορίστηκαν το σύνολο των 302 νευρώνων που διαθέτει και οι 7600 περίπου συνδέσεις μεταξύ τους. Η ομάδα των επιστημόνων έδρασε ως εξής: σταθεροποίησε τον σκώληκα σε πλαστικό και στη συνέχεια προχώρησε στη λήψη εγκάρσιων τομών,

κάθετων στον επιμήκη άξονα του σκώληκα. Από κάθε τομή πάχους μόλις 50 nm ελήφθησαν φωτογραφίες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και προέκυψαν 8000 φωτογραφίες, στις οποίες οι επιστήμονες καταμέτρησαν κάθε νευράξονα. Και η *Drosophila melanogaster*, το πιο γνωστό πειραματόζωο της Μοριακής Βιολογίας κέρδισε το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Καθώς η ολική χαρτογράφηση του εγκεφάλου της δεν ήταν εφικτή, οι επιστήμονες εστίασαν σε ένα τμήμα του οπτικού της συστήματος. Στην ανατομική δομή fly medulla ανιχνεύθηκαν μετά από προσπάθεια ετών 379 νευρώνες και 8637 συνάψεις μεταξύ τους^{[4],[8],[9]}.

2. Ιστολογικές & Μοριακές Μέθοδοι Μελέτης του Εγκεφάλου

Ο Brodmann καθόρισε τα 52 πεδία του Εγκεφάλου, στηριζόμενος στην καλούμενη κυτταροαρχιτεκτονική του Εγκεφάλου. Περιορίστηκε στην αναγνώριση μωσαϊκών κυτταρικών σωμάτων στις διάφορες κυτταρικές στοιβάδες, μεθοδολογία η οποία θεωρείται από τους σημερινούς νευροεπιστήμονες επισφαλής. Η μεθοδολογία Brodmann δεν τηρεί σήμερα κανέναν από τους άξονες προσδιορισμού των περιοχών που θέτουν οι νευροεπιστήμονες^{[10],[11]}. Αυτοί προτάσσουν μεταξύ άλλων την ιστολογική προσέγγιση στη χαρτογράφηση του εγκεφάλου^{[12],[13]}:

1. Ανατομική δομή συνυφασμένη με νευροφυσιολογική λειτουργία-προσέγγιση λειτουργικής ανατομικής^[14]
2. Ύπαρξη νευρωνικών συνδέσεων (λαμβάνεται υπόψη και το επίπεδο μυελίνωσης^[15])
3. Επαναληψιμότητα και καθολικά εφαρμόσιμη μεθοδολογία προσδιορισμού των ορίων μίας φλοιώδους περιοχής^[16]
4. Καθορισμός περιοχής και με βάση την εμβρυολογική/αναπτυξιακή-εξελικτική πορεία^{[17],[18]}

5. Επίπεδο μορφολογικής ποικιλίας μεταξύ των διαφόρων ανθρώπων (για εκείνες τις περιοχές που εμφανίζουν μεγάλες διαφορές, όπως η άλω Broca-η αμυγδαλή αντίθετα δεν εμφανίζει μεγάλη μορφολογική ποικιλία)

Άλλοι επιστήμονες-ακόμη και σχετικά πρόσφατα, το 2015- δεν περιορίστηκαν στην αναγνώριση των κυτταρικών σωμάτων για τον ορισμό των διαφορετικών ανατομικών περιοχών του εγκεφάλου, αλλά εστίασαν στην ηγεύμενη μυελοαρχιτεκτονική, δηλαδή στη διάταξη των εμμυελών νευρικών ινών^{[19],[20],[21]}. Πρόσφατα, προέκυψε ότι η μυελοαρχιτεκτονική αξιοποιείται και στην απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging, MRI) μεγάλης διακριτικής ικανότητας, η οποία στηρίζεται στις διαφορετικές πυκνότητες μυελίνης^{[22],[23]}. Οι χάρτες του εγκεφάλου που στηρίζονται σε αυτήν τη μεθοδολογία περιλαμβάνουν 180 διαφορετικές περιοχές.

Γενικά, οι περισσότερες πρωτοβουλίες απεικόνισης και ολικής χαρτογράφησης του εγκεφάλου κινούνται σε 3 επίπεδα^{[1],[24],[25],[26]}:

- Στο επίπεδο μακροσυνδέσεων (macro-connectomic) περιλαμβάνεται η αξιοποίηση της MRI, η οποία αναγνωρίζει μείζονες ανατομικές συνδέσεις μεταξύ των διαφόρων περιοχών (με μέση διακριτική ικανότητα 2 χιλιοστών). Τα δίκτυα σύνδεσης στον εγκέφαλο μπορούν να προσεγγιστούν καλύτερα με την βελτίωση της διακριτικής ικανότητας, ενώ τυχόν βελτίωση της μεθοδολογίας μπορεί να αξιοποιηθεί και στη μελέτη των πειραματόζων.
- Σε επίπεδο μεσοσυνδέσεων (meso-connectomic) δίνεται έμφαση σε απεικόνιση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών μίας φλοιώδους περιοχής (της κυτταροαρχιτεκτονικής, μυελοαρχιτεκτο-

νικής, των συνδέσεων και της λειτουργίας της)^[27]. Στόχος αυτής της προσέγγισης (στην οποία στηρίχτηκαν και τα πεδία του Brodmann) είναι η ανάδειξη παρόμοιων και επαναλαμβανόμενων νευρωνικών δικτύων σε επίπεδο εκατοστών-χιλιοστών^[28]. Σήμερα οι μεσοσυνδέσεις, στις οποίες οφείλουμε το μεγαλύτερο μέρος της σύγχρονης γνώσης της ανατομίας του Εγκεφάλου, ενισχύονται και με την χαρτογράφηση φθορισμού και ιόντων ασβεστίου (Ca²⁺).

- Στο επίπεδο μικροσυνδέσεων (micro-connectomic) οι ερευνητές εστιάζουν την προσοχή τους μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (σε διακριτική ικανότητα μμ-ημ) σε μεμονωμένα κύτταρα και συνάψεις^[29]. Το συγκεκριμένο επίπεδο μελέτης χαρακτηρίζεται από πολλούς το «gold standard» της μελέτης των συνδέσεων του Εγκεφάλου. Στόχος των ερευνητών είναι ο προσδιορισμός ιδιαίτερων χαρακτηριστικών σε μία περιοχή (π.χ. σωματοτοπία), αλλά και ο προσδιορισμός διαβαθμίσεων στην κυτταρο- και μυελοαρχιτεκτονική^[30]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η άλω του Broca, η οποία μελετήθηκε διεξοδικά (και σε επίπεδο νευροδι-αβιβαστών/υποδοχέων) και προσδιορίστηκαν πάνω από 12 υποπεριοχές μέσα στην καλώς μελετημένη άλω. Οι υποπεριοχές χαρακτηρίζονταν από ομοιογένεια, με την εξαίρεση ορισμένων σημείων, τα οποία οι επιστήμονες χαρακτήρισαν patches & hotspots.

Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας (Πίνακας 1), όπου αναλύονται με συντομία οι διάφορες μέθοδοι στην ιστολογική διερεύνηση του εγκεφάλου^{[3],[4],[25],[31],[32],[33],[34],[35],[36],[37]}

Πίνακας 1: Ιστολογικές/Μοριακές Μέθοδοι Διερεύνησης του Εγκεφάλου

Μέθοδος	Περιγραφή-Στόχος	Σημειώσεις
Gray Level Index (GLI)	Κατανομή της πυκνότητας των κυτταρικών σωμάτων	Πρόσδος σε σχέση με την οπτική καταμέτρηση με βάση τη χρώση Nissl
(Ενζυμο)ανοσοϊστοχημία Μορφομετρικός Προσδιορισμός NADPH-διαφοράσης / Ακετυλοχολινεστεράσης/αντίσωμα εναντίων της Wisteria floribunda agglutinin (WAF)/ αντίσωμα εναντίων της Ακετυλοχολινεστεράσης της Χολίνης (ChAT) , Δεκαρβοξυλάσης του Γλουταμικού Οξέος (GAD), της SMI-32 (πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού), παραλβουμίνης, καλβιδίνης κ.α.	Προσδιορισμός δενδριτών/ Χαρτογράφηση πρόσθιου εγκεφάλου και άλλων περιοχών/ Προσδιορισμός N-ακετυλογαλακτοζαμίνης (συστατικό εξωκυττάριας ουσίας)/προσδιορισμός των αντίστοιχων στόχων	Ένας από τους κύριους στόχους αυτών των μεθόδων είναι ο διαχωρισμός πυραμιδικών και μη-πυραμιδικών νευρώνων
Αυτοραδιογραφία υποδοχέων	Προσδιορισμός πυκνότητας υποδοχέων (και για τους νευροδιαβιβαστές)	Με την αυτοραδιογραφία υποδοχέων επιτυγχάνεται ακριβής προσδιορισμός ορίων περιοχών με ανάλογα αποτελέσματα με μεθόδους κυτταρο- και μυελοαρχιτεκτονικής
Εμβολισμός σεληνικού νατρίου/ Φασματομετρία μάζας LA-ICP-MS, MALDI	Προσδιορισμός νευρώνων «θετικών στον ψευδάργυρο»/ Προσδιορισμός θέσης νευροδιαβιβαστών, λιπιδίων & πρωτεϊνών σε τομές μικροτόμου	Περιορισμένη χρησιμότητα στη Χαρτογράφηση Εγκεφάλου
Χρήση πρωτεϊνών-μεταγραφικών παραγόντων Rfx3→II Cart→III Rspo1→IV Etv1→V FoxP2, Tbr1→VI	Προσδιορισμός στοιβάδων ισοφλοιού	
Γενετικές μέθοδοι Υβριδισμός in situ μαζί με τομές επεξεργασμένες με χρώση Nissl σε πτωματικούς εγκεφάλους/ Μελέτη γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες / Χρήση τεχνητού βακτηριακού γονιδιώματος (BAC) κ.α.	Χαρακτηρισμός τύπων κυττάρου	
Οπτικές μέθοδοι χωρίς καθαρισμό ιστών 1. (Fluorescence)Micro-optical sectioning tomography ((f)MOST) 2. Optical coherence tomography (OCT) 3. Focused Ion Beaming/ Scanning Electron Microscopy 4. 3D Polarized Light Imaging (3D-PLI) 5. Τεχνικές Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας (όπως Serial Block-Face Scanning Microscopy κ.α.) 6. Λοιπές τεχνικές (2 photon microscopy σε συνδυασμό με ανοσοφθορισμό κ.α.)	1. Προσδιορισμός αριθμού κυττάρων και αγγείων, απόστασης κυττάρων από αγγεία και πυκνότητας κυττάρων 2. Προσδιορισμός κυτταροαρχιτεκτονικής σε ιστικά τεμάχια με βάθος >50 μm 3. Προσδιορισμός τρισδιάστατων απεικονίσεων των 6 στοιβάδων του σωματισθητικού φλοιού αρουραίου 4. Αρχιτεκτονική νευρικών ινών 5. Δυνατότητα ανακατασκευής ιστικών τεμαχίων στο χώρο- Σε συνδυασμό με Array Tomography: προσδιορισμός τύπου συνάψεων	Δυνατότητα ομοιογενούς κατανομής χωρίς διασκορπισμό φωτός. Μέθοδος με δυνατότητα εφαρμογής και στον άνθρωπο, καθώς δεν απαιτείται γενετική τροποποίηση
Οπτικές μέθοδοι με καθαρισμό ιστών <input type="checkbox"/> Μέθοδος CLARITY (clear, lipid-exchanged, acrylamide-hybridized rigid, imaging/ immunostaining compatible, tissue hydrogel) <input type="checkbox"/> Συναφείς μέθοδοι COLM (συνδυασμός με μικροσκοπία), SCALE, CUBIC (σε ορισμένες περιπτώσεις συνδυασμός με συνεστιακή μικροσκοπία)	Ταυτόχρονος προσδιορισμός κυτταρικού τύπου (χαρτογράφηση κυττάρων Purkinje), κατανομής κυττάρων και απεικόνιση μυελίνης	Η μέθοδος εφαρμόστηκε επανειλημμένα σε τρωκτικά

3. Η μέθοδος fMRI-BOLD & άλλες συναφείς μέθοδοι-Πειραματικές Εφαρμογές

Η μέθοδος της λειτουργικής απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (fMRI) –εξαρτώμενη από το σήμα επιπέδου οξυγόνου του αίματος αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους νευροαπεικόνισης και αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη και στη μελέτη του ανθρώπινου Εγκεφάλου, καθώς απεικονίζει τις περιοχές του εγκεφάλου που είναι μεταβολικά περισσότερο ενεργές^{[38],[39]}. Η μέθοδος στηρίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες τις αιμοσφαιρίνης, οι οποίες μεταβάλλονται ανάλογα με τον κορεσμό της σε οξυγόνο^[40]. Συγκεκριμένα, αυξημένη νευρική δραστηριότητα πυροδοτεί αλλαγές στην ποσότητα της αιμοσφαιρίνης σε καθορισμένη χρονική διάρκεια^[41]. Η μέθοδος είναι μη επεμβατική και ενδείκνυται τόσο για ζωικά μοντέλα όσο και για τον άνθρωπο. Δεν είναι σαφής, ωστόσο, ο συσχετισμός του σήματος BOLD με τη νευρωνική λειτουργία^[5].

Σήμερα πραγματοποιούνται συστηματικές προσπάθειες που στόχο έχουν να υπερβούν την επιρροή του σήματος από την οξυγόνωση του αίματος και τη ροή του στα αγγεία στη μέθοδο fMRI-BOLD και να αναπτυχθούν μέθοδοι, οι οποίες να απεικονίζουν άμεσα την εγκεφαλική λειτουργία χρησιμοποιώντας νέους δείκτες. Αυτές οι πρωτοποριακές μέθοδοι θα εφαρμοστούν πρώτα σε ζωικά μοντέλα και στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί και η εφαρμογή τους στον άνθρωπο. Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους αναλύονται παρακάτω.

Όπως είναι γνωστό, η εγκεφαλική λειτουργία αποτελεί τη συνισταμένη των αλλαγών στο δυναμικό μεμβράνης των διαφόρων νευρώνων. Ο προσδιορισμός του δυναμικού μεμβράνης πραγματοποιείται πειραματικά με τα λεγόμενα patch clamps και με ορισμένες οπτικές χρωστικές που αντανακλούν τις αλλαγές στα δυναμικά της μεμβράνης. Ωστόσο η πρώτη μέθοδος είναι πρακτικά αδύνατο να εφαρμοστεί σε ζώντες οργανισμούς και η δεύτερη προσφέρει τη δυνατότητα απεικόνισης μόνο από την επιφάνεια του εγκεφάλου. Η τεχνική του φθορισμού 2 φωτονίων ίσως συμβάλει στην υπέρβαση αυτής της δυσκολίας, επιτρέποντας και την καταγραφή από εν τω βάθει νευρώνες. Τεχνικές όπως το Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (HEΓ), το Μαγνητοεγκεφαλογράφημα, άλλα και η χρήση μικροηλεκτροδίων προσφέρουν μόνο έμμεσα αποτελέσματα, καθώς επιτρέπουν καταγραφή του εξωκυττάρου δυναμικού. Στην πυρηνική ιατρική έγιναν κάποιες προσπάθειες αξιοποίησης λιπόφιλων κατιόντων, τα οποία είναι σε θέση να ανιχνεύουν αργές μεταβολές του δυναμικού της μεμβράνης (triphenylphosphonium-³¹P-NMR)^[39].

Οι επιστήμονες εστιάζουν την προσοχή τους

σε 3 παραμέτρους, οι οποίες θα μπορούσαν να αναβαθμίσουν τη μεθοδολογία της fMRI και να ξεπεράσουν την ασάφεια των σημάτων BOLD. Σε αυτό το πλαίσιο, εξετάζουν τη δυνατότητα καταγραφής των ιόντων ασβεστίου, νευροδιαβιβαστών και μέσων προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης^[42].

Είναι γνωστό, ότι η απελευθέρωση των κυστιδίων που περιέχουν τον νευροδιαβιβαστή προϋποθέτει Ca^{2+} που θα επιτρέψουν τη σύντηξη των κυστιδίων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και τελικά την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Οι επιστήμονες θεωρούν την κίνηση των Ca^{2+} ως ένα καλό υποκατάστατο που αντανακλά το διαμεμβρανικό δυναμικό του κυττάρου^{[43],[44]}. Προκειμένου να αξιοποιήσουν αυτή την ιδιότητα, ανέπτυξαν διάφορους κηλιωτές προκειμένου να προσδένονται σε αυτούς τα ιόντα ασβεστίου και να επιτρέπουν την απεικόνιση της δραστηριότητας των νευρώνων στις απεικονίσεις μαγνητικού συντονισμού. Σε τομές εγκεφάλου χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν κηλιωτές που να δεσμεύουν ^{19}F και Ca^{2+} , με τα Ca^{2+} να προκαλούν ανιχνεύσιμη μεταβολή στο μόριο. Σήμερα αναπτύχθηκαν διττοί μόρια-κηλιωτές που να προσδένουν το γαδολίνιο (Gd) από τη μία πλευρά και τα Ca^{2+} από την άλλη. Η πρόσδεση των Ca^{2+} οδηγεί σε αλλαγή του επιπέδου έκθεσης του γαδολινίου στο νερό, προκαλώντας αλλαγές στο MRI κατά χρόνο T1. Το κυριότερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου ήταν η αδυναμία διάκρισης μεταξύ των Ca^{2+} και μαγνησίου (Mg^{2+}) ή ψευδαργύρου (Zn^{2+}).

Μία ακόμη προσέγγιση περιλαμβάνει τα ιόντα μαγγανίου (Mn^{2+}), τα οποία δρουν ως υποκατάστατο για τα Ca^{2+} σε μία μέθοδο, η οποία καλείται Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού ενισχυμένη με μαγγάνιο (Manganese Enhanced MRI, MEMRI)^{[39],[45],[46],[47],[48]}. Τα Mn^{2+} χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα σε ζωικά πειραματικά μοντέλα ως ένας αξιοσημείωτος παράγοντας αντίθεσης. Είναι γνωστό ότι το μαγγάνιο αξιοποιεί για την είσοδο του στο κύτταρο τα σεοελεγχόμενους διαύλους ασβεστίου. Έτσι εξηγείται η ευρεία χρήση αυτής της μεθοδολογίας για την μελέτη του εγκεφάλου του αρουραίου με την κατασκευή χάρτη περιοχών του σωματοαισθητικού φλοιού και όχι μόνο (Πίνακας 2), η οποία έχει λάβει μεγάλες διαστάσεις τα τελευταία χρόνια. Το ποσοστό ταύτισης MEMRI και fMRI σε νευροαπεικονίσεις είναι υψηλό και η τεχνική επιτρέπει την απεικόνιση δομών, όπως το οσφρητικό σπείραμα που θα ήταν μία μη ανιχνεύσιμη δομή με το BOLD.

Υπάρχουν και σημαντικοί περιορισμοί που δυσχεραίνουν τη χρήση της μεθόδου MEMRI: απαιτείται συχνά, αλλά όχι πάντα η καταστροφή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είτε με υπέρηχους είτε με ειδικά αντισώματα^[49] και δεν υπάρχει ειδικότητα

Πίνακας 2: Περιοχές εφαρμογής της μεθόδου MEMRI στο Νευρικό Σύστημα

- Οσφρητικός βολβός
- Περιοχές Σωματοαισθητικού Φλοιού Αρουραίου
- Υποθάλαμος
- Αμφιβληστροειδής
- Κινητικός φλοιός
- Ακουστικός Μεσεγκέφαλος Μυ
- Μεμονωμένο Οσφρητικό Σπείραμα

των ιόντων για τους νευρώνες, συγκεντρώνονται δηλαδή και στα νευρογλοιακά κύτταρα και παραμένουν για εβδομάδες στον εγκέφαλο, περιορίζοντας δραστικά τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου.

Η χρήση της απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού επεκτείνεται και στη μελέτη νευροδιαβιβαστών. Τέλος, η χρήση της συγκεκριμένης απεικονιστικής μεθόδου ενδείκνυται και για την ανίχνευση πρωτεϊνών (κρεατινική κίνηση, κίνηση της αργινίνης, β-γαλακτοζιδάση και φερριτίνη) και μορίων ριβονουκλεϊκών οξέων που προέκυψαν από τη μετάφραση και τη μεταγραφή αντίστοιχα γονιδίων, των οποίων η έκφραση αυξάνεται με την αυξημένη νευρική δραστηριότητα^{[42],[50]}. Μοναδική προϋπόθεση είναι τα μόρια αυτά να μεταβάλλουν τις μαγνητικές ιδιότητες. Η αδυναμία διείσδυσης μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού παραμένει ένας σημαντικός περιορισμός στην εφαρμογή αυτής της μεθόδου^[42].

4. Το Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα-Εφαρμογές σε ζωικά μοντέλα & στον άνθρωπο

Το ΗΕΓ αποτέλεσε ένα από τα πρώτα εργαλεία έρευνας της λειτουργίας του Εγκεφάλου^[51]. Αξιολογημένη θεωρείται και η συνεισφορά του στην Κλινική Πρακτική, καθώς επιτρέπει την εστιακή εντόπιση βλαβών και την παρατήρηση της λειτουργίας ομάδων νευρώνων στις διάφορες περιοχές του Εγκεφάλου. Το Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα αποτέλεσε και αποτελεί εργαλείο διάγνωσης, κλινικής αξιολόγησης και έρευνας σε μεγάλο φάσμα νευρολογικών και ψυχιατρικών παθήσεων, όπως στην επιληψία ή στη σχιζοφρένεια. Είναι δυνατή και η εφαρμογή χρώματος για την καλύτερη απεικόνιση των διαφορών φυσιολογικού-παθολογικού και των μεταξύ τους διαβαθμίσεων.

Το ΗΕΓ έχασε την πρωτοκαθεδρία του με την έλευση των άλλων απεικονιστικών μεθόδων στη χαρτογράφηση του Εγκεφάλου. Ωστόσο έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα που άλλες απεικονιστικές μέθοδοι, όπως η fMRI και η Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET) δεν κατόρθωσαν να ξεπεράσουν, την μεγαλύτερη ανάλυση στον άξονα του χρόνου, η οποία υπο-

λογίζεται σε microseconds(ms)^{[52],[53]}. Η χωρική ανάλυση της συγκεκριμένης μεθόδου παραμένει περιορισμένη, καθότι στηρίζεται στα μετασυναπτικά δυναμικά μεγάλων πυραμιδικών νευρώνων^[54].

Πέρα από το ΗΕΓ έχουν αξιοποιηθεί και άλλες τεχνικές^{[2],[43]}: η Μαγνητοεγκεφαλογραφία προσδιορίζει κυρίως ενδοκυττάρια ρεύματα και έχει σχετικά καλύτερη χωρική ανάλυση από το ΗΕΓ, καθώς δεν επηρεάζεται από το κρανίο και τις παρακείμενες δομές. Η PET προσδιορίζει τα επίπεδα οξυγόνου (ισότοπο O-15), καθώς είναι γνωστό ότι η αυξημένη συναπτική δραστηριότητα εντείνει τον μεταβολισμό. Ενδεικτικά, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε ασθενείς που ανάρρωναν από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στο αριστερό ημισφαίριο. Προέκυψε αυξημένη δραστηριότητα στο φλοιό του αριστερού ημισφαιρίου και αυξημένη δραστηριότητα στον πλάγιο προκινητικό, στον πρωτοταγή σωματοαισθητικό και στον βρεγματικό φλοιό του ετερόπλευρου ημισφαιρίου^[54]. Η μέθοδος διερεύνησης των λειτουργιών του Εγκεφάλου σε ασθενείς που έχουν υποστεί κάποια προσδιορισμένη νευροανατομική διαταραχή παραμένει στο οπλοστάσιο της έρευνας^[12].

5. Διακρανιακή Μαγνητική Διέγερση-Μεθοδολογία & Εφαρμογές

Η Διακρανιακή Μαγνητική Διέγερση (Transcranial Magnetic Stimulation, TMS) πρωτοεφαρμόστηκε το 1985 και αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο μελέτης του Εγκεφάλου, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε πειραματόζωα, όσο και στον άνθρωπο^[53]. Η διέγερση πραγματοποιείται μέσω της εφαρμογής ενός ισχυρού μαγνητικού πεδίου έντασης μέχρι περίπου 2 T, μέσω της διέλευσης ηλεκτρικού ρεύματος σε μία μαγνητική σπείρα που λειτουργεί ως πηνίο^[54]. Με αυτόν τον τρόπο διεγείρονται συγκεκριμένες περιοχές του Εγκεφάλου που εφάπτονται της σπείρας και αξιολογείται η δράση που ακολουθεί. Η εφαρμογή της τεχνικής δεν περιορίστηκε μόνο στη μελέτη του κινητικού φλοιού, αλλά επεκτάθηκε και στη μελέτη άλλων περιοχών, συμπεριλαμβανομένων και αισθητικών ή γνωστικών περιοχών του φλοιού. Αξιοποιήθηκε για κλινικούς και θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά και στη χαρτογράφηση του Εγκεφάλου^{[53],[54]}. Η

TMS συνήθως δεν εφαρμόζεται μόνη της, αλλά σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, όπως το ΗΕΓ^[53]. Η TMS αποτελεί προέκταση της Διακρανιακής Ηλεκτρικής Διέγερσης, η οποία παρά τα πλεονεκτήματά της (σχετικά μικρότερος χρόνος απόκρισης μετά την εφαρμογή του ερεθίσματος) δεν εφαρμόστηκε ευρέως λόγω του επώδυνου χαρακτήρα της.

Ένα μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται, με τις μαγνητικές γραμμές να διέρχονται κάθετα στο επίπεδο της σπείρας, δημιουργώντας ρεύμα από επαγωγή. Η διάρκεια της εφαρμογής του πεδίου περιορίζεται σε 100 μ s. Ως απόκριση προκύπτουν τα καλούμενα κύματα D (direct) που αντιστοιχούν στην ενεργοποίηση των πυραμιδικών νευρώνων και τα καλούμενα κύματα I (indirect), τα οποία αντιστοιχούν στην συναπτική δραστηριότητα των φλοιονωτιαίων νευρώνων και στην εκπόλωση διάμεσων νευρώνων^[55]. Ακολουθεί η μυϊκή αντίδραση μέσω του δυναμικού ενέργειας που καλείται motor-evoked potential (MEP), η οποία εξαρτάται και από τον υφιστάμενο τόνο του μυός^[56]. Πλέον αξιοποιείται και η μέθοδος rTMS (repetitive TMS), η οποία μπορεί να διεγείρει επανειλημμένα τον Εγκέφαλο και για τον λόγο αυτό πρέπει να εφαρμόζεται προσεκτικά, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση σπασμών. Ο χρόνος φλοιοκινητικής μεταγωγής που αντανakλά τη χρονική διάρκεια επεξεργασίας του ερεθίσματος από τον κινητικό φλοιό εν προκειμένω και της εκδήλωσης της μυϊκής αντίδρασης μπορεί να προσδιοριστεί με την αφαίρεση του χρόνου μεταφοράς του ερεθίσματος μέσω του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος. Αφαιρείται είτε η χρονική διάρκεια απόκρισης του μυ μετά από την άμεση διέγερση του νεύρου καθώς εξέρχεται από το μεσοσπονδύλιο τμήμα (λιγότερη ακριβής προσέγγιση), είτε η χρονική διάρκεια απόκρισης του μυ μετά από τη διέγερση των νευρικών απολήξεων που τον νευρώνουν άμεσα (επώδυνη, αλλά πιο ακριβής προσέγγιση). Με αυτή την μεθοδολογία αναδείχθηκε ότι η αμφοτερόπλευρη διέγερση των μυών του άνω άκρου είναι ισχυρότερη από την ετερόπλευρη, ενώ πραγματοποιήθηκε και η χαρτογράφηση των εγκεφαλικών νεύρων. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η νευρώση του σφιγκτήρα των βλεφάρων από την ηλικία του προσαγωγίου^[54].

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει και τη χαρτογράφηση σκοτούματος και στηρίζεται όχι στη διέγερση αλλά στην καταστολή: παρουσιάζονταν στους εθελοντές συγκεκριμένα γράμματα, τα οποία και όφειλαν να επαναλάβουν. Εάν η TMS πραγματοποιούνταν σε διάστημα μικρότερο των 40-60 μ s ή μεγαλύτερο των 120-140 μ s, δεν υπήρχε σωστή απόκριση^[57]. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκαν στοιχεία της οπτικής οδού (30 μ s απαιτούνται για την άφιξη του ερεθίσματος στον φλοιό του ινιακού λοβού). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος rTMS με

συχνότητα 5-10 Hz και έτσι μελετήθηκε ο ρόλος του Συμπληρωματικού Κινητικού Φλοιού στην οργάνωση και εκδήλωση των διαφόρων αλληλοκυκλών κινήσεων^{[58],[59]}. Αναδείχτηκε επίσης ότι οι ασθενείς που διαβάζουν τη γραφή Μπράιγ κινητοποιούν επίσης τον ινιακό λοβό τους, καταδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την μετατροπή ενός αισθητικού ερεθίσματος σε οπτικό και την εμπλεκόμενη σε αυτήν την διαδικασία νευρωνική πλαστικότητα^[60]. Παρομοίως, έγιναν μελέτες για την εμπλοκή του Πηλαγοραχιαίου Προμετωπιαίου Φλοιού στην ενεργό μνήμη και στην αντίδραση του ατόμου σε άδικες προσφορές και του Κοιλιακού Προμετωπιαίου Φλοιού στην ικανότητα υπολογισμών^{[61],[62]}.

Η διεγερσιμότητα που απαιτείται για την πρόκληση κινητικών προκλητών δυναμικών εξαρτάται από τους ενεργοποιημένους μεμονωμένους νευρώνες και την πυκνότητα τους στην περιοχή εφαρμογής του ερεθίσματος. Με την αξιολόγηση της δύναμης συστολής που προκύπτει γίνεται κατανοητή και η ένταση του ερεθίσματος. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει και τον προσδιορισμό των σχέσεων μεταξύ των νευρώνων του φλοιού μεταξύ τους: Δίνεται ερέθισμα μικρότερο από το απαιτούμενο με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται μόνο φλοιικοί νευρώνες. Στη συνέχεια δίνεται επαρκές ερέθισμα και παρατηρείται επίδραση των προηγουμένως ενεργοποιηθέντων νευρώνων στη διαμόρφωση της τελικής απόκρισης. Η όλη διαδικασία μεσολαβείται από υποδοχείς GABA^{[63],[64]}. Ανάλογα με το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των ερεθισμάτων, εκδηλώνεται αναστολή ή διευκόλυνση της αναμενόμενης απόκρισης. Για την αξιολόγηση της συναπτικής λειτουργίας, οι επιστήμονες προχώρησαν ως εξής: διεγείραν ένα μεμονωμένο νευρικό κύτταρο με τουλάχιστον 2 ερεθίσματα με μικρή χρονική διαφορά, εάν τα ερεθίσματα εντοπιζόνταν στο ίδιο συναπτικό μονοπάτι ονομάζονταν ομοσυναπτικά, ενώ αν εντοπιζόνταν σε διαφορετικά καλούνταν έτεροσυναπτικά. Αυξημένη συναπτική ισχύς αντιστοιχεί στην μακροχρόνια ενδυνάμωση (Long-Term Potentiation, LTP), ενώ μειωμένη συναπτική ισχύς σε μακροχρόνια καταστολή (Long-Term Depression, LTD)^{[11],[53],[54],[65]}. Σε περίπτωση συνδυασμού ενός ερεθίσματος από το μέσο νεύρο και ενός ερεθίσματος από τον σωματοαισθητικό φλοιό μετά από 25 ms, τα δύο ερεθίσματα φτάνουν την ίδια περίπου χρονική στιγμή στον καρπό και διεγείρουν απόκριση. Αν το ερέθισμα από τον φλοιό φτάσει νωρίτερα, η απόκριση καταστέλλεται. Πρόκειται για LTP και LTD αντίστοιχα. Οι μέθοδοι διέγερσης και καταστολής με την TMS περιγράφονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Μέθοδοι αξιοποίησης της TMS

(Προσαρμογή από Πίνακας 1, Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*. 2007;55(2):187-199. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.026)

Μέθοδος	Διέγερση	Καταστολή	Παρατηρήσεις
rTMS	Υψηλή συχνότητα, ≥ 5 Hz	Χαμηλή συχνότητα, 0,2-1 Hz	Αναλύεται στο Κείμενο
TBS	διαλείπουσα	συνεχής	Διέγερση Κατακλυσμού Θήτα ^{[66],[67]} : η συχνότητα ερεθίσματος έχει σημασία
tDCS	ανοδική	καθοδική	Άμεση Διακρανιακή Διέγερση μέσω Ρεύματος: ανοδική διεγείρει, καθοδική καταστέλλει (δεν πρόκειται για μαγνητική τεχνική)
PAS	σύγχρονη ετεροσυναπτική διέγερση	ασύγχρονη ετεροσυναπτική διέγερση	Παράδειγμα Διέγερσης κατά Ζεύγη αποτελεί το παράδειγμα φλοιού-μέσου νεύρου ^{[53],[54]}

Η μέθοδος TMS συνδυάζεται και με το ΗΕΓ για την μέγιστη αξιοποίηση και των 2 μεθόδων^{[53],[68],[69],[70]}. Η TMS προκαλεί ρεύμα από επαγωγή το οποίο διεγείρει τους υποκείμενους ιστούς και επηρεάζει συνδέσεις στον φλοιό, μεταξύ φλοιού και θαλάμου και μεταξύ φλοιού και παρεγκεφαλίδας. Από αυτήν την ηλεκτρική διέγερση προκύπτουν διεγερτικά και ανασταλτικά μετασυναπτικά δυναμικά, τα οποία καταγράφονται με το ΗΕΓ. Το μαγνητικό πεδίο που επάγει τη δημιουργία ρεύματος μέσω της TMS ενδέχεται να διεγείρει και άλλες δομές, όπως το δέρμα, νεύρα, μύες, το κρανίο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ακόμη και τα ίδια τα ηλεκτρόδια του ΗΕΓ. Για την υπέρβαση αυτού του ζητήματος χρησιμοποιείται κατάλληλος εξοπλισμός για την ελαχιστοποίηση του πιθανού θορύβου στο ΗΕΓ. Η μέθοδος TMS αξιοποιείται για να διεγείρει ή να καταστέλλει συγκεκριμένες νευρικές λειτουργίες, με τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω και να προσδώσει με αυτόν τον τρόπο στην καταγραφή του ΗΕΓ που θα προκύψει σχέση αιτίου-αποτελέσματος. Επίσης, θα πρέπει να προσδιοριστούν με σαφήνεια διάφορες παράμετροι της πειραματικής διάταξης, όπως η ένταση του ερεθίσματος, η θέση του, ο αριθμός και η συχνότητα των διεγέρσεων και η κατάσταση του εγκεφάλου (αναπτυξιακό στάδιο/ ηλικία, κατάσταση εγρήγορης, κirkάδιος ρυθμός, κατάσταση υγείας). Η αποτίμηση του ΗΕΓ πραγματοποιείται είτε με τις αναλύσεις reactivity (με στόχο τον χαρακτηρισμό της αντίδρασης του εγκεφάλου ή συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών σε κάποιο ερέθισμα ή γεγονός ή αλληλαγή της εγκεφαλικής λειτουργίας) ή με τις αναλύσεις connectivity (με στόχο την περιγραφή της αλληλεπιδράσεως δύο ή περισσότερων εγκεφαλικών περιοχών)^[71].

Η συνδυαστική μέθοδος TMS-HEG έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών και διερευνά μεταξύ άλλων την διεγερσιμότητα του φλοιού, την πλαστικότητα των

νευρικών συνδέσεων, την αγωγή και επεξεργασία ερεθισμάτων στον φλοιό, τις συνδέσεις μεταξύ των ημισφαιρίων και τις συνδέσεις του φλοιού με την παρεγκεφαλίδα και τον θάλαμο. Για την αξιολόγηση του κινητικού φλοιού συχνά χρησιμοποιείται και ηλεκτρομυογράφημα. Υπάρχουν 2 προσεγγίσεις: η προσέγγιση online (κατάσταση ηρεμίας-1^η καταγραφή, ερέθισμα, τροποποιημένη κατάσταση-2^η καταγραφή) και η προσέγγιση offline (συνεχής καταγραφή των τροποποιήσεων που επιφέρει η TMS). Επίσης, η μέθοδος αξιοποιείται και σε κλινικό επίπεδο για διαγνωστικούς, προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς^[53].

6. Οπτογενετική

Η Οπτογενετική αποτελεί ίσως την επιτομή των προσπαθειών της νευροεπιστήμης να χαρτογραφήσει τον Εγκέφαλο συνολικά^[5]. Αποτελεί μία μέθοδο αιχμής που ξεκίνησε να εφαρμόζεται από το 2005^[72]. Κατορθώνει να καταστήσει την απεικόνιση των συνδέσεων σε όλα τα επίπεδα- από το μικροσκοπικό στο μακροσκοπικό- ανεξάρτητα από συμπεριφορικές παραμέτρους ή διάφορες άλλες καταστάσεις που επηρεάζουν τις υπόλοιπες μεθόδους. Η Οπτογενετική στηρίζεται στην επιλεκτική έκφραση διαφόρων χρωστικών στους νευρώνες που καθλούνται οψίνες, η διέγερση των οποίων με φως κατάλληλου μήκους κύματος προκαλεί ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της νευρωνικής δραστηριότητας. Η χωρική διακριτική ικανότητα αυτής της μεθόδου αγγίζει το κάθε νευρικό κύτταρο, ενώ χρονικά περιορίζεται σε λίγα ms^[5]. Η Οπτογενετική προσφέρεται για μελέτες τόσο in vivo, όσο και για μελέτες in vitro, ανάλογα με τον στόχο της πειραματικής διάταξης. Στις μελέτες in vitro, η έμφαση δίνεται στα μικροκυκλώματα, ενώ στις μελέτες in vivo στόχο αποτελούν οι συνδέσεις σε ολόκληρο τον εγκέφαλο.

Οι οψίνες που αξιοποιούνται στην μεθοδολογία

της Οπτογενετικής περιλαμβάνουν τόσο οψίνες που διεγείρουν την δραστηριότητα του νευρώνα, με χαρακτηριστικότερη την Channelrhodopsin 2 (ChR2) έναν μη ειδικό κατιονικό δίαυλο που αποκρίνεται σε διέγερση μπλε χρώματος, όσο και ανασταθτικές όπως η Halorhodopsin και Archeorhodopsin^[73]. Η επιλεκτική έκφραση των οψινών στους επιθυμητούς κυτταρικούς πληθυσμούς επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι οι ακόλουθοι: χρήση viral vector (κυρίως τον αδενοσχετιζόμενο ιό), in utero electroporation (ηλεκτροδιάτρηση) και τη δημιουργία διαγονιδιακών πειραματόζων^[5].

Συχνά η μεθοδολογία της Οπτογενετικής συνδυάζεται και με ηλεκτροφυσιολογικές ή/και κλασικές νευροπεικονιστικές μεθόδους, ανάλογα με τον ερευνητικό σκοπό. Μία χαρακτηριστική συνδυαστική εφαρμογή με ηλεκτροφυσιολογικές τεχνικές έδειξε ότι διέγερση στις στοιβάδες 2/3 του barrel cortex των αρουραίων (πρόκειται για τους νευρώνες που εξέφραζαν ChR2) οδήγησε σε αυξημένη πυροδότηση δυναμικών ενέργειας σε νευρώνες με νευροδιαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)^{[74],[75]}. Ορισμένοι από αυτούς έδωσαν καταγραφές μεγάλου πλάτους και το δυναμικό τους εμφάνισε ταχύτατα αιχμή, ενώ άλλοι εμφάνισαν αναλογικά αργά την αιχμή του δυναμικού τους και η καταγραφή τους παρουσίασε μικρό σχετικά πλάτος. Προέκυψε έτσι το συμπέρασμα ότι οι πρώτοι είναι οι κύριοι ανασταθτικοί νευρώνες του φλοιού. Η συγκεκριμένη διάταξη πραγματοποιήθηκε in vitro σε μία τομή εγκεφάλου. Αποτελεί χαρακτηριστική διάταξη διερεύνησης απλών νευρικών κυκλωμάτων.

Η υποβοηθούμενη από την ChR2 χαρτογράφηση των κυκλωμάτων (ChR2-assisted circuit mapping, CRACM) αποτελεί μεθοδολογία, η οποία επιτρέπει την επιλεκτική φωτοδιέγερση πολλοπληθών σημείων σε τομές εγκεφάλου και την ανίχνευση της μετασυναπτικής δραστηριότητας. Με αυτήν τη μέθοδο διαπιστώθηκε ότι υπάρχει σημαντικά πιο εκτεταμένη επικοινωνία μεταξύ των στοιβάδων 2/3 του ισοφλοιού με την στοιβάδα 5, σε σχέση με τη στοιβάδα 6. Ωστόσο παρότι είναι δυνατή η διέγερση μεμονωμένων κυττάρων, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για τη μελέτη της δραστηριότητας των υποφλοιωδών δομών ή τις μελέτες in vivo^[5]. Επίσης, δε φαίνεται ότι αντανάκλα την πολυπλοκότητα των νευρικών συνδέσεων, αφού αγνοεί σημαντικές παραμέτρους όπως τη χρονική διάσταση και αλληλεπίδραση των σημάτων. Πηγή έμπνευσης αυτής της μεθόδου αποτέλεσε η μέθοδος φωτοδιέγερσης με τη χρήση laser-scanning (laser-scanning photostimulation, LSPS), η οποία πυροδοτεί την απελευθέρωση γλουταμικού και επιτρέπει την καταγραφή μετασυναπτικών δυναμικών^[76].

Η Οπτογενετική βρίσκει εφαρμογή και σε μελέ-

τες in vivo. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε μελέτη φωτοδιέγερσης του κινητικού φλοιού και καταγραφής των χαρακτηριστικών κινήσεων που προκλήθηκαν. Αυτή η τεχνική χαρακτηρίστηκε Light Based Mapping (LBM)^[5]. Στην LBM, χρησιμοποιείται γενετικά τροποποιημένος κινητοαισθητικός φλοιός μυ. Στα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδας 5 εκφράζονται οι οψίνες ChR2. Αυτές διεγείρονται με μπλε φως μήκους κύματος 473 nm και οι προκαλούμενες κινήσεις καταγράφονται με ηλεκτρομυογράφημα. Αυτή η μεθοδολογία είναι κατάλληλη για τη μελέτη σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων των ενεργοποιούμενων εγκεφαλικών περιοχών σε κινήσεις απαγωγής και προσαγωγής, αλλά και στις κινήσεις της γλώσσας. Και αυτή η μεθοδολογία ενέχει μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρονική αλληλεπίδραση, τη διάχυση φωτός (μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση οψινών που ανταποκρίνονται στο κόκκινο χρώμα), την επικάλυψη των δενδριτών πολλών νευρώνων και τον περιορισμό της σε μύες και τρωκτικά, αλλά και την περιορισμένη εφαρμογή στον κινητοαισθητικό φλοιό. Η παρούσα μέθοδος θεωρείται βελτιωμένη εκδοχή της ενδοφλοιώδους μικροδιέγερσης (intracortical microstimulation, ICMS). Η ICMS στηρίζεται επίσης στον προσδιορισμό των περιοχών του κινητοαισθητικού φλοιού με βάση τις διάφορες κινήσεις, δεν επιτρέπει ωστόσο τον εντοπισμό της ορθόδρομης κίνησης της ηλεκτρικής ώσης, ενώ περιλαμβάνει και τη χρήση μικροηλεκτροδίων, των οποίων η χρήση ενδέχεται να προκαλέσει ιστικές βλάβες^{[77],[78],[79]}.

Μεγάλη ώθηση στην Οπτογενετική έδωσε η χρήση των καλούμενων ευαίσθητων στο δυναμικό χρωστικών (voltage sensitive dyes, VSD)^[80]. Πρόκειται για μικρά μόρια, τα οποία ανάλογα με τις αλλαγές του δυναμικού μετακινούνται εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης. Η χωρική ανάλυση αυτής της μεθόδου υπολογίζεται στα 0,5 μm, ενώ η χρονική κυμαίνεται σε επίπεδα ms. Οι VSD ανταποκρίνονται στις άμεσες αλλαγές δυναμικού, καθώς δε χρειάζεται να τροποποιηθούν σημαντικά την διαμόρφωση τους. Για το λόγο αυτόν ανιχνεύουν τις μεταβολές δυναμικού με μεγάλη ακρίβεια, ακόμα και αν είναι κάτω ή υπερβαίνουν κατά πολύ την βαλβίδα ερεθισμού. Ωστόσο, καταγράφουν χωρίς ειδικότητα τη δραστηριότητα πολλών κυττάρων, δεν μπορούν να αξιοποιηθούν για μακροπρόθεσμο έλεγχο της νευρωνικής δραστηριότητας (έχουν ενοχοποιηθεί για τα φαινόμενα photobleaching & photodamage) και υπάρχει η υπόνοια ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα του υποδοχέα GABA. Οι νέες οψίνες RH-series θα ανταποκρίνονται στο κόκκινο χρώμα (και συνεπώς σε ένα σημαντικό υψηλότερο μήκος κύματος από τις ChR2) και ίσως επιτρέψουν την ταυτόχρονη επεξεργασία διαφόρων σημάτων χωρίς να προκύπτει σύγχυση^[81].

Με αυτά τα μόρια επιδιώκεται η ανίχνευση των

κυριότερων συνδέσεων του Εγκεφάλου και του σημείου έναρξης του δυναμικού *in vivo*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο λανθάνων χρόνος (8 ms) μεταβίβασης του ερεθίσματος από τον φλοιό barrel στον πρωτοταγή κινητικό φλοιό, που αποτελεί παράδειγμα μονοσυναπτικής διαβίβασης. Με την ταυτόχρονη χρήση των VSD και των ChR2 επιδιώκεται ο προσδιορισμός των λειτουργιών με μεγάλη χωρική και χρονική ανάλυση λιγότερο προσβάσιμων φλοιικών περιοχών, όπως είναι οι δευτεροταγείς περιοχές. Αυτές περιλαμβάνουν περιοχές-κόμβους με τεράστιο αριθμό συνδέσεων, αλλά και περιοχές με ελάχιστες συνδέσεις ή και άλλες ασύμμετρες περιοχές μεταξύ των ημισφαιρίων. Μέσω γενετικών τροποποιήσεων ενσωματώνονται οι οψίνες ChR2 στα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδας 5 του ισοφλοιού και εγχύονται οι VSD σε όλο τον εγκέφαλο. Διεγείρονται με φως μήκους κύματος 473 nm και παρατηρούνται οι αλλαγές δυναμικού σε περιοχές ενδιαφέροντος, ενώ προσδιορίζεται παράλληλα και η ένταση της σύνδεσης. Μέσω γενετικής τροποποίησης προέκυψαν μύες Thy1-GFP, στους οποίους οι ChR2 εκφράζονται στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων στη στοιβάδα 5. Σε αυτούς μελετήθηκαν οι σχέσεις φλοιού-θαλάμου, καθώς και οι συνδέσεις μεταξύ των διαφόρων στοιβάδων του φλοιού^[82].

Επιπλέον χρησιμοποιούνται φθορίζουσες πρωτεΐνες ευαίσθητες στο δυναμικό (voltage sensitive fluorescent proteins, VSFP)^[83]. Αυτές είναι σε θέση να ανιχνεύουν τη δραστηριότητα των νευρώνων, χωρίς να επηρεάζονται από αιμοφόρα αγγεία, νευρογλοιακά κύτταρα και ανενεργούς νευρώνες. Οι VSFP 2^{ns} γενιάς περιέχουν μια φθορίζουσα υπομονάδα αναφοράς και μία ευαίσθητη στο δυναμικό. Το κυριότερο μειονέκτημα τους αφορά την αργή κινητική τους, η οποία μειώνει σημαντικά τη χρονική ανάλυση. Παρόμοιας δράσης είναι και οι γενετικά κωδικοποιημένοι δείκτες ασβεστίου (genetic encoded calcium indicators, GECIs)^{[84],[85]}. Οι GECIs είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν τόσο για εστιασμένες όσο και για ευρείες μελέτες νευρικών συνδέσεων, χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα, αλλά απομακρύνονται αργά και δεν μπορούν να ανιχνεύσουν διαβαθμίσεις δυναμικών.

Στο σκοπό της καλούμενης «οικουμενικής χαρτογράφησης» συμβάλλει και ο συνδυασμός της Οπτογενετικής με τη fMRI^[86]. Αυτή η μέθοδος δεν περιορίζεται μόνο σε επίπεδο συνάψεων και τοπικών συνδέσεων, αλλά επιτρέπει μία συνολική προσέγγιση, με την ταυτόχρονη διερεύνηση της συμμετοχής των υποφλοιωδών δομών. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται ως ακολούθως: χρησιμοποιούνται γενετικά τροποποιημένοι μύες που εκφράζουν επιλεκτικά τον δίαυλο ChR2 στον πρωτοταγή κινητικό τους φλοιό (M1) και συγκεκριμένα στα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδας 5 του ισοφλοιού. Διαπιστώθηκε -κατόπιν διέγερσης- ότι ενεργοποιούνται και περιοχές μακριά από το σημείο διέγερσης, υποδηλώνοντας συνδέσεις μεταξύ διαφόρων περιοχών. Με την ίδια μεθοδολογία προέκυψαν αιμοδυναμικές αλλαγές (σήματα BOLD), οι οποίες επιβεβαίωσαν συνδέσεις μεταξύ του φλοιού barrel και περιοχών σχετιζόμενων με τον σωματοαισθητικό φλοιό, όπως τις αντίστοιχες δευτεροταγείς περιοχές και υποφλοιώδεις δομές, όπως ο κερκοφόρος πυρήνας. Μέσω Οπτογενετικής διερευνήθηκε και ο ρόλος πυρήνων του Θαλάμου. Διέγερση των πρόσθιων πυρήνων οδήγησε σε ενεργοποίηση αμφοτερόπλευρων κινητικών φλοιικών περιοχών, ενώ ενεργοποίηση των οπισθίων πυρήνων οδήγησε σε ενεργοποίηση ετερόπλευρων σωματοαισθητικών φλοιικών περιοχών. Αυτή η παρατήρηση είναι συνεπής με ήδη γνωστές συνδέσεις^[5].

7. Τρέχοντα Προγράμματα Χαρτογράφησης του Εγκεφάλου

Σε πολλές χώρες του πλανήτη εφαρμόζονται προγράμματα χαρτογράφησης του Εγκεφάλου, με κύριο στόχο τον προσδιορισμό των δομικών και λειτουργικών συνδέσεων που τον διακρίνουν. Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί γίνεται μία συνοπτική σύγκριση των 3 κυριότερων προγραμμάτων που προέρχονται από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ιαπωνία, ενώ παρόμοιες πρωτοβουλίες έχουν κινηθεί το ενδιαφέρον των επιστημόνων τόσο στην Κίνα, όσο και στην Αυστραλία^[3].

Πίνακας 4: Συνοπτική σύγκριση των Προγραμμάτων Χαρτογράφησης του Εγκεφάλου ως προς την διάρθρωση τους

Ευρωπαϊκή Ένωση-Πρόγραμμα Human Brain Project (HBP)	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής-Πρόγραμμα Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies (BRAIN)	Ιαπωνία- Πρόγραμμα Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies (Brain/MINDS)
13 Υποομάδες Έρευνας 1. Στρατηγικά Δεδομένα από Εγκέφαλο Μυ 2. Στρατηγικά Δεδομένα από Εγκέφαλο Ανθρώπου 3. Αρχιτεκτονική Γνωστικών Λειτουργιών 4. Η Μαθηματική & Θεωρητική Βάση της Μελέτης του Εγκεφάλου 5. Νευροπληροφορική 6. Διέγερση του Εγκεφάλου 7. Υπολογιστικά Συστήματα Υψηλής Απόδοσης 8. Ιατρική Πληροφορική 9. Υπολογιστική Νευρομορφολογία 10. Νευρορομποτική 11. Εφαρμογές 12. Ηθική & Κοινωνία 13. Διαχείριση	7 Άξονες-Στόχοι 1. Καθορισμός κυτταρικών τύπων Εγκεφάλου 2. Χαρτογράφηση Εγκεφάλου σε διαφορετικές κλίμακες 3. Καταγραφή νευρικών κυκλωμάτων σε διανοητικές δραστηριότητες 4. Συμπεριφορά & Νευρικά Κυκλώματα 5. Ανάπτυξη Υπολογιστικών & Στατιστικών Μεθόδων στη Χαρτογράφηση 6. Εφαρμογές στην Κατανόηση της Παθοφυσιολογίας Νοσημάτων 7. Συνδυαστική Προσέγγιση	3 Άξονες Προγράμματος 1. Μελέτη δομικής & λειτουργικής Χαρτογράφησης του Εγκεφάλου της μαρμოსέτας 2. Ανάπτυξη πρωτοποριακής μεθοδολογίας για τη Χαρτογράφηση του Εγκεφάλου 3. Χαρτογράφηση του Ανθρώπινου Εγκεφάλου & Κλινική Έρευνα

Στην Ιαπωνία προτάθηκε η μελέτη του Εγκεφάλου της μαρμოსέτας ή ζαρίς ή σαγκόιν (*Callithrix jacchus*)^{[87],[88],[89]}. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος fMRI-DTI, η οποία βασίζεται στην ανισοτροπία των μορίων νερού στον νευράξονα με σκοπό τον προσδιορισμό των νευρικών συνδέσεων σε επίπεδο μακροσυνδέσεων^{[90],[91],[92]}. Η χωρική ανάλυση ex- και in vivo υπολογίζεται στα 50 μm^3 και 300 μm^3 αντίστοιχα. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί σε πειραματικά μοντέλα μελέτης της νόσου του Parkinson. Η μέθοδος Voxel Based Morphometry (VBM) χρησιμοποιήθηκε και στον άνθρωπο για τον προσδιορισμό νευροανατομικών διαφορών, σημαντικών για την ανάπτυξη διαφόρων διαταραχών.

Και στις ΗΠΑ παρατηρείται συναφής διάρθρωση του αντίστοιχου προγράμματος χαρτογράφησης, όπως αποδεικνύεται και στον Πίνακα 4. Οι Επιστήμονες επεσήμαναν επίσης τις θεμελιώδεις αρχές του προγράμματος: συνδυασμός έρευνας σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους, διεπιστημονική συνεργασία, πολυδιάστατη χρονική και χωρική ανάλυση, ελεύθερη κοινοποίηση δεδομένων, ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων τεχνολογιών, καθορισμός κανόνων ηθικής και παροχή δυνατότητας αξιολόγησης

των δράσεων του προγράμματος από τους χορηγούς^[1]. Επιδιώκεται η ανάπτυξη κατάλληλου μοντέλου του Εγκεφάλου, ικανού να αντικατοπτρίζει την πλαστικότητα των νευρικών κυκλωμάτων στο σύνολο των δραστηριοτήτων του ανθρώπου με καλή χρονική και χωρική ανάλυση των δομών που πρωτοστατούν στην κάθε δραστηριότητα, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Για τον σκοπό αυτό προτάσσεται η συνεργασία πολλών εργαστηρίων ανά τον κόσμο και η ταυτόχρονη μελέτη διαφόρων συμπεριφορικών προτύπων στον άνθρωπο και σε άλλα είδη (όπως η δυνατότητα προβλέψεων, λήψης αποφάσεων, μνήμης, κίνησης και αίσθησης). Η συνεργική εφαρμογή των γνωστών μεθόδων πιστεύεται ότι θα συμβάλει σε αυτήν την προοπτική.

Τέλος, αξίζει να γίνει αναφορά σε ένα ακόμη emblematicό πρόγραμμα χαρτογράφησης του Εγκεφάλου, το καλούμενο Human Connectome Project (HCP)^{[41],[92]}. Το HCP έθεσε πολλαπλούς στόχους, μεταξύ άλλων: την απόκτηση πολλαπλών απεικόνιστων των εγκεφάλων πολλών ανθρώπων σε μεγάλη ανάλυση και με ποικίλες μεθοδολογίες της απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού, τη δρα-

στική μείωση του θορύβου, τη δημιουργία ενός πλαισίου αναφοράς στη στοίχιση των απεικονίσεων πολλών ατόμων με στόχο την επιτάχυνση της στατιστικής ανάλυσης και την κοινοποίηση των δεδομένων σε άλλους νευροεπιστήμονες. Ο κυριότερος στόχος ήταν η δημιουργία ενός αξιόπιστου συστήματος συντεταγμένων, τόσο για τις φλοιικές όσο και για τις υποφλοιώδεις δομές (τις λεγόμενες grayordinates), με βασικό σκοπό αυτές οι συντεταγμένες να είναι εφαρμόσιμες και για τους 1100 (και όχι μόνο) διαφορετικούς εγκεφάλους των εθελοντών που μελετήθηκαν στην πρώτη φάση του προγράμματος, ανεξάρτητα από τις όποιες φυσιολογικές ή και παθολογικές διαφορές. Το HCP διαφοροποιείται σημαντικά από άλλα προγράμματα νευροαπεικόνισης: δεν στηρίζεται σε απεικόνιση με voxel από ελάχιστους εγκεφάλους, δεν επαναπαύεται σε ατελείς στοιχίσεις μεταξύ των μελετώμενων εγκεφάλων, δε στηρίζεται στα πεδία κατά Brodmann και δεν περιορίζει την πρόσβαση στα δεδομένα και στην μεθοδολογία χαρτογράφησης. Στο πλαίσιο του HCP, πραγματοποιήθηκε μη-επεμβατικός προσδιορισμός του περιεχομένου μυελίνης στο φλοιό, του πάχους του φλοιού και ο σχεδιασμός γεωμετρικών μοντέλων της ανατομίας του εγκεφάλου. Η μέθοδος fMRI εφαρμόστηκε τόσο σε φάσεις ανάπαυσης, όσο και σε διάφορες κατάλληλες δοκιμασίες για την αξιολόγηση των εμπλεκόμενων νευρικών κυκλωμάτων. Η μέθοδος diffusion MRI (dMRI) βασίζεται στη διάχυση των μορίων νερού στην λευκή ουσία του Εγκεφάλου για την κωδικοποίηση του προσανατολισμού του νευράξονα^{[26],[93],[94]}. Σημασία έχει και η χωρική ανάλυση. Η fMRI έχει χωρική ανάλυση 2 mm, η οποία θεωρείται επαρκής, εφόσον δε ξεπερνά το πάχος του φλοιού (2,6 mm) και επιτρέπει την διάκριση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, της λευκής και της φαιάς ουσίας. Η dMRI επιτρέπει τη χαρτογράφηση των συνδέσεων κατά μήκος των νευραξόνων με διάμετρο ακόμη και μικρότερη του 1 μm. Για τη χρήση της μεθόδου fMRI-BOLD είναι απαραίτητη η λήψη εικόνων σε διάστημα 2-3 δευτερολέπτων, καθώς επάγονται αλλαγές στα επίπεδα της ανηγμένης αιμοσφαιρίνης ως απόρροια των αλλαγών στη νευρική λειτουργία. Ωστόσο πιθανές κινήσεις του εξεταζόμενου, περιορισμοί της ίδιας της μεθόδου, ακόμη και ιδιοσυγκρασιακές αλλαγές προερχόμενες από τους παραρρινίους κόλπους και τον ακουστικό πόρο προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο μαγνητικό πεδίο και δυσχεραίνουν σημαντικά την προσπάθεια ακριβούς χαρτογράφησης με άριστη χωρική και χρονική ανάλυση. Λόγω της ανατομικής διάταξης του εγκεφαλικού φλοιού-που ομοιάζει με πτυχωμένο φύλλο- το HCP δε χρησιμοποιεί τα voxel όπως στην περίπτωση των υποφλοιωδών δομών, αλλά μια εναλλακτική χωρική μονάδα τα vertices. Τα vertices- vertex στον ενικό- αντιστοι-

χούν στην εξάστιβη φλοιική δομική μονάδα του εγκεφάλου^{[95],[96]}. Ο συνδυασμός από τα voxel και vertices αποτελούν τις grayordinates. Με τη χρήση αυτοματοποιημένων εργαλειαθκών (όπως το Fieldtrip^{[41],[52]}) μειώνεται δραστικά ο απαιτούμενος χρόνος επεξεργασία και ανάλυσης των δεδομένων, ενώ ενισχύεται περαιτέρω η αξιοπιστία των μεθόδων. Ο ακριβής προσδιορισμός των προτύπων πτύχωσης, της αρχιτεκτονικής, της λειτουργίας, της τοπογραφίας και των συνδέσεων του φλοιού, καθώς και ο προσδιορισμός του μεγέθους, του σχήματος και της τοποθεσίας των υποφλοιωδών δομών σε συνδυασμό με τη δυνατότητα στοίχισης και καθολικής εφαρμογής βρίσκονται στο επίκεντρο του HCP. Με τα κριτήρια που έθεσε το πρόγραμμα (στην πρώτη του έκδοση) για τον προσδιορισμό των περιοχών του φλοιού (Πίνακας 5) προέκυψαν συνολικά 180 φλοιικές περιοχές, 83 εκ των οποίων είχαν προσδιοριστεί και στο παρελθόν και 97 προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά. Χωρίς την πρόοδο της πληροφορικής και των διαθέσιμων βάσεων δεδομένων (όπως η Connectome DB), η επεξεργασία του τεράστιου αυτού όγκου δεδομένων, αλλά και η ελεύθερη διάθεση του στην επιστημονική κοινότητα δε θα ήταν εφικτή. Προέκυψαν συνολικά 91282 grayordinates για τη χαρτογράφηση του φλοιού και των υποφλοιωδών δομών, 30 χιλιάδες vertices προέκυψαν για κάθε ημισφαίριο (2 χιλιάδες vertices λιγότερα από τις 32 χιλιάδες που αναμενόταν καθώς δε συμπεριλήφθηκε το ενδιάμεσο μη φλοιώδες τοίχωμα)^[38].

Πίνακας 5: Κριτήρια Ορισμού Φλοιικών Περιοχών σύμφωνα με το HCP^[38]

1. Προσδιορίζεται με σαφή όρια σε αρκετούς εξεταζόμενους και επιβεβαιώνεται με κατάλληλη στοίχιση
2. Εξετάζεται σε διάφορες καταστάσεις και με διάφορες μεθόδους
3. Περιλαμβάνεται στις ήδη προσδιορισμένες περιοχές/εύρεση κατάλληλης ονομασίας για τις νέες περιοχές
4. Πρότυπο περιοχών εύκολα εφαρμόσιμο και αναπαραγωγίμο σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ανθρώπων

8. Συμπεράσματα

Στη σύγχρονη νευροφυσιολογία οι δυνατότητες χαρτογράφησης του Εγκεφάλου είναι άφθονες. Για την ολική χαρτογράφηση του ανθρώπινου Εγκεφάλου απαιτείται μία συνδυαστική προσέγγιση, έτσι ώστε να συνδυαστούν αρμονικά όλα τα δεδομένα από τα διάφορα επίπεδα χαρτογράφησης. Η ολική χαρτογράφηση του ανθρώπινου Εγκεφάλου θεωρούνταν απλησίαστο όνειρο, τόσο λόγω του τεράστιου αριθμού νευρώνων, αλλά πολύ περι-

σότερο λόγω των αμέτρητων και πολύπλοκων λειτουργικών συνδέσεων μεταξύ τους. Ενδεικτική της τεράστιας δυσκολίας στην χαρτογράφηση του Εγκεφάλου αποτελεί η περιορισμένη πρόοδος που έχει σημειωθεί μέχρι στιγμής σε επίπεδο πειραματόζων. Οι πρώτες προσπάθειες χαρτογράφησης πραγματοποιήθηκαν με βάση ιστολογικές μεθόδους. Με κατάλληλες χρώσεις ο Brodmann επεδίωξε τον προσδιορισμό των διαβαθμίσεων στην κυτταροαρχιτεκτονική, ενώ σύγχρονοι του πρόταξαν τη μελέτη της ποικιλομορφίας της μυελοαρχιτεκτονικής. Πλέον, η ιστολογική διερεύνηση του Εγκεφάλου έχει ενισχυθεί σημαντικά και με την αξιοποίηση κατάλληλων μοριακών μεθόδων, με στόχο την ανίχνευση νευρώνων που εκφράζουν εκλεκτικά συγκεκριμένους νευροδιαβιβαστές ή υποδοχείς. Σε επίπεδο απεικονιστικών μεθόδων, οι κλασικές μέθοδοι, όπως το ΗΕΓ και η fMRI συνεισφέρουν νεότερες μεθόδους, όπως τη Διακρανιακή Μαγνητική Διέγερση που αποτελεί και κλινικό εργαλείο, αλλά και την Οπτογενετική, τη μέθοδο που σε πειραματικό επίπεδο άλλαξε καθοριστικά τις δυνατότητες χαρτογράφησης του Εγκεφάλου. Η ανάγκη πολύπλευρης διερεύνησης των λειτουργικών συνδέσεων του Εγκεφάλου αντικατοπτρίζεται και στους στόχους των τρεχόντων προγραμμάτων χαρτογράφησης στον κόσμο. Τα προγράμματα αυτά συνδυάζουν δεδομένα από διάφορα πειραματόζωα και από υγιείς εθελοντές ή ασθενείς στην προσπάθεια χαρτογράφησης του Εγκεφάλου. Το Human Connectome Project (HCP), το πιο εμβληματικό πρόγραμμα κατόρθωσε και πέτυχε να προσδιορίσει καθολικά εφαρμόσιμες συντεταγμένες για τον εγκεφαλικό φλοιό και τις υποφλοιώδεις δομές. Πλέον, το πρόγραμμα στρέφεται στη διερεύνηση της εγκεφαλικής λειτουργίας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και ηλικιακές ομάδες. Το μέλλον στη χαρτογράφηση του Εγκεφάλου προμηνύεται πολύ υποσχόμενο.

Βιβλιογραφία

- [1] Jorgenson LA, Newsome WT, Anderson DJ, et al. The BRAIN Initiative: developing technology to catalyse neuroscience discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1668):20140164. doi:10.1098/rstb.2014.0164
- [2] Thompson PM, Jahanshad N, Schmaal L, et al. The Enhancing Neuroimaging Genetics through Meta-Analysis Consortium: 10 Years of Global Collaborations in Human Brain Mapping. *HumBrainMapp.* 2022;43(1):15-22. doi:10.1002/hbm.25672
- [3] Okano H, Miyawaki A, Kasai K. Brain/MINDS: brain-mapping project in Japan. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1668):20140310. doi:10.1098/rstb.2014.0310
- [4] Perkel JM. Mapping neural connections. *Bio-techniques.* 2014;57(5):230-236. Published 2014 Nov 1. doi:10.2144/000114224
- [5] Lim DH, Ledue J, Mohajerani MH, Vanni MP, Murphy TH. Optogenetic approaches for functional mouse brain mapping. *FrontNeurosci.* 2013;7:54. Published 2013 Apr 10. doi:10.3389/fnins.2013.00054
- [6] Shibata S, Komaki Y, Seki F, Inouye MO, Nagai T, Okano H. Connectomics: comprehensive approaches for whole-brain mapping. *Microscopy (Oxf).* 2015;64(1):57-67. doi:10.1093/jmicro/dfu103
- [7] White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1986;314(1165):1-340. doi:10.1098/rstb.1986.0056
- [8] Meinertzhagen IA, O'Neil SD. Synaptic organization of columnar elements in the lamina of the wild type in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* 1991;305(2):232-263. doi:10.1002/cne.903050206
- [9] Takemura SY, Nern A, Chklovskii DB, Scheffer LK, Rubin GM, Meinertzhagen IA. The comprehensive connectome of a neural substrate for 'ON' motion detection in *Drosophila*. *Elife.* 2017;6:e24394. Published 2017 Apr 22. doi:10.7554/eLife.24394
- [10] Geyer S, Weiss M, Reimann K, Lohmann G, Turner R. Microstructural Parcellation of the Human Cerebral Cortex - From Brodmann's Post-Mortem Map to in vivo Mapping with High-Field Magnetic Resonance Imaging. *FrontHumNeurosci.* 2011;5:19. Published 2011 Feb 18. doi:10.3389/fnhum.2011.00019
- [11] Amunts K, Schleicher A, Zilles K. Cytoarchitecture of the cerebral cortex--more than localization. *Neuroimage.* 2007;37(4):1061-1068. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.02.037
- [12] Amunts K, Hawrylycz MJ, Van Essen DC, et al. Interoperable atlases of the human brain. *Neuroimage.* 2014;99:525-532. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.06.010
- [13] Ding SL, Van Hoesen GW, Cassell MD, Poremba A. Parcellation of human temporal polar cortex: a combined analysis of multiple cytoarchitectonic, chemoarchitectonic, and pathological markers. *J CompNeurol.* 2009;514(6):595-623. doi:10.1002/cne.22053
- [14] Augustinack JC, Magnain C, Reuter M, van der Kouwe AJ, Boas D, Fischl B. MRI parcellation of ex vivo medial temporal lobe. *Neuroimage.* 2014;93 Pt 2:252-259. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.05.053
- [15] Dinse J, Härtwich N, Waehnert MD, et al. A

- cytoarchitecture-driven myelin model reveals area-specific signatures in human primary and secondary areas using ultra-high resolution in-vivo brain MRI. *Neuroimage*. 2015;114:71-87. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.04.023
- [16] Fischl B, van der Kouwe A, Destrieux C, et al. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2004;14(1):11-22. doi:10.1093/cercor/bhg087
- [17] Buxhoeveden DP, Casanova MF. The minicolumn and evolution of the brain. *BrainBehavEvol*. 2002;60(3):125-151. doi:10.1159/000065935
- [18] Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex [published correction appears in *Cell*. 2011 Jul 22;146(2):332]. *Cell*. 2011;146(1):18-36. doi:10.1016/j.cell.2011.06.030
- [19] Axer H, Axer M, Krings T, Keyserlingk DG. Quantitative estimation of 3-D fiber course in gross histological sections of the human brain using polarized light. *J NeurosciMethods*. 2001;105(2):121-131. doi:10.1016/s0165-0270(00)00349-6
- [20] Axer M, Amunts K, Grässel D, et al. A novel approach to the human connectome: ultra-high resolution mapping of fiber tracts in the brain. *Neuroimage*. 2011;54(2):1091-1101. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.08.075
- [21] Axer M, Grässel D, Kleiner M, et al. High-resolution fiber tract reconstruction in the human brain by means of three-dimensional polarized light imaging. *Front Neuroinform*. 2011;5:34. Published 2011 Dec 30. doi:10.3389/fninf.2011.00034
- [22] Glasser MF, Van Essen DC. Mapping human cortical areas in vivo based on myelin content as revealed by T1- and T2-weighted MRI. *J Neurosci*. 2011;31(32):11597-11616. doi:10.1523/JNEUROSCI.2180-11.2011
- [23] Glasser MF, Goyal MS, Preuss TM, Raichle ME, Van Essen DC. Trends and properties of human cerebral cortex: correlations with cortical myelin content. *Neuroimage*. 2014;93 Pt 2:165-175. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.03.060
- [24] Amunts K, Zilles K. Architectonic Mapping of the Human Brain beyond Brodmann. *Neuron*. 2015;88(6):1086-1107. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.001
- [25] Devlin JT, Poldrack RA. In praise of tedious anatomy. *Neuroimage*. 2007;37(4):1033-1058. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.09.055
- [26] Leergaard TB, Hilgetag CC, Sporns O. Mapping the connectome: multi-level analysis of brain connectivity. *Front Neuroinform*. 2012;6:14. Published 2012 May 1. doi:10.3389/fninf.2012.00014
- [27] Eickhoff S, Walters NB, Schleicher A, et al. High-resolution MRI reflects myeloarchitecture and cytoarchitecture of human cerebral cortex. *Hum Brain Mapp*. 2005;24(3):206-215. doi:10.1002/hbm.20082
- [28] Douglas RJ, Martin KA. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:419-451. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152
- [29] DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Picciono R, et al. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *NatRevNeurosci*. 2013;14(3):202-216. doi:10.1038/nfrn3444
- [30] Galuske RA, Schlote W, Bratzke H, Singer W. Interhemispheric asymmetries of the modular structure in human temporal cortex. *Science*. 2000;289(5486):1946-1949. doi:10.1126/science.289.5486.1946
- [31] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*. 2011;14(11):1481-1488. Published 2011 Aug 30. doi:10.1038/nn.2928
- [32] Hilbig H, Bidmon HJ, Blohm U, Zilles K. Wisteria floribunda agglutinin labeling patterns in the human cortex: a tool for revealing areal borders and subdivisions in parallel with immunocytochemistry. *AnatEmbryol (Berl)*. 2001;203(1):45-52. doi:10.1007/s004290000135
- [33] Ichinohe N, Matsushita A, Ohta K, Rockland KS. Pathway-specific utilization of synaptic zinc in the macaque ventral visual cortical areas. *Cereb Cortex*. 2010;20(12):2818-2831. doi:10.1093/cercor/bhq028
- [34] Keller PJ, Dodt HU. Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Curr Opin Neurobiol*. 2012;22(1):138-143. doi:10.1016/j.conb.2011.08.003
- [35] Lichtman JW, Denk W. The big and the small: challenges of imaging the brain's circuits. *Science*. 2011;334(6056):618-623. doi:10.1126/science.1209168
- [36] Reckfort J, Wiese H, Pietrzyk U, Zilles K, Amunts K, Axer M. A multiscale approach for the reconstruction of the fiber architecture of the human brain based on 3D-PLI. *Front Neuroanat*. 2015;9:118. Published 2015 Sep 3. doi:10.3389/fnana.2015.00118
- [37] Tomer R, Ye L, Hsueh B, Deisseroth K. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *NatProtoc*. 2014;9(7):1682-1697. doi:10.1038/nprot.2014.123
- [38] Haxby JV. Multivariate pattern analysis of fMRI: the early beginnings. *Neuroimage*. 2012;62(2):852-855. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.03.016
- [39] Mrsic-Flogel T, Hübener M, Bonhoeffer T. Brain

- mapping: new wave optical imaging. *Curr Biol*. 2003;13(19):R778-R780. doi:10.1016/j.cub.2003.09.022
- [40] Logothetis NK, Pfeuffer J. On the nature of the BOLD fMRI contrast mechanism. *Magn Reson Imaging*. 2004;22(10):1517-1531. doi:10.1016/j.mri.2004.10.018
- [41] Glasser MF, Smith SM, Marcus DS, et al. The Human Connectome Project's neuroimaging approach. *Nat Neurosci*. 2016;19(9):1175-1187. doi:10.1038/nn.4361
- [42] Koretsky AP. Is there a path beyond BOLD? Molecular imaging of brain function. *Neuroimage*. 2012;62(2):1208-1215. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.02.076
- [43] Angelovski G, Fouskova P, Mamedov I, Canals S, Toth E, Logothetis NK. Smart magnetic resonance imaging agents that sense extracellular calcium fluctuations. *Chembiochem*. 2008;9(11):1729-1734. doi:10.1002/cbic.200800165
- [44] Atanasijevic T, Shusteff M, Fam P, Jasanoff A. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(40):14707-14712. doi:10.1073/pnas.0606749103
- [45] Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*. 2004;22(3):1046-1059. doi:10.1016/j.neuroimage.2004.03.031
- [46] Boretius S, Frahm J. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol*. 2011;771:531-568. doi:10.1007/978-1-61779-219-9_28
- [47] Massaad CA, Pautler RG. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Methods Mol Biol*. 2011;711:145-174. doi:10.1007/978-1-61737-992-5_7
- [48] Inoue T, Majid T, Pautler RG. Manganese enhanced MRI (MEMRI): neurophysiological applications. *Rev Neurosci*. 2011;22(6):675-694. doi:10.1515/RNS.2011.048
- [49] Kuo YT, Herlihy AH, So PW, Bell JD. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) without compromise of the blood-brain barrier detects hypothalamic neuronal activity in vivo. *NMR Biomed*. 2006;19(8):1028-1034. doi:10.1002/nbm.1070
- [50] Hasegawa S, Saito S, Takanashi J, et al. Evaluation of ferritin-overexpressing brain in newly developed transgenic mice. *Magn Reson Imaging*. 2011;29(2):179-184. doi:10.1016/j.mri.2010.08.013
- [51] Lachaux JP, Rudrauf D, Kahane P. Intracranial EEG and human brain mapping. *J Physiol Paris*. 2003;97(4-6):613-628. doi:10.1016/j.jphysparis.2004.01.018
- [52] Lee C, Oostenveld R, Lee SH, Kim LH, Sung H, Choi JH. Dipole source localization of mouse electroencephalogram using the Fieldtrip toolbox. *PLoS One*. 2013;8(11):e79442. Published 2013 Nov 14. doi:10.1371/journal.pone.0079442
- [53] Farzan F, Vernet M, Shafi MM, Rotenberg A, Daskalakis ZJ, Pascual-Leone A. Characterizing and Modulating Brain Circuitry through Transcranial Magnetic Stimulation Combined with Electroencephalography. *Front Neural Circuits*. 2016;10:73. Published 2016 Sep 22. doi:10.3389/fncir.2016.00073
- [54] Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*. 2007;55(2):187-199. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.026
- [55] Terao Y, Ugawa Y. Basic mechanisms of TMS. *J Clin Neurophysiol*. 2002;19(4):322-343. doi:10.1097/00004691-200208000-00006
- [56] Civardi C, Cantello R, Asselman P, Rothwell JC. Transcranial magnetic stimulation can be used to test connections to primary motor areas from frontal and medial cortex in humans. *Neuroimage*. 2001;14(6):1444-1453. doi:10.1006/nimg.2001.0918
- [57] Leocani L, Cohen LG, Wassermann EM, Ikoma K, Hallett M. Human corticospinal excitability evaluated with transcranial magnetic stimulation during different reaction time paradigms. *Brain*. 2000;123 (Pt 6):1161-1173. doi:10.1093/brain/123.6.1161
- [58] Fitzgerald PB, Fountain S, Daskalakis ZJ. A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition. *Clin Neurophysiol*. 2006;117(12):2584-2596. doi:10.1016/j.clinph.2006.06.712
- [59] Chou YH, Ton That V, Sundman M. A systematic review and meta-analysis of rTMS effects on cognitive enhancement in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2020;86:1-10. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.08.020
- [60] Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, et al. Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. *Nature*. 1996;380(6574):526-528. doi:10.1038/380526a0
- [61] Kähkönen S, Wilenius J, Komssi S, Ilmoniemi RJ. Distinct differences in cortical reactivity of motor and prefrontal cortices to magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2004;115(3):583-588. doi:10.1016/j.clinph.2003.10.032
- [62] Kahn I, Pascual-Leone A, Theoret H, Fregni F, Clark D, Wagner AD. Transient disruption of ventrolateral prefrontal cortex during verbal

- encoding affects subsequent memory performance. *J Neurophysiol.* 2005;94(1):688-698. doi:10.1152/jn.01335.2004
- [63] McDonnell MN, Orekhov Y, Ziemann U. Suppression of LTP-like plasticity in human motor cortex by the GABAB receptor agonist baclofen. *Exp Brain Res.* 2007;180(1):181-186. doi:10.1007/s00221-006-0849-0
- [64] Werhahn KJ, Kunesch E, Noachtar S, Benecke R, Classen J. Differential effects on motorcortical inhibition induced by blockade of GABA uptake in humans. *J Physiol.* 1999;517 (Pt 2)(Pt 2):591-597. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0591t.x
- [65] Esser SK, Huber R, Massimini M, Peterson MJ, Ferrarelli F, Tononi G. A direct demonstration of cortical LTP in humans: a combined TMS/EEG study. *Brain Res Bull.* 2006;69(1):86-94. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.11.003
- [66] Di Lazzaro V, Pilato F, Saturno E, et al. Theta-burst repetitive transcranial magnetic stimulation suppresses specific excitatory circuits in the human motor cortex. *J Physiol.* 2005;565(Pt 3):945-950. doi:10.1113/jphysiol.2005.087288
- [67] Huang YZ, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC. Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron.* 2005;45(2):201-206. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.033
- [68] Daskalakis ZJ, Farzan F, Radhu N, Fitzgerald PB. Combined transcranial magnetic stimulation and electroencephalography: its past, present and future. *Brain Res.* 2012;1463:93-107. doi:10.1016/j.brainres.2012.04.045
- [69] Ilmoniemi RJ, Kicić D. Methodology for combined TMS and EEG. *Brain Topogr.* 2010;22(4):233-248. doi:10.1007/s10548-009-0123-4
- [70] Miniussi C, Thut G. Combining TMS and EEG offers new prospects in cognitive neuroscience. *Brain Topogr.* 2010;22(4):249-256. doi:10.1007/s10548-009-0083-8
- [71] Ilmoniemi RJ, Virtanen J, Ruohonen J, et al. Neuronal responses to magnetic stimulation reveal cortical reactivity and connectivity. *Neuroreport.* 1997;8(16):3537-3540. doi:10.1097/00001756-199711100-00024
- [72] Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:389-412. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113817
- [73] Sparta DR, Jennings JH, Ung RL, Stuber GD. Optogenetic strategies to investigate neural circuitry engaged by stress. *Behav Brain Res.* 2013;255:19-25. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.007
- [74] Petersen CC, Crochet S. Synaptic computation and sensory processing in neocortical layer 2/3. *Neuron.* 2013;78(1):28-48. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.020
- [75] Avermann M, Tamm C, Mateo C, Gerstner W, Petersen CC. Microcircuits of excitatory and inhibitory neurons in layer 2/3 of mouse barrel cortex. *J Neurophysiol.* 2012;107(11):3116-3134. doi:10.1152/jn.00917.2011
- [76] Brill J, Mattis J, Deisseroth K, Huguenard JR. LSPS/Optogenetics to Improve Synaptic Connectivity Mapping: Unmasking the Role of Basket Cell-Mediated Feedforward Inhibition. *eNeuro.* 2016;3(4):ENEURO.0142-15.2016. Published 2016 Aug 8. doi:10.1523/ENEURO.0142-15.2016
- [77] Asanuma H, Arnold A, Zarzecki P. Further study on the excitation of pyramidal tract cells by intracortical microstimulation. *Exp Brain Res.* 1976;26(5):443-461. doi:10.1007/BF00238820
- [78] Mitz AR, Wise SP. The somatotopic organization of the supplementary motor area: intracortical microstimulation mapping. *J Neurosci.* 1987;7(4):1010-1021. doi:10.1523/JNEUROSCI.07-04-01010.1987
- [79] Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, et al. The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res.* 1986;396(1):77-96. doi:10.1016/s0006-8993(86)80191-3
- [80] Chemla S, Chavane F. Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. *J Physiol Paris.* 2010;104(1-2):40-50. doi:10.1016/j.jphysparis.2009.11.009
- [81] Perron A, Mutoh H, Launey T, Knöpfel T. Red-shifted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Chem Biol.* 2009;16(12):1268-1277. doi:10.1016/j.chembiol.2009.11.014
- [82] Chen Q, Cichon J, Wang W, et al. Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. *Neuron.* 2012;76(2):297-308. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.011
- [83] Akemann W, Mutoh H, Perron A, Rossier J, Knöpfel T. Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2010;7(8):643-649. doi:10.1038/nmeth.1479
- [84] Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, et al. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci.* 2012;32(40):13819-13840. doi:10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012
- [85] Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. *Neuron.* 2012;73(5):862-885. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.011
- [86] Abe Y, Sekino M, Terazono Y, et al. Opto-fMRI analysis for exploring the neuronal connectivity of the hippocampal formation in rats. *Neurosci Res.* 2012;74(3-4):248-255. doi:10.1016/j.neures.2012.08.007
- [87] Okano H, Mitra P. Brain-mapping projects using the common marmoset. *Neurosci Res.*

- 2015;93:3-7. doi:10.1016/j.neures.2014.08.014
- [88] Cyranoski D. Marmosets are stars of Japan's ambitious brain project. *Nature*. 2014;514(7521):151-152. doi:10.1038/514151a
- [89] Okano H, Hikishima K, Iriki A, Sasaki E. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *SeminFetalNeonatalMed*. 2012;17(6):336-340. doi:10.1016/j.siny.2012.07.002
- [90] Assaf Y, Pasternak O. Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: a review. *J MolNeurosci*. 2008;34(1):51-61. doi:10.1007/s12031-007-0029-0
- [91] Yamada M, Momoshima S, Masutani Y, et al. Diffusion-tensor neuronal fiber tractography and manganese-enhanced MR imaging of primate visual pathway in the common marmoset: preliminary results. *Radiology*. 2008;249(3):855-864. doi:10.1148/radiol.2493072141
- [92] Elam JS, Glasser MF, Harms MP, et al. The Human Connectome Project: A retrospective. *Neuroimage*. 2021;244:118543. doi:10.1016/j.neuroimage.2021.118543
- [93] Smith S. Introduction to the NeuroImage special issue "Mapping the Connectome". *Neuroimage*. 2013;80:1. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.07.012
- [94] Setsompop K, Kimmlingen R, Eberlein E, et al. Pushing the limits of in vivo diffusion MRI for the Human Connectome Project. *Neuroimage*. 2013;80:220-233. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.05.078
- [95] Jones EG. Microcolumns in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5019-5021. doi:10.1073/pnas.97.10.5019
- [96] Defelipe J, Markram H, Rockland KS. The neocortical column. *Front Neuroanat*. 2012;6:22. Published 2012 Jun 26. doi:10.3389/fnana.2012.00005