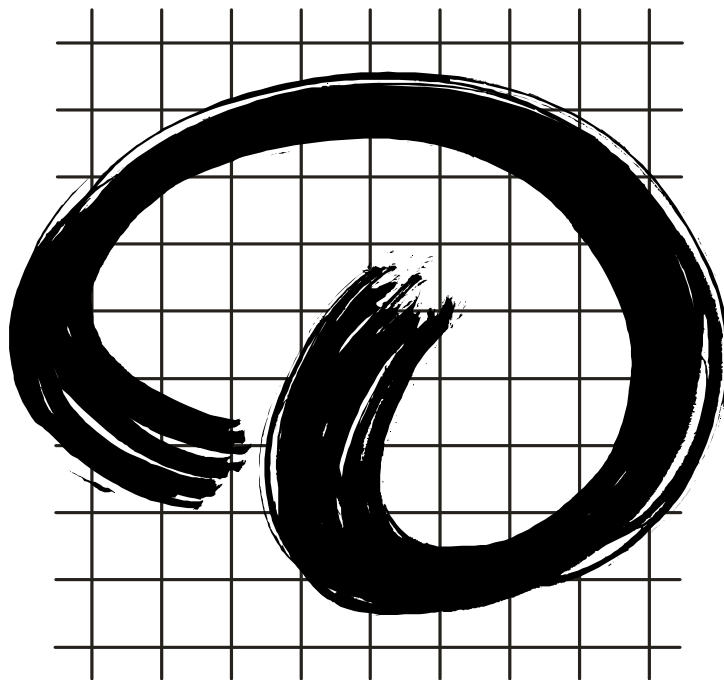


**Hippokampális éleshullám-ripple
(Sharp wave-ripple) aktivitás háttérében
álló hálózati és sejtszintű mechanizmusok
vizsgálata *in vitro*.**



XXXI. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Schlingloff Dániel

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológus Msc II.

**MTA - Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Agykéreg
Kutatócsoport**

Témavezető: Dr. Gulyás Attila I.

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
2. ÁBRAJEGYZÉK	3
3. BEVEZETÉS	4
1. Az agykérgi oszcillációk szerepe	4
2. A hippocampusra jellemző elektromos aktivitásmintázatok és szerepük.....	4
3. A hippocampus és az éles-hullámok.....	5
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	6
5. ANYAG és MÓDSZER.....	6
6. EREDMÉNYEK és MEGVITATÁSUK	9
1.A Szinaptikus aktivitás dinamikája, a hálózati oszcilláció különböző fázisaiban.	9
2. Az éles-hullám keletkezés matematikai modellje és kísérletes igazolása.....	10
3. A piramis rétegben mérhető éles-hullám mezőpotenciál komponenseinek elkülönítése	12
3./1 A fáziskapcsolt akciós potenciálok hozzájárulnak az SWR mezőpotenciál kialakításához. ...	12
3./2 A gátló szinaptikus áramok hozzájárulnak a SWR lokális mezőpotenciál kialakításához.	14
4. A piramis rétegben mérhető LFP gátló komponensének generálásáért felelős sejtpopuláció azonosítása.....	15
4./1 A CCK+ szabályosan tüzelő kosársejtek nem járulnak hozzá a SWR mezőpotenciál kialakításához a piramis rétegben.....	16
4./2 A PV+ sejtek felelősek az éles-hullám LFP generálásáért és a MU szinkronizálásért.	17
5. A gyorsan tüzelő kosársejt axonok szelektív léziója deszinkronizálja az éles-hullámokat és a ripple oszcillációt a piramis rétegben.....	18
6. A gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelési és szinaptikus tulajdonságai.....	20
7. Riluzole (10 μ M) globális alkalmazása lerövidíti a SWR-öket, és csökkenti a ripple ciklusok számát.	21
8. A PV+ gyorsan tüzelő kosársejtek GABA kibocsátásának specifikus módosítása "DAMGO" segítségével.	23
7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS JÖVŐBELI TERVEK.....	24
8. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁSOK.....	27
9. IRODALOMJEGYZÉK	27
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	28

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

1. SWR – Sharp Wave-Ripple
2. CA – cornu ammonis
3. GABA – gamma-amino vajsav
4. GD – Gyrus dentatus
5. CCK – kolecisztokinin
6. PV – parvalbumin
7. LFP – lokális mezőpotenciál (local field potential)
8. ACSF – mesterséges agy-gerincvelői folyadék
9. EPSC – serkentő posztszinaptikus áram
10. IPSC – gátló posztszinaptikus áram
11. str. rad. – stratum radiatum
12. str. pyr. – stratum pyramidale
13. IEI – események közti időtartam (interevent interval)
14. RPN – ripple negatív ciklus (ripple negative cycle)
15. MU – multiunit
16. TTX – tetrodotoxin

2. ÁBRAJEGYZÉK

1. **Ábra;** Szinaptikus események dinamikája a SWR hálózati aktivitás különböző fázisaiban. 9
2. **Ábra;** Az éles-hullám keletkezés megmagyarázható egy kevert sztohasztikus-refraktor modellel. 11
3. **Ábra;** A multiunit komponens hozzájárulásának meghatározása a SWR mezőpotenciálhoz. 13
4. **Ábra;** A lokális gátlóáramok hozzájárulásának elkülönítése a SWR mezőpotenciáltól. 14
5. **Ábra;** A CCK+ szabályosan tüzelő kosársejtek nem járulnak hozzá a SWR LFP-hez. 16
6. **Ábra;** A PV+ gátlósejtek adják a fő éles-hullám LFP komponenst, és szinkronizálják a MU tüzelést a piramis rétegben. 17
7. **Ábra;** A gyorsan tüzelő kosársejt axonok szelektív léziója deszinkronizálja az éles-hullámokat és a ripple oszcillációt a piramis rétegben. 19
8. **Ábra.** A gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelési és szinaptikus tulajdonságai. 20
9. **Ábra;** Riluzole hatására csökken a SWR szélessége és a ripple ciklusok száma. 22
10. **Ábra;** A FSBC-ek GABA kibocsátásának specifikus módosítása. 23

3. BEVEZETÉS

1. Az agykérgi oszcillációk szerepe

Emlősök elektroencefalogramjában különböző oszcillációk jelentkeznek, melyek az agykéreg eltérő magatartásformákhoz asszociált aktivitásmintázatait jelzik és feltehetően az agykéreg különböző információ-feldolgozó állapotait kísérik. Ma úgy gondoljuk, a kérgi oszcillációk teremtenek kapcsolatot a viselkedés és egyetlen idegsejt aktivitása között¹. Az emlősök agykérge képes az életük során összegyűjtött információkat rögzíteni, tárolni, megerősíteni és szükség esetén előhívni. Ezen memóriafolyamatokban nagy szerepe van a temporális lebenyben található hippocampusz nevű archikortikális struktúrának.

2. A hippocampuszra jellemző elektromos aktivitásmintázatok és szerepük

A hippocampusz fiziológias elektromos aktivitásmintázatai közé tartozik a théta-modulált gamma aktivitás, mely felderítő magatartás alatt jelentkezik. Lassú hullámú alvás és éber nyugalmi állapot alatt regisztrálhatóak az ún. éles-hullámok (Sharp Waves), melyekre egy magas frekvenciás ún. Ripple (200 Hz; együtt Sharp Wave-Ripple, SWR) oszcilláció szuperponálódik^{2,3}. Ma már széleskörűen elfogadott Buzsáki György azon elmélete, miszerint e két EEG mintázat a memória rögzülés két különböző fáziséért felelős. Théta aktivitás alatt történik meg a külvilág információinak begyűjtése, leendő emlényomok kialakulása, míg éles-hullám fázis alatt zajlik a begyűjtött információ szűrése, a memórianyomok konszolidációja és rögzülése. A temporális lebeny memóriafolyamatokban betöltött szerepére már korán fény derült az epilepsziás betegek gyógyítására alkalmazott temporális lobektómia következtében. Később állatkísérletekkel is sikerült bizonyítani, hogy a hippocampusznak esszenciális szerepe van a deklaratív memória kialakulásában és a térbeli tájékozódásban. Újabb kutatások közvetlenül bizonyították éber állatban a táplálkozás alatt jelentkező éles-hullámok memóriában betöltött szerepét is: az éber éles-hullámok megzavarásának következtében csökken az állat teljesítőképessége a memóriafeladatokban⁴.

Az információ kódolása a hálózatot alkotó sejtek térben és időben szabályozott tüzelési mintázatán alapszik. Nádasdy és mtsi. kimutatták, hogy éles-hullám aktivitás alatt időben tömörítve reaktiválódnak azok a piramissejt tüzelési mintázatok, melyek azt megelőzően gamma aktivitás alatt jelentkeztek⁵, és feltehetőleg a begyűjtött információt biológiai reprezentációja reprezentálják.

3. A hippocampus és az éles-hullámok.

A hippocampus a temporális lebenyben található, két fő, összefonódó része az ammonsarv (cornu ammonis, CA) és a gyrus dentatus (GD; magyarul fogazott tekervény, azonban ez az elnevezés kevésbé használatos). Az ammonsarv további régiókra bontható: CA3, CA2, CA1. Minden régióban megtalálható az ammonsarvra jellemző rétegzettség, mely rétegekben különböző idegsejt típusok találhatóak. A piramis rétegbe (stratum pyramidale; str. pyr.) rendeződve helyezkedik el az ammonsarv egyetlen principális sejttípusa, a piramissejt (PS), mely az idegsejtek 80%-át teszi ki, neurotranszmittere a glutaminsav. Továbbá legalább 21 különböző gamma-amino-vajsavat (GABA) felszabadító neuron típus helyezkedik el az ammonsarv különböző rétegeiben⁶. Az agykéregben jelenlévő interneuronokra jellemző diverzitás funkcionális jelentőségének mibenléte, a mai idegtudományi kutatások egyik legizgalmasabb kérdése.

Kutatásom szempontjából kiemelkedő jelentőségűek a periszomatikus régiót innerváló interneuronok. Ide tartoznak a kolecisztokinin tartalmú (CCK+) szabályosan-tüzelő kosársejtek, parvalbumin tartalmú (PV+) gyorsan-tüzelő kosársejtek (fast-spiking basket cell; FSBC) valamint a szintén PV+ axo-axonikus, régebbi nevén kandeláber sejtek^{6,7,8}.

Habár a CA régiók makroszkópikus anatómiai felépítése igen hasonló, számos, az oszcillációgenesis szempontjából fontos tulajdonságokban különböznek. A CA3 régió önmagában képes SWR és gamma aktivitást generálni⁹⁻¹¹, annak köszönhetően, hogy itt a legerősebb a piramissejtek közti rekurrens kollaterális rendszer. A CA1 terület csak "átveszi" a CA3ban kialakuló aktivitásmintázatokat.

Háros N. és mtsai. kifejlesztettek egy ún. dupla prefúziós sumberged-típusú szelettartó kamrát, melyben a jobb oxigén-ellátottság következtében a vastag hippocampális agyszeletek spontán SWR aktivitást mutatnak¹². Ezt a technikát alkalmazva, kitűnően vizsgálható az azonosított sejtek aktivitása párhuzamosan a SWR oszcillációval, *in vitro*.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A hippocampális SWR aktivitás funkcionális jelentősége mára vitathatatlan, azonban a mögötte álló hálózati és sejtszintű mechanizmusok kevésbé ismertek. TDK munkám célja az, hogy jobban megértsük ezeket.

Négy fő célunk a következők voltak:

1. Meghatározzuk milyen komponensek vesznek részt a mezőpotenciál kialakításában a piramis rétegben, hogyan formálódik a SWR.
2. A kísérleti módon meghatározott sejt és hálózati szintű aktivitás dinamikájára alapozva felállítsunk egy modellt az éles-hullámok keletkezésére, mely képes predikciókat adni különböző beavatkozások hatására.
3. Megértsük hogyan generálódik az éles-hullámon található magas frekvenciás ripple oszcilláció.
4. Fényt derítsünk a SWR termináció mechanizmusára.

5. ANYAG és MÓDSZER

A kísérletekhez 17-25 napos "CD1", "C57Bl/6J" és transzgénikus egereket használtunk fel. A kísérletekben felhasznált állatok tartása és felhasználása megfelelt az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. (XII. 31.) kormányrendeletnek. A kísérleti procedúrákat az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága is engedélyezte.

Két transzgénikus egértörzset használtunk, hogy célzottan vezethessünk el a periszomatikus régiót innerváló interneuronokból. A gyorsan tüzelő kosársejtek és axo-axonikus sejtek vizsgálatához egy olyan egértörzset használtunk melyben az (erősített) zöld fluorescens protein (eGFP) expresszió a parvalbumin promóter szabályozása alatt áll¹³. A harmadik periszomatikus régiót innerváló CCK-t expresszáló szabályosan tüzelő kosársejtek vizsgálatát egy olyan egértörzs segítségével végeztük melyben a dsRED expresszió a CCK promóter szabályozása alatt áll (Dr. Szabó Gábor, eddig nem publikált). Ezen sejteket kísérletek során epifluorescens módon azonosítottuk.

Az állatokat izofluránnal elaltattuk, majd dekapitáltuk. Dekapitalás után az agy jéghideg vágó oldatba került (tartalma mM-ban: szukróz, 252; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; CaCl₂, 1; MgCl₂, 5; NaH₂PO₄, 1.25; glükóz, 10; karbogén gázzal (5% CO₂, 95% O₂) buborékoltatva). Az állatok hippokampuszából vibratómmal 400-500 µm, illetve párelvezetések esetében 200 µm vastag horizontális szeleteket készítettünk. A szeleteket 36° C karbogén gázzal buborékoltatott mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (Artificial CerebroSpinal Fluid; ACSF) tartalmazó interface-típusú kamrába helyeztük, amely másfél órás inkubáció során fokozatosan szobahőmérsékletre hűlt. A standard ACSF tartalma mM-ban: NaCl, 126; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 2; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 26; és 10 mM glükóz nagy tisztaságú desztillált vízben feloldva, karbogén gázzal buborékoltatva.

A kísérleteket 32 Celsius fokon, submerged-típusú kamrában, ACSF perfúzió (4ml/perc) mellett végeztük. Az oszcillációmérések esetében egy speciális dupla-perfúziós kamrát használtunk, mely hatékonyabb oxigén ellátottságot biztosít a sejtek számára, ezáltal a hippokampuszban spontán SWR aktivitás jelentkezik.

A mezőpotenciál méréseket ACSF-el töltött patch pipettával (4-6 MΩ) végeztük. A lokális mezőpotenciált (Local Field Potential; LFP) a hippokampusz CA3 régiójának piramis rétegéből (str. pyramidale) vezettük el.

Az egyedi sejtek tüzelési mintázatának vizsgálatát ACSF-el töltött patch pipetta segítségével loose-patch konfigurációban végeztük, melyeket az intracelluláris oldathoz adott biocytinnel (3mg/ml) feltöltöttünk, majd fixáltunk (4% paraformaldehiddel) későbbi anatómiai azonosításra.

A sejtekre érkező szinaptikus áramok vizsgálatát whole-cell voltage-clamp konfigurációban végeztük, K-glükonát alapú intracelluláris pipetta-oldat használatával (mM-ban: K-glükonát, 138; CsCl, 3; foszfokeratin, 10; ATP, 4; GTP, 0.4; HEPES, 10; QX-314, 0.2; biocytin, 3 mg/ml, pH: 7.3–7.35; 300 mOsm/L).

A serkentő posztszinaptikus áramok (Excitatory Postsynaptic Current; EPSC) regisztrálása során a vizsgált sejt membránpotenciálját a gátló áramok (Inhibitory Postsynaptic Current; IPSC) becsült reverz-potenciálján (~ -70 mV) rögzítettük. Az IPSC-k regisztrálása során a sejt membránpotenciálját az EPSC-k becsült reverz-potenciálja körül (~ 0 mV) tartottuk. Utóbbi esetben a sejtek tüzelését a pipetta oldatban jelenlévő QX-314-el gátoltuk.

Párelvezetések során a preszinaptikus sejtben alkalmazott oldat összetétele mM-ban: Kálium glukonát, 110; NaCl, 4; Mg-ATP, 2; HEPES, 40; GTP, 0.3; biocytin, 3mg/ml; pH 7.3, 298 mOsm/L. A posztszinaptikus sejtben alkalmazott pipettaoldat összetétele mM-ban:

CsCl 80, Cs-gluconate 60, MgCl₂ 1, Mg-ATP 2, NaCl 3, HEPES 10, QX-314 5, pH 7.3 , 295 mOsm/L

A lokális droghatások vizsgálatára alkalmas drog injektálás módszerét laboratóriumunkban én alkalmaztam először, kidolgozva a technikai részleteket. Az anyagokat ACSF-ben oldottam, majd patch pipettára adott nyomás segítségével juttattam a szövetbe. Hogy elkerüljem a buborékolatás hiányában a pipettába töltött ACSF pH-jának savas irányba tolódását, külön erre a célra készítettem egy módosított ACSF-et (tartalma mM-ban: NaCl, 126; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 2; CaCl₂, 2; HEPES, 26; és 10 mM glükóz, nagy tisztaságú desztillált vízben feloldva, pH=7.4; 301 mOsm/L).

Miután elkészítettem a módosított ACSF-et, több kontrollmérést is végeztem, hogy megbizonyosodjam arról, hogy drog nélkül nincs hatása az injekciónak sem az LFP-ra, sem az egyedi sejtek tüzelésére, sem a sejtekre érkező áramokra.

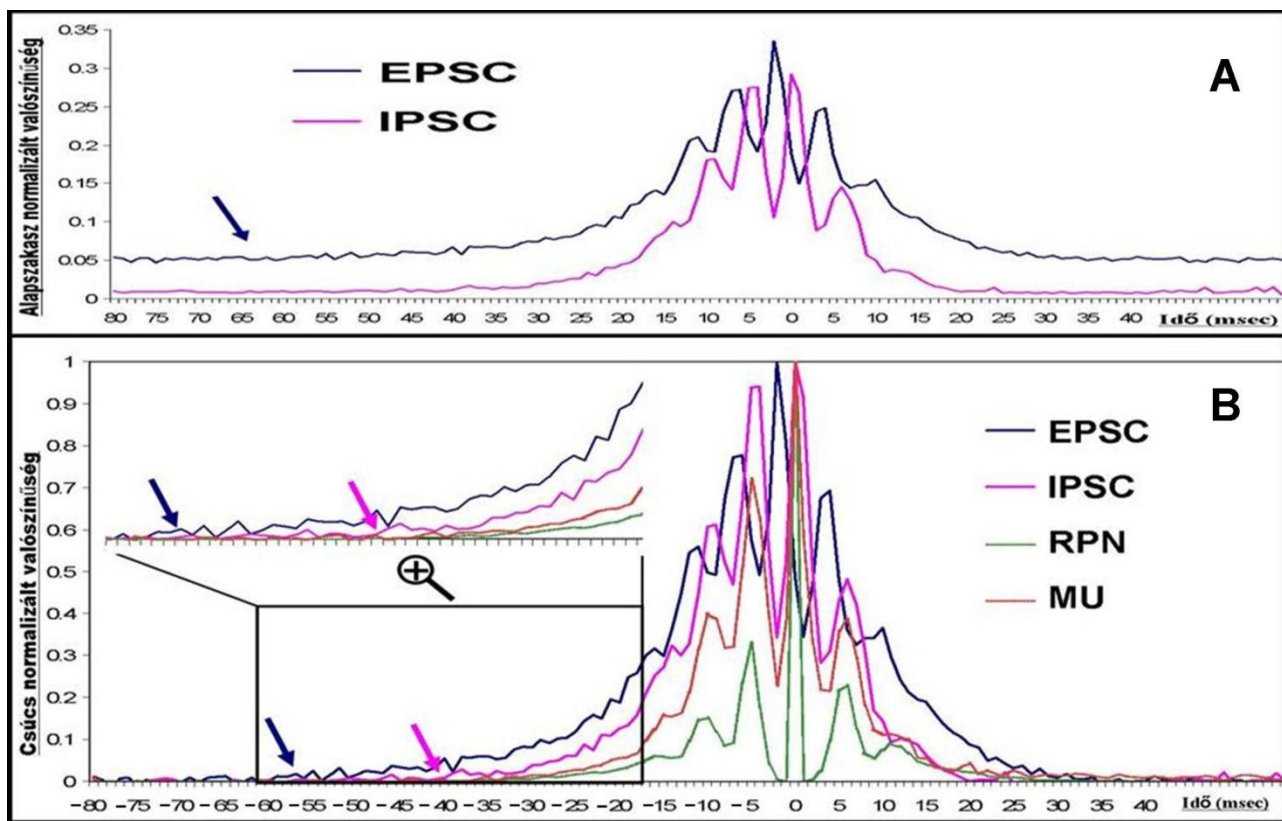
Minden általam végzett kísérlet analízisét magam végeztem, Gulyás Attila által írt (Delphi 6.0) programok scriptelésével. A regisztrátumokat megszűrtem az egyes paraméterek meghatározásának megfelelően, majd a kidetektált eseményeket időben bineltem, illetve korrelációkat számoltam rajtuk.

A lokális injekciók esetében tízszeresét használtam a perfúziós oldatban általánosan használt koncentrációknak, az anyagok gyors diffúziója és a kimosódás miatt. A kísérletek során felhasznált anyagok (származása) és koncentrációja: TTX (Almone Labs, Izrael): str. pyr:1 nM, str. rad: 10 µM; Gabazine (Tocris) : 1 µM; Riluzole (Sigma-Aldrich): 10 µM; DAMGO (Sigma-Aldrich): 1 µM; ω-Agatoxin (Almone Labs): 500 nM, ω-Conotoxin (Almone Labs): 500 nM.

6. EREDMÉNYEK és MEGVITATÁSUK

1.A Szinaptikus aktivitás dinamikája, a hálózati oszcilláció különböző fázisaiban.

Hogy megértsük, az éles-hullámok hogyan keletkeznek, párhuzamosan mértük a mezőpotenciált a str. pyramidaleből, hogy monitorozzuk a hálózati aktivitást, valamint mértük a serkentő és gátló posztzinaptikus áramokat (EPSC; IPSC) piramissejtekből és interneuronokból (n=80; 100-200 SWR/sejt, ezen elvezetéseket Németh B., Karlócai R. és Hájos N. végezte), hogy vizsgáljuk a serkentő és gátló rendszer aktivitását az éles-hullám különböző fázisaiban. A kiderített éles-hullám csúcsokra peristimulus hisztogramot számítottunk a kiderített szinaptikus eseményekből valamint átlagoltuk a SWR mezőpotenciált.



1 Ábra; Szinaptikus események dinamikája a SWR hálózati aktivitás különböző fázisaiban.

A; SWR csúchoz legközelebbi ripple negatív csúccsal triggerelt IPSC/EPSC (abszolút) valószínűségek eloszlási hisztogramja. A "0" pont az éles-hullám csúcsot jelzi. Előtte és utána látható a különböző események valószínűsége a SWR eltérő fázisaiban. Jól látszik,

hogy két SWR esemény között az EPSC-k frekvenciája magasabb, mint az IPSC-ké (nyíl). **B**; Az „A”-val megegyezően triggerelt és maximális valószínűségre normalizált EPSC, IPSC, ripple negatív csúcsok (RPN) és multiunit (MU) eloszlási hisztogramok. Az EPSC frekvencia 60 msec-mal az éles-hullám csúcs előtt kezd emelkedni (kék nyíl), majd exponenciálisan növekszik. Az IPSC frekvencia emelkedése gyorsabb felfutású, azonban 20 msec-mal később indul (rózsaszín nyíl). A ripple oszcilláció csak akkor indul, amikor mind a serkentő mind a gátló áramok frekvenciája elég magas. A piramis rétegben detektálható MU aktivitás a ripple negatív ciklusok csúcsaihoz fáziskapcsolt.

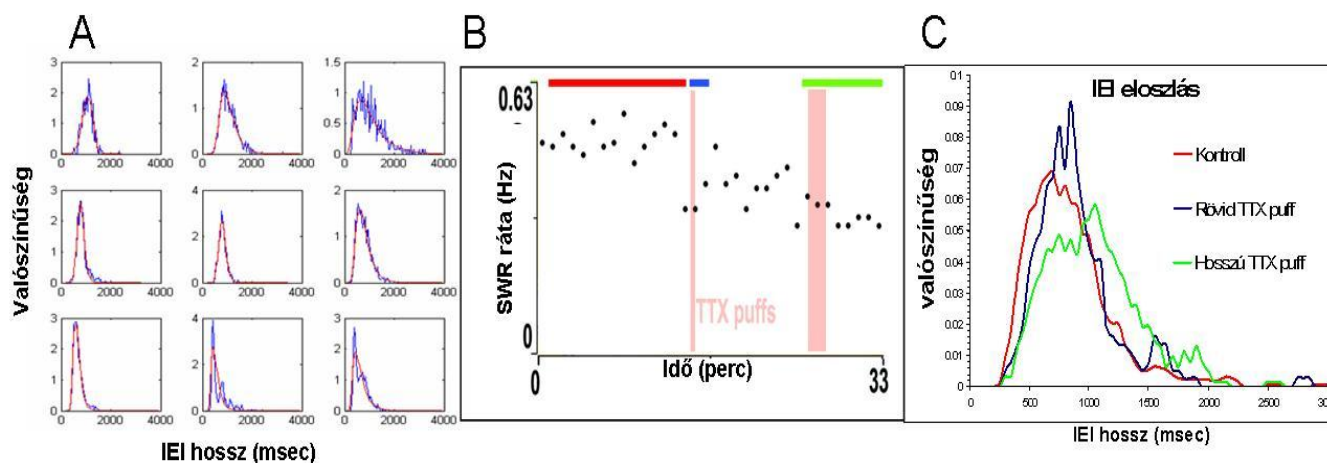
Azt találtuk, hogy az EPSC-k frekvenciája 60 msec-mal az éles-hullám csúcs előtt kezd emelkedni egy állandó, alacsony szintről (1. ábra), majd exponenciálisan felfut. Ezt 20 msec késéssel követi az IPSC-k frekvencia emelkedése, mely szinte nulláról indul és gyorsabban nő, mint az EPSC frekvencia. Amikor az IPSC-k és EPSC-k frekvenciája kellően magas, megjelenik a ripple oszcilláció, mely modulálja a serkentő és gátló áramok fázisát.

Az alapszakaszon jelentkező EPSC frekvencia, és annak exponenciális emelkedése azt sugallja, hogy a serkentés felépülése spontán aktiválódó kritikus méretű piramissejt populációból indul, amely a kritikus szint felett, a rekurrens kollaterális rendszerben beindítja az aktivitás felépülését és egy SWR keletkezik.

2. Az éles-hullám keletkezés matematikai modellje és kísérletes igazolása

A több mint 84 szeletben megmért éles-hullámok csúcsai közt eltelt idő (interevent interval; IEI) eloszlási hisztogramja a sztohasztikus mechanizmusokra jellemző gamma eloszlást mutat (2. ábra/A). Továbbá rövid IEI hosszaknál egy rés van, mely időn belül nem indulhat új SWR. Ez egy sejt- vagy hálózati szintű refraktor mechanizmus jelenlétére utal.

Dr. Káli Szabolcs készített egy egyszerű matematikai modellt, melyben a SWR keletkezés e két mechanizmus függvénye. Amikor az aktivitás elér egy kritikus szintet, a rekurrens serkentés ezt felerősíti és beindul egy SWR. Minden kísérletesen meghatározott (részben saját méréseimből adódó) IEI eloszláshoz könnyedén illeszthetőek voltak a modell által generált IEI eloszlások (2. ábra/A).



2. Ábra; Az éles-hullám keletkezés megmagyarázható egy kevert sztohasztikus-refraktor modellel.

A; A kísérletesen meghatározott IEI eloszlásokhoz (kék) egyszerűen tudtuk illeszteni a modell által generált IEI eloszlásokat (piros). A modell sztohasztikus komponensének jóslata: minél nagyobb a hálózat, annál szabályosabban és nagyobb rátával keletkeznek az éles-hullámok. **B;** Hogy ezt a predikciót teszteljem, a str. pyramidaléból történő mezőpotenciál elvezetés mellett lokálisan tetrodotoxint (TTX) injektáltam a str. radiatumba, hogy részlegesen blokkoljam az akciós-potenciál vezetést, ezáltal csökkentsem a funkcionális hálózati méretet. Rövid és hosszú TTX injekciót alkalmazva, a SWR ráta csökkent, valamint az IEI eloszlás jobbra tolódott, és szélesebb lett. Ezen eredmények megerősítik a modell helyességét.

Egy jó modell jóslatai kísérletesen tesztelhetők, és úgy viselkedik ahogy a vizsgált rendszer. A modellünkben lévő sztohasztikus mechanizmus predikciója: a hálózati méret növekedésével az éles-hullámok szabályosabb időközönként, és nagyobb rátával jelentkeznek. Hogy ezt kísérletesen igazoljam, kis mennyiségű tetrodotoxint (TTX) injektáltam a str. radiatumba, parciálisan blokkolva az akciós potenciál vezetést a rekurrens kollaterális rendszerben, ezáltal csökkentve a funkcionális hálózat-méretet. A predikciónak megfelelően, TTX hatására csökkent a SWR ráta ($68 \pm 17\%$; $n=19$) (3. Ábra/B), valamint az IEI (3. Ábra/C) eloszlás szélesebb lett (szabálytalanabb IEI hosszak következtében), és jobbra tolódott (a ráta csökkenése miatt).

3. A piramis rétegben mérhető éles-hullám mezőpotenciál komponenseinek elkülönítése

Az éles-hullám mezőpotenciálnak két komponense van, szinaptikus áramok és fáziskapcsolt akciós potenciálok. Hogy elkülönítsem ezek hozzájárulását a piramis rétegben mérhető mezőpotenciál kialakításához, lokális drog applikációkat alkalmaztam. Hogy a hálózati aktivitás megzavarása nélkül lokálisan tudjam befolyásolni az aktivitást, az elvezető csatorna közelében patch pipettával injektáltam drogokat. Eközben egy kontroll csatornával (~100 μm távolságban) ellenőriztem, hogy a drog applikációnak csak lokális hatásai vannak, nem befolyásolja a hálózati működést. Ennek a technikának a bevezetését valamint kalibrációját én végeztem el.

3./1 A fáziskapcsolt akciós potenciálok hozzájárulnak az SWR mezőpotenciál kialakításához.

A szakirodalomban közölt adatok szerint, megfelelően alacsony TTX koncentráció blokkolni képes az akciós potenciálok kialakulását, de a vezetést és a transzmitter felszabadulást nem zavarja meg¹⁴. Ennek megfelelően a MU komponens elkülönítéséhez 1nM TTX koncentrációt használtam a puffantó oldatban (hogy a szinaptikus jelátvitelt legkevésbé befolyásoljam). TTX injekció hatására, az éles-hullám és ripple amplitúdó csökkent párhuzamosan a MU frekvenciával, azonban azok fáziskapcsoltsága a ripple ciklusokhoz és az általános SWR struktúra ép maradt (3. ábra).

3. Ábra; A multiunit komponens hozzájárulásának meghatározása a SWR mezőpotenciálhoz.

A; Párhuzamosan regisztrált mezőpotenciál a CA3 str. pyramidale régió két pontjából. A kontroll csatorna (felső) bizonyítja, hogy a TTX puff lokálisan hatott a második (alsó) LFP elektróda környezetében (két elektróda távolsága: $\sim 100 \mu\text{m}$, $n=7$ vízszintes skála (vs): 1 perc; függőleges skála (fs):

$100 \mu\text{V}$).

Az alapszakaszon **(B)** és a hatásszakaszon **(C)**

regisztrált éles-hullámok csúcsához legközelebbi

ripple-negatív ciklus csúccsal triggerelt

szűretlen LFP átlagok (felül), valamint a ripple

oszcillációra szűrt (sáváteresztő szűrő; 80-

200 Hz) átlagok (alul) láthatóak. Alap **(D)** és

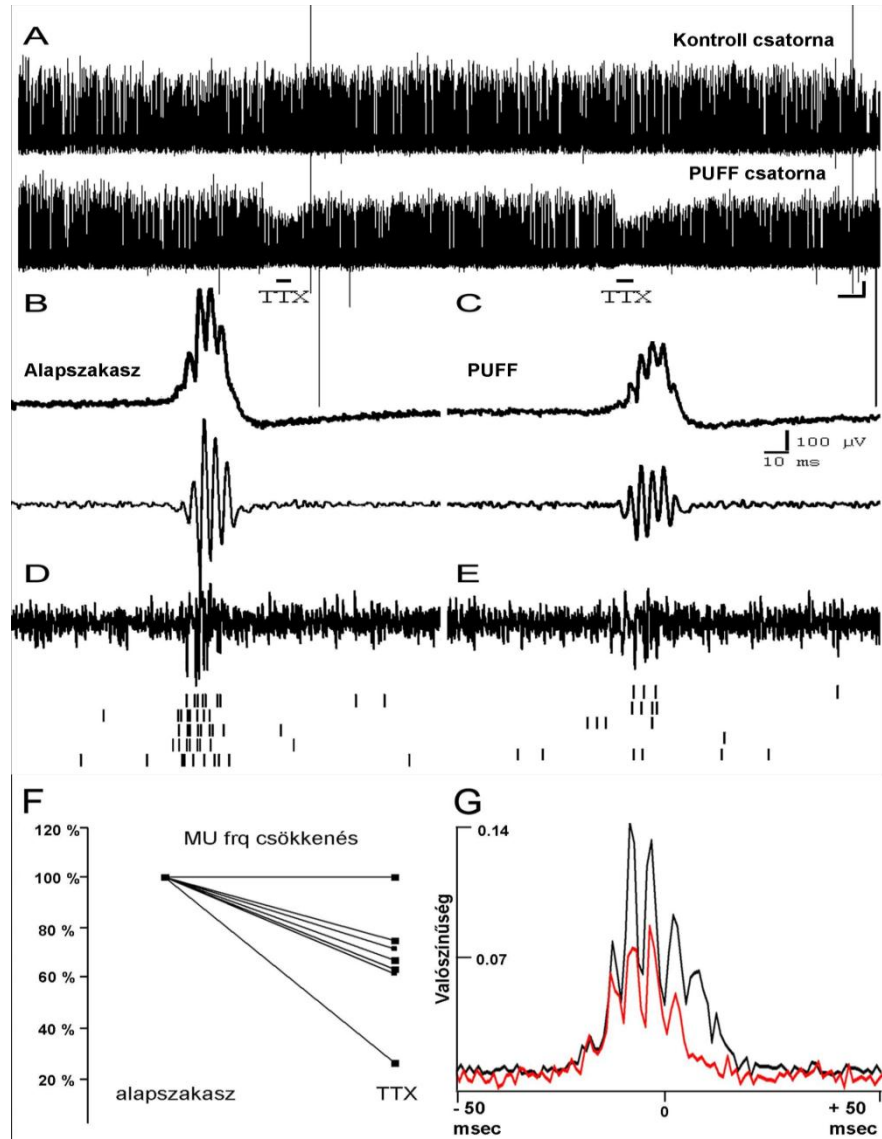
hatásszakaszon **(E)**

regisztrált, multiunitra (MU) szűrt (felül

áteresztő szűrő; 300 Hz) LFP elvezetés (felül), és

a kidetektált akciós potenciálok raster-plot ábrázolása egymást

követő éles-hullámok alatt (alul). **F;** Az alapszakaszhoz viszonyított relatív MU frekvencia csökkenés TTX injekció hatására. **G;** SWR csúcs- multiunit keresztkorreláció (fekete: alapszakasz, piros: hatásszakasz).

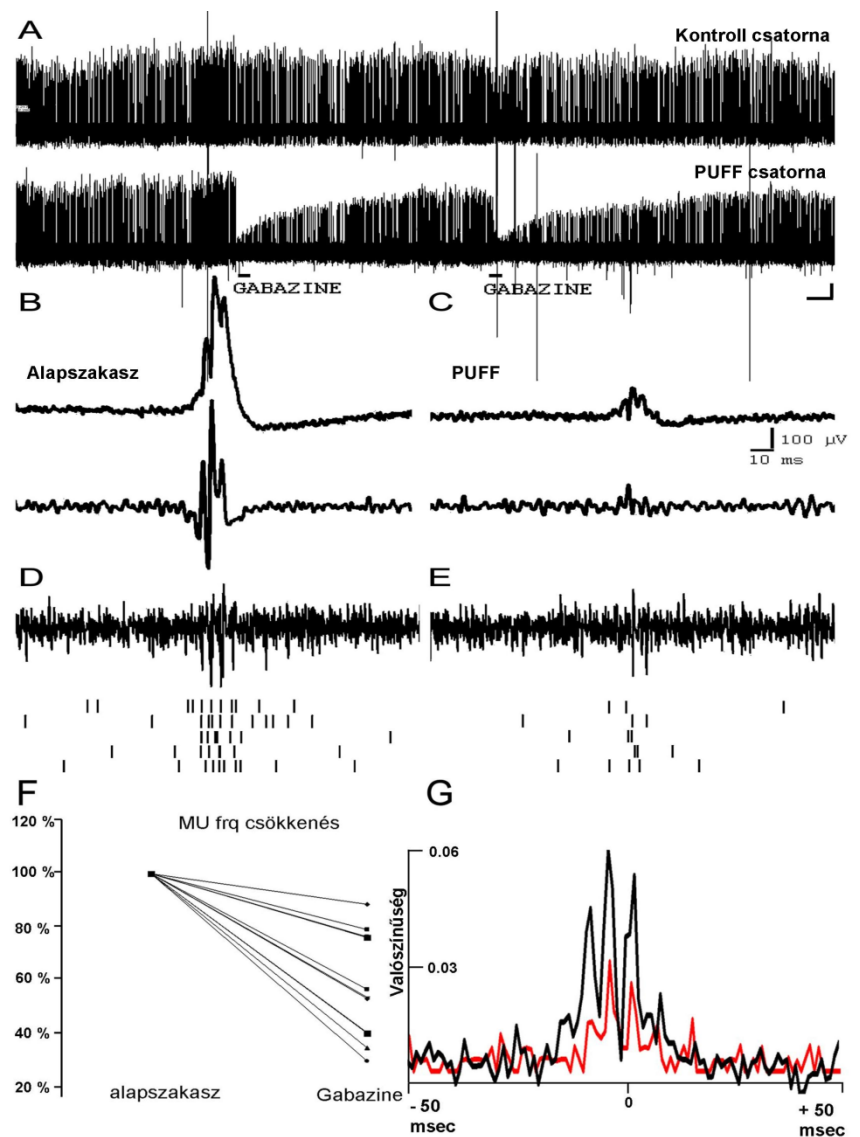


3./2 A gátló szinaptikus áramok hozzájárulnak a SWR lokális mezőpotenciál kialakításához.

Hogy elkülönítsem a gátlás hozzájárulását az LFP-hez, lokális gabazine puff segítségével gátoltam a GABA_A receptorok mediálta posztzinaptikus gátló áramokat (4. ábra). Gabazine puff hatására az éles-hullám amplitúdó közel nullára csökkent, valamint eltűnt a ripple oszcilláció. Meglepően a MU frekvencia csökkenését is tapasztaltam, mely arra utalhat, hogy a gátlás valamilyen módon támogatja a piramissejtek tüzelését SWR alatt*. A TTX-el végzett kísérletekkel ellentétben, gabazine puff hatására csökkent a MU tüzelés ripple oszcillációhoz történő fáziskapcsoltsága is.

4. Ábra; A lokális gátlóáramok hozzájárulásának elkülönítése a SWR mezőpotenciáltól.

A; Párhuzamosan regisztrált mezőpotenciál a CA3 str. pyramidale régió két pontjából. A kontroll csatorna (felső) bizonyítja, hogy a gabazine puff lokálisan hatott a második (alsó) LFP elektróda környezetében (két elektróda távolsága: ~100 μ m; n=8; vs:1 perc, fs:100 μ V). Az alapszakaszon **(B)** és a hatásszakaszon **(C)** regisztrált átlagok (felül), valamint a ripple oszcilláció átlagok (alul). Alap **(D)** és hatásszakaszon **(E)** regisztrált, MU-ra szűrt LFP (felül), és a kiderített akciós potenciálok raszter-plot ábrázolása több egymást követő SWR alatt (alul). **F;** Az alapszakaszhoz viszonyított relatív MU frekvencia csökkenés. **G;** SWR csúcs- multiunit keresztkorreláció (fekete: alapszakasz; piros:



hatásszakasz). A gabazine injekció esetében, az éles-hullám amplitúdó az alapszakaszhoz viszonyítva közel nullára csökkent, valamint a ripple oszcilláció eltűnt. A regisztrált akciós potenciálok fáziskapcsoltsága a TTX injekcióval ellentétben megszűnt, valamint meglepő módon számuk is lecsökkent.

Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy:

- 1. A gátló áramok adják a fő LFP komponenst a piramis rétegben SWR alatt.*
- 2. A gátlás felelős a MU tüzelés ripple-fáziskapcsoltságának kialakításáért.*
- 3. A gátlás elősegítheti a piramis sejtek tüzelését az éles-hullám alatt.*

* Loose-patch konfigurációban az általunk vizsgált gátlósejtek emelik tüzelési frekvenciájukat gabazine puff hatására, ezáltal tőlük nem származhat a MU aktivitás csökkenése (6.alfejezet).

4. A piramis rétegben mérhető LFP gátló komponensének generálásáért felelős sejtpopuláció azonosítása.

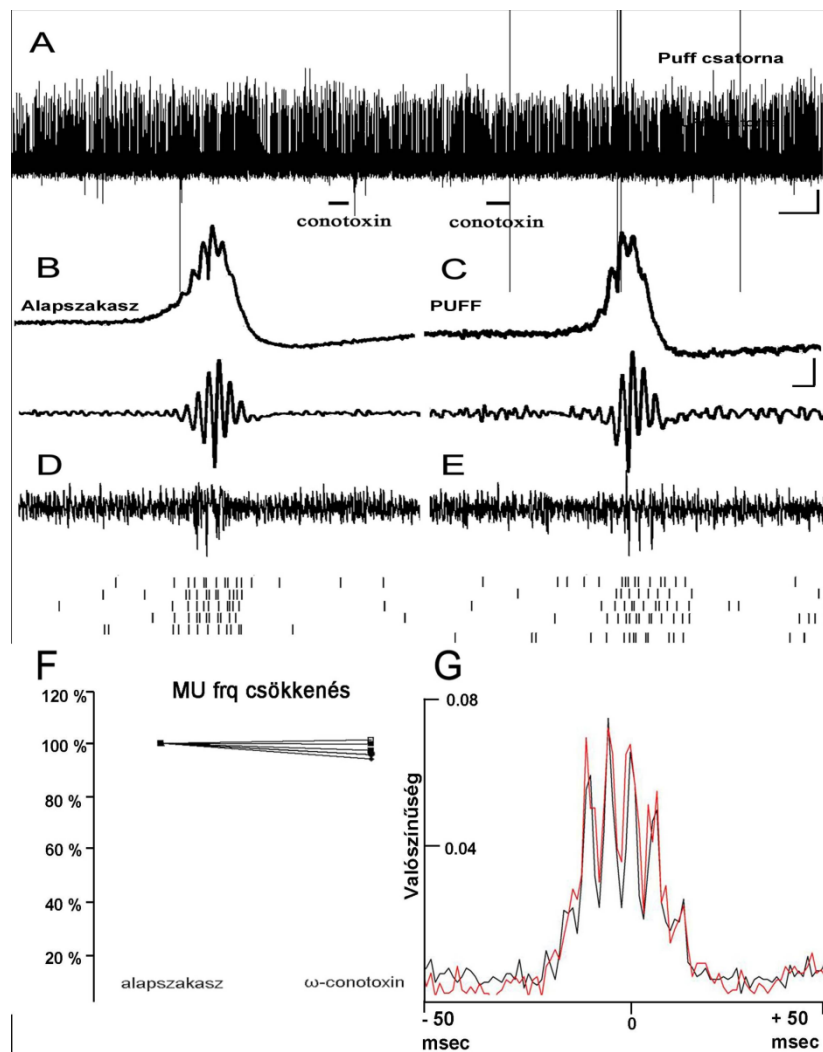
A következő kísérletsorozatban megpróbáltam azonosítani azt a periszomatikus régiót innerváló interneuron populációt, amely az előzően kimutatott gátló komponensért felelős. A bevezetőben említett három sejttípus közül a PV+ populációt alkotó sejtek axonterminálisaik P/Q-típusú feszültségfüggő kalcium csatornák fejeződnek ki. Ez a csatorna mediálja a GABA kibocsátást PV+ sejtek terminálisaiból¹⁵, és (egyes pókok mérgéből izolált), ω -Agatoxin nevű peptid segítségével irreverzibilisen blokkolható. Ezáltal szelektíven gátolható a PV+ sejtek transzmitter kibocsátása. A CCK+ periszomatikus régiót beidegző interneuronális sejtpopuláció tagjai N-típusú feszültségfüggő kalciumcsatornákat fejeznek ki axonterminálisaikon, mely (kúpcsiga mérgéből izolált) ω -Conotoxin segítségével szelektíven gátolható. Ennek segítségével, a CCK+ interneuronok transzmitter kibocsátása gátolható¹⁴. Szeletben kimutatták, hogy az ω -Agatoxin, valamint ω -Conotoxin szintén csökkenti az egységnyi EPSP amplitúdót¹⁶. Azonban mivel a CA3 területén a piramis sejtek periszomatikus régiójában nem, vagy alig található serkentő szinapszis¹⁷, ez a hatás elhanyagolható a lokális injekciókkal végzett kísérleteimben.

4./1 A CCK+ szabályosan tüzelő kosársejtek nem járulnak hozzá a SWR mezőpotenciál kialakításához a piramis rétegben.

Hogy elkülönítsem a CCK+ szabályosan tüzelő kosársejtek LFP-hez való hozzájárulását, a hálózati aktivitás megzavarása nélkül, ω -Conotoxint (500 nM, ~30 sec) puffantottam lokálisan egy str. pyramidaleban elhelyezkedő LFP elektróda közvetlen közelébe (n=5). Az injekció hatására nem következett be szignifikáns változás egyik SWR paraméterben sem, továbbá a MU tüzelés frekvenciájában és azok fáziskapcsoltságában sem tapasztaltam változást. (5. ábra)

5. Ábra: A CCK+ szabályosan tüzelő kosársejtek nem járulnak hozzá a SWR LFP-hez.

A; LFP elvezetés a CA3 régió piramis rétegéből. A kontroll csatorna (~100 μ m távolságban) nincs feltüntetve az ábrán. A markerek az ω -Conotoxin puffantások időszakát jelzik (vs: 1 perc; fs: 100 μ V). Az alapszakaszhoz **(B)** viszonyítva számottevő változás nem történt a SWR jellemzőiben ω -Conotoxin puff hatására **(C)** (vs: 10 msec, fs: 100 μ V), valamint nem tapasztaltam változás a MU aktivitás mértékében **(D,E,F)**, és az akciós potenciálok fáziskapcsoltságában sem **(G)**.



4./2 A PV+ sejtek felelősek az éles-hullám LFP generálásáért és a MU szinkronizálásért.

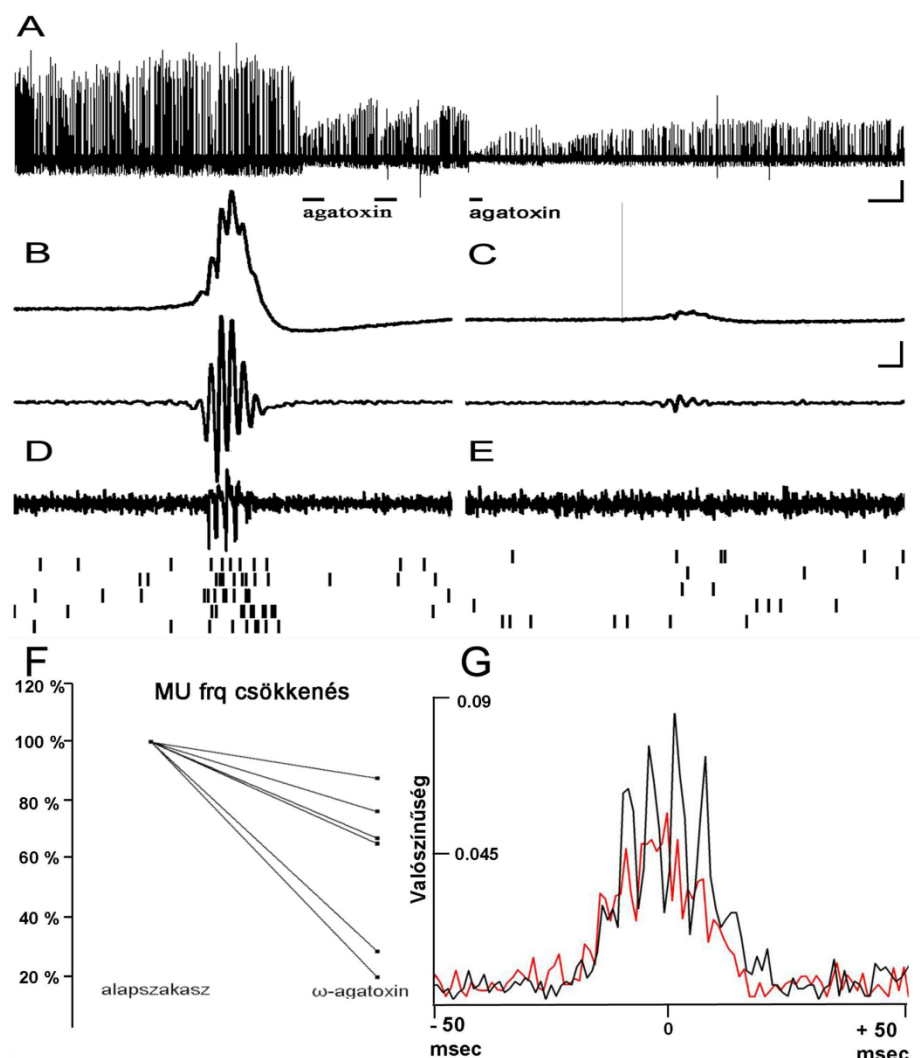
Amikor a PV+ gyorsan tüzelő kosársejtek és axo-axonikus sejtek transzmitter kibocsátását blokkoltam ω -Agatoxin (500 nM, ~30 sec) puffantással (n=6), a Gabazinnal végzett kísérletek eredményéhez hasonló változásokat tapasztaltam. Az éles-hullám amplitúdó közel nullára csökkent a ripple oszcillációval párhuzamosan (6. ábra). A MU tüzelés fáziskapcsoltsága, és frekvenciája lecsökkent, a Gabazine-hatással megegyező mértékben.

6. Ábra; A PV+ gátlósejtek adják a fő éles-hullám LFP komponenst, és szinkronizálják a MU tüzelést a piramis rétegben.

A; LFP elvezetés a CA3 régió piramis rétegéből ω -Agatoxin injekció mellett (markerek), a kontroll csatorna (~100 μ m távolságban) nincs feltüntetve az ábrán (vs: 1 perc; fs: 100 μ V). Az alapszakaszon (**B**) és az ω -Agatoxin hatása alatt (**C**) regisztrált éles-hullám átlagok (felül), valamint a ripple oszcilláció átlagok (alul; vs: 10 msec; fs: 100 μ V).

Alap (**D**) és hatásszakasz alatt (**E**) regisztrált MU-ra szűrt LFP elvezetések (felül), valamint a kidetektált akciós potenciálok raster-plot (alul) ábrázolása egymást követő SWR események alatt. **F;** Az alapszakaszhoz viszonyított

relatív MU frekvencia csökkenés injekció hatására, valamint a MU-ok SWR csúccsal való keresztkorrelációja (fekete: alapszakasz, piros: hatásszakasz) (**G**).

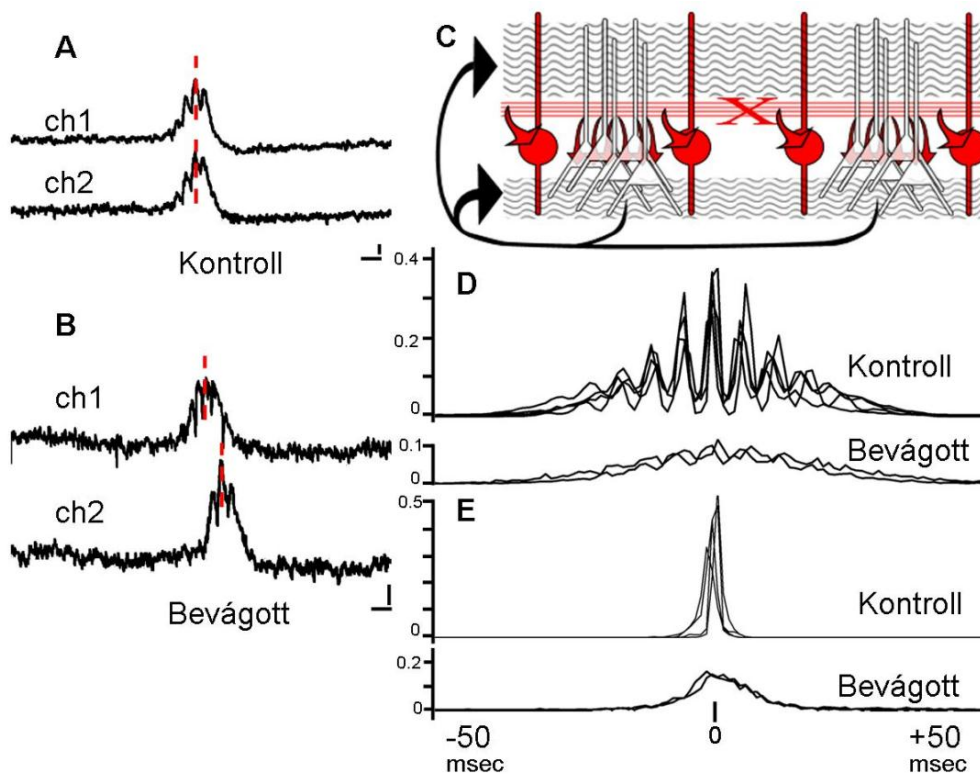


Az utóbbi két kísérlet eredményei a következőkre engednek következtetni:

- 1. A piramis rétegben mérhető gátló LFP komponenst a PV+ sejtek GABA kibocsátása okozza.*
 - 2. Ez a gátlás felelős a MU tüzelés ripple-fáziskapcsoltságáért.*
 - 3. Az agatoxinnal végzett kísérlet tovább támogatja azt a korábbi eredményt (3./2), miszerint a gátlás valamilyen módon elősegíti a piramissejtek tüzelését.*
-
- 5. A gyorsan tüzelő kosársejt axonok szelektív léziója deszinkronizálja az éles-hullámokat és a ripple oszcillációt a piramis rétegben.*

Az előző kísérletek azt bizonyítják, hogy a PV+ sejtek (AAC, FSBC) fontos szerepet játszanak az éles-hullám mezőpotenciál és a ripple oszcilláció kialakításában. A kérdés az: hogyan?

Korábban modellezők leírták, hogy szinaptikusan kölcsönösen összekötött gátlósejt hálózatok, serkentéssel meghajtva, képesek magas frekvenciájú oszcilláció létrehozására. Jelenlegi tudásunk szerint a kölcsönös szinaptikus kapcsolat kritériumának csak a PV+ kosársejtek felelnek meg a PV+ populációból. Hogy teszteljem ezt a hipotézist, kihasználtam azt a szerencsés tulajdonságukat, hogy axonjaik egy jól definiált alrétegben futnak a str. pyramidale és a lucidum határán¹⁸. Egy apró bevágást követően ebben a régióban (7. ábra/B), elvezettem a LFP-t a vágás két oldalán (7.Ábra/C). A kidetektált éles-hullám csúcsok közt, és a ripple negatív csúcsok közt is keresztkorrrelációkat számítottam. A kapott értékeket összevetettem olyan mérésekkel, melyekben nem alkalmaztam vágást, de a két LFP elektróda hasonló távolságban helyezkedett el (~150 µm). A gyorsan tüzelő kosársejt axonok léziójával, a vágás két oldalán a ripple oszcilláció deszinkronizálódott, valamint az éles-hullámok időzítésében ~40 milliszekundumos lötyögés jelentkezett. Azonban a két csatornán az SWR-ök mindig egymás közelében jelentek meg, hiszen a vágás két oldalán a sejtek egyszerre felépülő, közös serkentő bemenetet kapnak. A kísérletet elvégeztem a rekurrens kollaterálisok lézióját követően is, épen hagyva a FSBC axonokat. Ebben az esetben nem tapasztaltam a fenti változásokat (az ábrán nincs feltüntetve).



7. Ábra; A gyorsan tüzelő kosársejt axonok szelektív léziója deszinkronizálja az éles-hullámokat és a ripple oszcillációt a piramis rétegben.

A; Két egymástól ~150 μm -re elhelyezkedő elektródával elvezetett LFP. Az ábrán jól látszik, hogy bevágás nélkül, az éles-hullám csúcsa (E/Kontroll), valamint a ripple oszcilláció negatív csúcsai (D/Kontroll) is korrelálnak a két csatorna közt. **B;** A str. pyramidale/lucidum határán futó FSBC axonok léziója után, a bevágás két oldalán (egymástól ~150 μm -re elhelyezkedő elektródákkal) elvezetett LFP. Jól látható hogy az éles-hullámcsúcsok (E/Bevágott), valamint a ripple oszcilláció csúcsai (D/bevágott) is deszinkronizálódtak. **C,** A kísérleti felállást ábrázoló rajz. Pirossal a gyorsan tüzelő kosársejtek, és horizontálisan futó axonjaik, feketével a piramissejtek, és a rekurrens kollaterális rendszerük látható. Az "X"-el látható jelölés a bevágás helyét jelöli. **D;** A két csatornán regisztrált ripple negatív csúcsok közti keresztkorreláció „kontroll” és „bevágott” esetekben. **E;** A „bevágott” illetve „kontroll” szeletekben, a két csatornán regisztrált éles-hullám csúcsok közti keresztkorreláció. (ch1- 1. csatorna, ch2- 2. csatorna, mértékek: 10ms, 50 μV)

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PV+ gyorsan tüzelő kosársejteknek kritikus szerepe van a ripple oszcilláció genézisben és a fázis-szinkronizálásban.

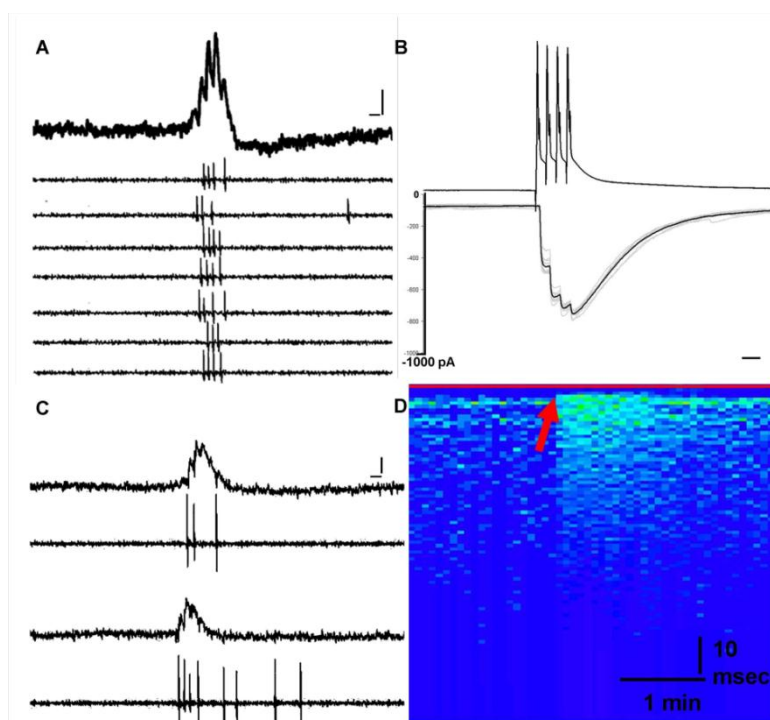
6. A gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelési és szinaptikus tulajdonságai.

Ezután megvizsgáltam a gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelési mintázatát SWR aktivitás alatt. A korábbi irodalmi adatokat megerősítve¹⁹, (Hájos N. és mtsi. közlés alatt.), azt találtam, hogy 3-5 akciós potenciált tüzelnek egy SWR epizód alatt, a ripple negatív csúcsokhoz fáziskapcsoltan (8. ábra/A). Ez a tüzelési mintázat megfelelő a ripple oszcilláció generálásához.

Kollégám, Kohus Zsolt párelvezetések segítségével megvizsgálta a gyorsan tüzelő kosársejtek piramissejtekre adott szinapszisainak tulajdonságait. A preszinaptikus sejtet (PV + kosársejt) olyan mintázatban stimulálta, amely SWR aktivitás alatt jellemző rá. Korábbi irodalmi adatokkal egyezően²⁰ azt találta, hogy a FSBC piramissejtre adott gátló szinapszisai erősen depresszálnak. Ez a szinaptikus depresszió, kombinálva a korábbi felfedezéssel, miszerint a PV+ sejtek által biztosított gátlás elősegítheti a piramissejtek tüzelését, egy lehetséges mechanizmust adhat a SWR terminációra: ahogy csökken a gátló áram amplitúdója a soron következő ripple ciklusok során, a piramissejtek nem tüzelnek tovább, és megáll a SWR.

A következő kísérletben azt a hipotézist teszteltem, miszerint az egymás közti kölcsönös gátlás szinkronizálja és teszi fáziskapcsolttá ezen sejtek tüzelését. Ehhez *loose-patch* konfigurációban elvezettem a sejtek tüzelését SWR aktivitás alatt, majd lokálisan Gabazine-t puffantottam az elvezetett sejt szomatikus régiójára, hogy blokkoljam a rá érkező GABA-erg gátlóáramokat (n=3) (8. ábra/C.). Injekció hatására a sejt tüzelésének frekvenciája emelkedett, valamint megszűnt a ripple fázishoz való kapcsoltsága. (8. ábra/D).

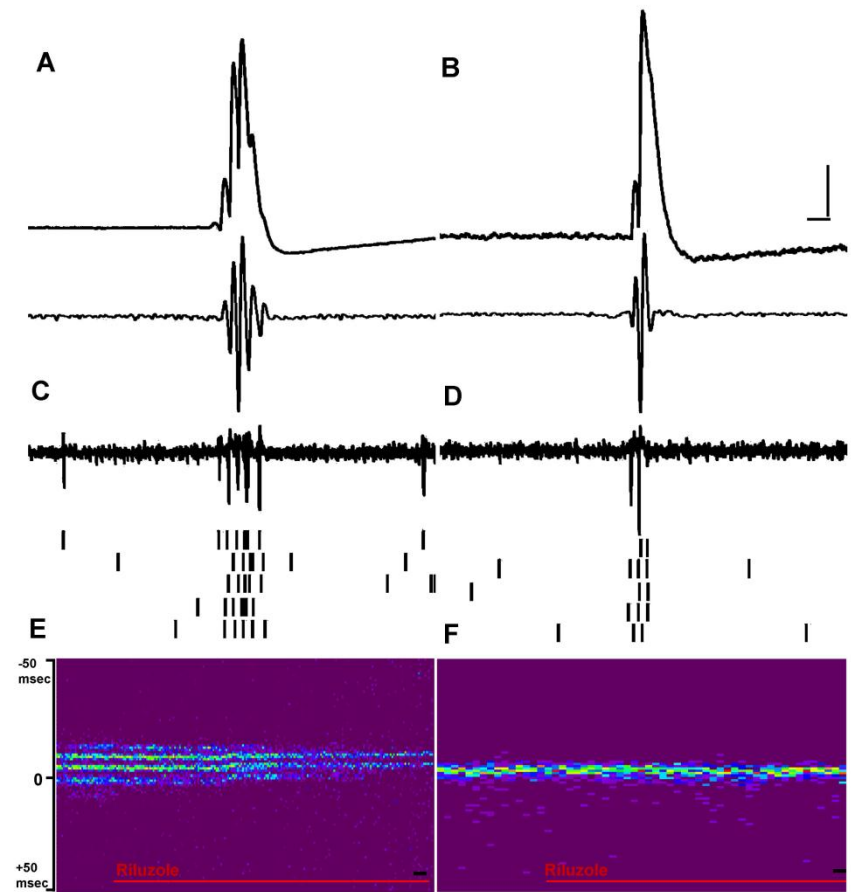
8.Ábra. *A gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelési és szinaptikus tulajdonságai.* **A;** Éles-hullám aktivitás (felül) alatt, loose-patch konfigurációban elvezetett majd később azonosított gyorsan tüzelő



kosársejt aktivitása (hét egymást követő SWR alatt; alul). **B**; Gyorsan tüzelő kosársejt-piramissejt párban mért szinaptikus áramok átlaga. A preszinaptikus kosársejt, a SWR aktivitás alatt rá jellemző mintázatban volt tüzeltetve. Az ábrán a szinapszis erős rövidtávú depressziója látszik. **C**; „A” pontban említett módon elvezetett sejt szomatikus régiójára gabazine-t injektálva, a sejt tüzelési frekvenciája nő, és aszinkronná válik a ripple ciklusoktól. **D**; Gyorsan tüzelő kosársejt akciós potenciáljainak autokorrelációja. A világosabb színek az erősebb korrelációt jelzik. Jól látható, hogy az alapszakaszon (piros nyíl előtt) a vízszintes piros vonal alatt 2 világosabb sáv látható, melyek a ripple ciklushoz kapcsolt tüzelést jelenítik meg. Gabazine puff (piros nyíl) hatására megszűnik ez a fáziskapcsolt tüzelés, így ezek sávok eltűnnek, majd idővel (x-tengely=idő) regenerálódnak a kimosódás miatt. (A,C- vs: 10 msec, fs: 100 μ V; B, vs: 10 msec)

7. Riluzole (10 μ M) globális alkalmazása lerövidíti a SWR-öket, és csökkenti a ripple ciklusok számát.

Laboratóriumunk korábbi kísérleteiből tudtuk, hogy a gyorsan tüzelő kosársejt az egyetlen sejtípus mely több mint 1-2 akciós potenciált (3-5/SWR) tüzel éles-hullám alatt (Hájos N. és mtsi., közlés alatt). Ennek megfelelően egy olyan drogot kerestünk, mely képes megakadályozni, hogy egy idegsejt hosszú sorozatokban tüzeljen. A riluzole, mely egy TTX-szenzitív nátrium csatorna blokkoló, dózis függően képes blokkolni a perzisztens nátrium áramokat, így potenciálisan alkalmas erre a célra²¹. Riluzole (10 μ M) perfúziós oldatban való alkalmazásával (9. ábra) a ripple ciklusok száma lecsökkent (n=6, 65,2 $\pm$ 8%), valamint az éles-hullámok szélessége is csökkent (81,22 $\pm$ 1,7%). A MU aktivitás kisebb lett, azonban fáziskapcsolt maradt és behúzódott a rövidebb SWR-ök alá. *Loose-patch* kísérletekkel ellenőriztem a gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelési mintázatának változását. A kontroll körülmények közt rájuk jellemző 3-5 akciós potenciál/SWR lecsökkent 1-2 akciós potenciál/SWR-re (n=4, 41,6 $\pm$ 8%). Az eddig megmért más típusú sejtek esetében, melyek 1-2 akciós potenciált tüzelnek egy SWR alatt, nem tapasztaltam változást (n=3), azonban ezek a kísérletek még folyamatban vannak.



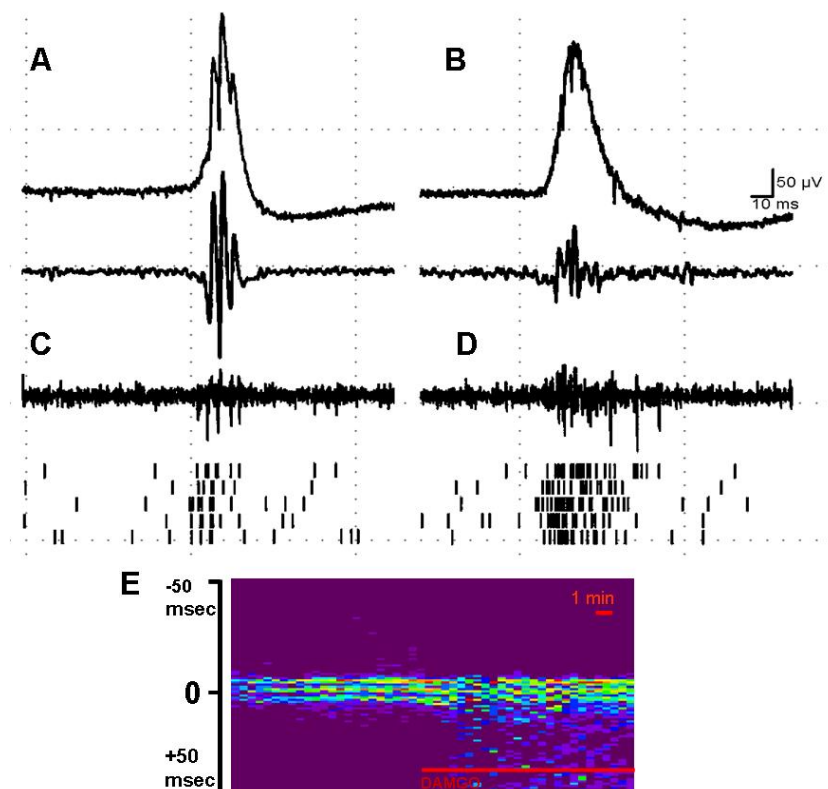
9. Ábra; Riluzole hatására csökken a SWR szélessége és a ripple ciklusok száma.

Alap **(A)** és hatásszakaszon **(B)** detektált SWR (fent) és ripple oszcilláció (alul) átlagok (vs:10msec; fs: 100 μ V), továbbá a MU aktivitás (felül), valamint a kidetektált akciós potenciálok raster-plot ábrázolása (alul) egymást követő éles-hullámok alatt. **E**; Keresztkorreláció a *loose-patch* konfigurációban elvezetett gyorsan tüzelő kosársejt akciós potenciáljai, valamint az éles-hullám csúcs között. Az "x"-tengelyen az idő, az "y"-tengelyen nullánál az éles-hullám csúcs látható. A világosabb színek jelzik az erősebb korrelációs értékeket. Jól látható hogy a világosabb sávok mennyisége, amely a SWR körüli akciós potenciálokat jelzi, riluzole hatására 4-5-ről lecsökken 2-re. Nem gyorsan tüzelő kosársejteknel **(F)** hatást nem tapasztaltam (vs: 1 perc). Az éles-hullámok szélességének valamint MU aktivitás csökkenése tovább támogatja azt a korábbi eredményt, hogy a PV+ sejtek által biztosított gátlás serkenti a piramis sejtek tüzelését. SWR hamarabb megáll, mivel a PV+ kosársejtek kevesebbet tüzelnek, ezáltal rövidebb ideig segítik elő a piramis sejtek tüzelését.

8. A PV+ gyorsan tüzelő kosársejtek GABA kibocsátásának specifikus módosítása "DAMGO" segítségével.

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a DAMGO, mely egy μ -opioid receptor agonista, csökkenti a transzmitter kibocsátás valószínűségét a PV+ sejtekből²². A transzmitter felszabadulás csökkenése ugyanakkor szükségszerűen csökkenti a rövidtávú szinaptikus depressziót is. Bár a DAMGO hiperpolarizálja az ivy valamint a neurogliaform interneuronokat is²³, Hájos N. és mtsai. eddig nem publikált eredményei szerint ezek a sejtek nem tüzelnek SWR aktivitás alatt, így a mi szempontunkból nem jelentenek problémát.

DAMGO (1 μ M) globális alkalmazására az éles-hullámokról specifikusan eltűnt a ripple oszcilláció, a MU aktivitás aszinkronná vált, valamint az éles-hullámok szélessége megnőtt. A szélességnövekedés magyarázható lehet azzal, hogy DAMGO hatására csökken a szinaptikus depresszió mértéke, és a gyorsan tüzelő kosársejtek tovább tüzelnek. E két hatás kombinálva a piramissejtek hosszabban tartó tüzelését eredményezheti, mely az éles-hullám szélességének növekedésében és a piramis rétegben mérhető elnyúlt és emelkedett MU aktivitásban jelentkezik.



10. Ábra; A FSBC-ek GABA kibocsátásának specifikus módosítása. Alap (A) és hatásszakaszon (B) mért éles-hullám (felül) valamint ripple oszcilláció (alul) átlagok.

DAMGO hatására eltűnt a ripple oszcilláció, valamint szélesebb lett az éles-hullám. A multiunit aktivitás DAMGO hatására aszinkronná vált (D) az alapszakaszhoz (C) képest. E; Loose-patch konfigurációban mért FSBC akciós potenciáljai és az éles-hullám csúcsok közti keresztkorreláció (értelmezés a korábbi ábrákkal megegyezően).

Kollégám, Kohus Zsolt megmérte a DAMGO hatását a három periszomatikus régiót innerváló interneuron piramissejtekre adott szinapszisaira. A DAMGO csökkentette a transzmitter kibocsátás valószínűségét és az IPSC amplitúdót, valamint a rövidtávú szinaptikus depresszió mértékét a gyorsan tüzelő kosársejtek esetében, azonban nem volt hatással a másik két sejtípus piramissejtekre adott szinapszisaira (előzetes eredmény, kísérletek folyamatban). Ez megerősíti az irodalomban leírtakat²⁴, azonban a saját körülményeink között is el kellett végezni ezen kísérleteket (Az idézett cikkben kolinerg agonista segítségével kiváltott gamma oszcilláció alatt alkalmaztak DAMGO-t).

7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS JÖVŐBELI TERVEK

A hálózati és szinaptikus dinamikára alapozva felállítottunk egy kevert sztohasztikus-refraktor matematikai modellt a SWR keletkezés mechanizmusára, melynek predikciói kísérletesen igazolhatóak. Kísérleti eredmények és a matematikai modell alapján SWR keletkezési modellünk a következő: A serkentés felépülése SWR aktivitás során egy spontán aktiválódó kritikus méretű piramissejt populációból indul, amely a kritikus szint felett, a rekurrens kollaterális rendszerben beindítja az aktivitás felépülését és egy SWR keletkezik.

Lokális drog injekciók segítségével bebizonyítottuk, hogy miután beindult egy SWR esemény, a serkentéssel meghatjott gyorsan-tüzelő kosársejtek hálózata adja a fő LFP komponenst, és alakítja ki a ripple oszcillációt amely végül fáziskapcsolja a multiunit tüzelést a str. pyramidaléban.

Paradox módon kísérleteink arra engednek következtetni, hogy ez a gátlás szükséges a piramis sejtek tüzeléséhez SWR alatt, amely egybevág korábbi irodalmi adatokkal²⁵.

A gátlás piramis sejt tüzelést promótáló hatását támogató kísérletek:

- Gabazine ill. ω -Agatoxin puff hatására csökken a MU aktivitás

- Riluzole hatására a gátlás rövidülését követően behúzódnak a MU a SWR alá.
- DAMGO hatására a MU deszinkronizálódik, azonban megnő a frekvenciája, követve a gyorsan tüzelő kosársejtek tüzelését.
- A gyorsan tüzelő kosársejt axonok léziója után, a MU aktivitás a deszinkronizálódott SWR-ök alatt jelenik meg. (Nem a közös serkentéssel hajtva, szinkronizáltan.)

Ennek egyik lehetséges magyarázata hogy PV+ axo-axonikus sejtek a piramis sejtek egy kisebb csoportját közvetlenül depolarizálják²⁶, azonban ilyen hatást más munkákban ahol hasonló kísérleti körülményeket alakítottak ki, nem sikerült kimutatni²⁵. Egy másik lehetőség hogy a GABA hiperpolarizáló hatású, és az axoniniciális szegmentumon elhelyezkedő feszültségfüggő nátriumcsatornák reaktivációjával érzékenyítik a piramis sejteket. Végül az is elképzelhető, hogy serkentő áramok emelkedési meredeksége, összeadódva a gátló áramok lecsengésének meredekségével elegendő membránpotenciál grádienszt produkál adott időegység alatt a piramis sejtek kisütéséhez.

Hogy felderítsük melyik mechanizmus állhat ennek a eredménynek a hátterében, a jövőben dynamic-clamp segítségével próbáljuk majd vizsgálni a piramissejtre SWR alatt érkező komplex EPSP/IPSP szekvenciának tüzelésükre gyakorolt hatását

Summary

Sharp wave-ripples (SWRs) occur in the hippocampus during awake immobility and NREM sleep, and have role in memory consolidation. In vivo studies revealed the firing pattern of distinct cell types during SWR activity, but several questions concerning the generation of SWRs are still open. Our goal is to reveal the mechanisms of SWR initiation, termination and ripple genesis.

To understand how SWRs are initiated we examined how the activity of inhibitory/excitatory neurons changes during different phases of SWRs by recording EPSCs and/or IPSCs from neurons of the CA3 area in vitro. Excitatory activity increases ~60 msec before SWR peak. Inhibitory cells are activated ~20 msec later, quickly overshoot pyramidal cell (PC) activity and start to ripple-phase modulate cellular firing. The initiation of SWRs can be explained by a mixed stochastic/refractory model.

To dissect local field potential generators in stratum pyramidale during SWRs, we used local drug applications, without influencing global network activity. Inactivation of inhibition in str. pyr. by local puff application of Gabazine or ω -Agatoxin proved that SWR field generation and ripple phase locking of cellular firing is driven by parvalbumin positive perisomatic cells (PVCs, ω -Conotoxin had no effect).

Modelling studies have shown, that interconnected network of interneurons driven with excitation, can generate high frequency oscillations. From PVCs only fast spiking basket cells (FSBCs) are interconnected and fire 4-5 action potentials (APs) during SWRs suitable for ripple generation. A small cut that selectively severs horizontally running FSBC axons and thus mutual connectivity between two subset of cells, introduced a jitter in SWR timing, and abolished ripple synchrony on the two sides of the cut. Furthermore FSBCs desynchronised and increased their firing for somatic Gabazine puff. SWR termination might be the result of the short-term synaptic depression observed in the inhibitory transmission of PVCs onto PCs. Manipulating the firing pattern or the release probability of PVCs by bath application of Riluzole and DAMGO we checked the validity of this mechanism. Riluzole reduced the number of FSBC APs from 4-5 to 1-2 (had no effect on other cell types), shortened SWRs and decreased the number of ripple cycles from 4-5 to 2 with a curtailed period of multiunit (MU) firing. DAMGO that decreases release probability and short-term depression of PVCs eliminated ripple oscillation and phase-locking of MU firing, while prolonged SWRs along with MU.

8. SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁSOK

(a dolgozat szövegében külön is kiemelve)

- Az „Eredmények és Megvitatásuk” fejezet első alfejezetének kísérleteit Németh Beáta, Karlócai Rita és Hájos Norbert végezte.
- A második alfejezetben szereplő matematikai modellt Káli Szabolcs készítette.
- A hatodik ill. nyolcadik pontban említett párelvezetések Kohus Zsolt végezte.
- Az összes többi kísérletet magam végeztem és analizáltam.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Buzsáki, G. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science* **304**, 1926–1929 (2004).
2. Ylinen, A. *et al.* Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J. Neurosci.* **15**, 30–46 (1995).
3. Buzsáki, G. Two-stage model of memory trace formation: a role for ‘noisy’ brain states. *Neuroscience* **31**, 551–570 (1989).
4. Jadhav, S. P., Kemere, C., German, P. W. & Frank, L. M. Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory. *Science* (2012).doi:10.1126/science.1217230
5. Nádasdy, Z., Hirase, H., Czurkó, A., Csicsvari, J. & Buzsáki, G. Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *The Journal of neuroscience* **19**, 9497–9507 (1999).
6. Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53–57 (2008).
7. Freund, T. F. & Katona, I. Perisomatic Inhibition. *Neuron* **56**, 33–42 (2007).
8. Somogyi, P., Nunzi, M. G., Gorio, A. & Smith, A. D. A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.* **259**, 137–142 (1983).
9. Csicsvari, J., Hirase, H., Czurkó, A., Mamiya, A. & Buzsáki, G. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J. Neurosci.* **19**, 274–287 (1999).
10. Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, A. & Buzsáki, G. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* **28**, 585–594 (2000).
11. Sirota, A., Csicsvari, J., Buhl, D. & Buzsáki, G. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 2065–2069 (2003).
12. Hájos, N. *et al.* Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *European Journal of Neuroscience* **29**, 319–327 (2009).
13. Meyer, A. H., Katona, I., Blatow, M., Rozov, A. & Monyer, H. In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *J. Neurosci.* **22**, 7055–7064 (2002).
14. Heifets, B. D., Chevaleyre, V. & Castillo, P. E. Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 10250–10255 (2008).

15. Hefft, S. & Jonas, P. Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat. Neurosci.* **8**, 1319–1328 (2005).
16. Zaitsev, A. V., Povysheva, N. V., Lewis, D. A. & Krimer, L. S. P/Q-Type, But Not N-Type, Calcium Channels Mediate GABA Release From Fast-Spiking Interneurons to Pyramidal Cells in Rat Prefrontal Cortex. *Journal of Neurophysiology* **97**, 3567–3573 (2007).
17. Gulyás, A. I., Megias, M., Emri, Z. & Freund, T. F. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **19**, 10082–10097 (1999).
18. Gulyás, A. I., Miles, R., Hájos, N. & Freund, T. F. Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 1729–1751 (1993).
19. Klausberger, T. *et al.* Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* **421**, 844–848 (2003).
20. Davies, C. H., Davies, S. N. & Collingridge, G. L. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* **424**, 513–531 (1990).
21. Urbani, A. & Belluzzi, O. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *European Journal of Neuroscience* **12**, 3567–3574 (2000).
22. Svoboda, K. R., Adams, C. E. & Lupica, C. R. Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 85–95 (1999).
23. Krook-Magnuson, E., Luu, L., Lee, S.-H., Varga, C. & Soltesz, I. Ivy and neurogliaform interneurons are a major target of μ -opioid receptor modulation. *J. Neurosci.* **31**, 14861–14870 (2011).
24. Gulyas, A. I. *et al.* Parvalbumin-Containing Fast-Spiking Basket Cells Generate the Field Potential Oscillations Induced by Cholinergic Receptor Activation in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* **30**, 15134–15145 (2010).
25. Ellender, T. J., Nissen, W., Colgin, L. L., Mann, E. O. & Paulsen, O. Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J. Neurosci.* **30**, 5979–5991 (2010).
26. Szabadics, J. *et al.* Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* **311**, 233–235 (2006).

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Gulyás Attilának, aki lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek ebben a munkában, önzetlen segítséget nyújtott a tudományos alap kutatás elméletének és gyakorlatának megismerésében.

Köszönet illeti Dr. Freund Tamás igazgatót, amiért lehetővé tette számomra, hogy a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében TDK hallgatóként, a kutatócsoportjában dolgozzak.

Szintén hálás vagyok Karlócai Ritának, Németh Beátának, Hájos Norbertnek és Kohus Zsoltnek, kitartó és fáradhatatlan segítségükért, támogatásukért és szakmai tanácsaikért.