



36. OTDK
Biológia Szekció

A neuronális serkenthetőség és integratív tulajdonságok vizsgálata a subiculumban

TDK dolgozat

készítette:

Gazdik Melinda Erika

biológus mesterszak II. évfolyam

témavezetők:

Dr. Varró Petra

adjunktus

Dr. Szűcs Attila

tudományos főmunkatárs

ÉLETTANI ÉS NEUROBIOLÓGIAI TANSZÉK

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés	4
1.1. A hippocampális formáció és része, a subiculum	4
1.2. A subicularis neuronok fiziológiai és morfológiai jellemzői	4
1.3. A neuronális serkenthetőség vizsgálati módszerei	5
2. Célkitűzések	6
3. Anyag és módszer	6
3.1. Preparátumkészítés	6
3.2. Anyagok	7
3.3. Elektrofiziológiai mérések	7
3.4. Immunhisztokémia	8
3.5. Adatok kiértékelése	9
4. Eredmények és értékelésük	9
4.1. Reguláris és burst-ös neuronok jellemzése a subiculumban	9
4.2. Aktív és passzív membrántulajdonságok vizsgálata és összehasonlítása reguláris és burst-ös sejtek esetében	13
4.3. Reguláris és burst-ös sejtek tüzelési válaszainak összehasonlítása	15
Összefoglaló	20
Köszönetnyilvánítás	20
5. Irodalomjegyzék	21
Szerzői Hozzájárulás	23

Rövidítésjegyzék

ACSF – artificial cerebrospinal fluid/mesterséges cerebrospinális folyadék

AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav

AP5 – 2-amino-5-foszfono-valerinsav

BSA – bovine serum albumin/borjú szérum albumin

CNQX – ciánkixalin (6-ciano-7-nitrokinoxalin-2,3-dion)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

EGTA – egtazinsav (etilénglikol-bisz(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav)

EPSC – excitatory postsynaptic current/serkentő posztszinaptikus áram

EPSP – excitatory postsynaptic potential/serkentő posztszinaptikus potenciál

GABA – gamma aminobutyric acid/gamma aminovajsav

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etán-szulfonsav

IPSP – inhibitory postsynaptic potential/gátló posztszinaptikus potenciál

NMDA – N-metil-d-aszparaginsav

PBS – phosphate buffered saline/foszfátpufferelt sóoldat

PFA – paraformaldehid

TRITC – tetrametil-rodamin-izotiocianát

1. Bevezetés

1.1. A hippocampális formáció és része, a subiculum

A hippocampális formáció az emlős előagy része, amely számos, magasabbrendű funkciókhoz szükséges kognitív folyamatban kulcsfontosságú szerepet játszik (memórianyomok kialakulása, konszolidációja és előhívása) (Böhm et al., 2018). Három fő, strukturálisan és funkcionálisan eltérő részből áll: a gyrus dentatusból, a tényleges hippocampusból (cornu Ammonis – CA1, CA2, CA3 szubrégiók) és a subiculumból. Ezen területek közül laboratóriumi munkánk során a subiculumot tanulmányoztuk, mely a hippocampális hálózatban betöltött fontos szerepe ellenére sokkal kevésbé kutatott, mint a gyrus dentatus vagy a hippocampus területe, így kevesebb vele kapcsolatos szakirodalom áll rendelkezésre. A subiculum a hippocampus CA1 régiójának folytatásaként helyezkedik el, így összekötve a hippocampust a parahippocampális kortexszel. A subiculum hippocampális hálózatban betöltött fontos szerepét bizonyítja, hogy a terület szelektív léziója rágcsálókban az állatok térbeli tájékozódási képességét negatívan befolyásolta, illetve az idiotetikus jelekkel és új térbeli elemekkel kapcsolatos memóriájukra is hatással volt (Potvin et al., 2007, 2010). A subiculum a hippocampális hálózatban egyfajta átkapcsoló állomásként működik: a hippocampus CA1 régiójából érkező jeleket fogadja, majd azokat továbbítja számos kortikális és szubkortikális terület felé (Matsumoto et al., 2019). A terület fontos funkciója tehát a hippocampális kimenet szervezése, és a subiculum neuronjai között megfigyelt szinaptikus kapcsolatok mintázata arra enged következtetni, hogy a subiculum nem csupán az információtovábbításban, hanem annak feldolgozásában is részt vesz. A subiculumon belül három réteget különíthetünk el: molekuláris, piramidális sejtes és polimorf réteget. A molekuláris és polimorf réteg a subiculum legalsó és legfelső rétegét alkotják, ezen rétegek között helyezkedik el a subiculum principális sejtípusát (piramissejteket) tartalmazó piramidális réteg, amely azonban nem alkot a CA1-hez hasonló tömör sejtréteget, hanem itt a piramissejtek elszórtabban helyezkednek el.

1.2. A subicularis neuronok fiziológiai és morfológiai jellemzői

A subiculumon belül glutamaterg (serkentő) piramidális és GABAerg (gátló) interneuronok egyaránt jelen vannak. Az általam is tanulmányozott piramidális sejtek tüzelési mintázatuk alapján két kategóriába sorolhatók: burst-ös és reguláris neuronokat különíthetünk el. Burst-ös aktivitásnak olyan akciós potenciál sorozatot nevezünk, amely során a sejt által generált spike-ok csomagokba rendeződnek konstans depolarizáló áram injektálásakor, míg a reguláris aktivitás során az akciós potenciálok szabályos, közel azonos időközönként követik egymást.

Ezen eltérő tüzelési mintázatok legfőképpen a neuronokban működő különböző feszültségfüggő ionáramokra vezethetők vissza, amelyeket alapvetően a különböző ioncsatornák expressziója és aktivitása határoz meg. Az idegsejtek serkenthetőségét és integratív képességét a sejtben működő ioncsatornák komplex együttműködése határozza meg, azonban bizonyos ionáramok kiemelkedő szerepet játszanak az egyes biofizikai paraméterek szabályozásában. Ilyenek például a subiculum burst-ös sejtjeiben működő alacsony feszültségen aktiválódó T-típusú kalcium áramok, amelyek a nagy frekvenciájú burst aktivitás kialakításában vesznek részt (Joksimovic et al., 2017). A subiculumban található piramissejtek morfológiájukat tekintve meglehetősen homogének. Bazális dendritfaik hasonló mérettel és elágazási ponttal rendelkeznek, illetve a legtöbb piramissejt esetében találhatunk egy egyedülálló primer apikális dendritet, melynek elágazásai a hippocampális fissuráig is elérhetnek. Ezen kívül axon kollaterálisokat is adnak, illetve apikális és bazális dendrittüskéik száma is jelentős (Matsumoto et al., 2019). Morfológiai szempontból tehát a subiculum piramissejtjei a CA1 folytatásaként értelmezhetők, viszont élettani tulajdonságaikban mégis markáns eltérések tapasztalhatók.

1.3. A neuronális serkenthetőség vizsgálati módszerei

Az egyedi neuronok serkenthetőségét tipikusan egészsejt patch-clamp technikával vizsgálhatjuk agyszeletekben. A hagyományos protokoll szerint a neuronokat fokozatosan emelkedő szintű áramlépcsőkkel stimuláljuk (statikus stimuláció). Ennek segítségével az idegsejteket tüzelési mintázatuk alapján kategorizálhatjuk, megvizsgálhatjuk a tüzelési frekvencia függését az áramerősségtől, illetve számos egyéb biofizikai paramétert megállapíthatunk, amely aztán további összehasonlításra és osztályozásra ad lehetőséget (Halabisky et al., 2006; van Aerde & Feldmeyer, 2015; Wheeler et al., 2015). Bár a hagyományos, statikus stimulációt alkalmazó vizsgálatok kétségtelenül rendkívül hasznosak, ilyen természetű statikus bemenetek élő neuronhálózatokban normál körülmények között nem fordulnak elő, ezért a neuronok természetes szinaptikus bemenetek alatti tüzelési kimenetét ezek a kísérletek csak korlátozottan képesek megjósolni. Ennek okán az elektrofiziológusok egy újszerű, működésében összetett módszert alkottak meg, melynek neve dinamikus clamp (Destexhe et al., 2003; Prinz et al., 2004). Ennek lényege, hogy biológiai neuronokba matematikailag modellezett és számítógéppel szintetizált mesterséges ionáramokat injektálunk. Lehetőségünk van mind feszültségfüggő, mind szinaptikus áramok modellezésére és azok injektálására (Prinz et al., 2004; Szücs et al., 2010). A dinamikus clamp technika tehát lehetővé

teszi a neuronok tüzelési válaszainak megfigyelését különböző típusú (pl. serkentő-, gátló-) és spektrális tulajdonságú (pl. theta-, vagy gamma-oszcillációk) szinaptikus bemenetek alatt. Laboratóriumunk korábbi, sejtenyészetben történt észlelései alapján a hagyományos, illetve dinamikus clamp technikával meghatározott idegi serkenthetőségi paraméterek nagymértékben eltérőek lehetnek hippocampális neuronokban (Szabó et al., 2021). Ezen megállapítások motiváltak minket arra, hogy vizsgálatainkat egy fiziológiailag, biofizikailag konzisztensebb, jól körülhatárolt agyterületre is kiterjesszük, ahol a sejtek élettani tulajdonságai és funkciói viszonylag jól definiáltak, ezáltal a megfigyelt tulajdonságokat is jobban interpretálhatjuk. A következő célunk annak megállapítása volt, hogy a subiculum fiziológiailag eltérő neuronjai differenciális tüzelési kimenetet adnak-e az agykérgi hálózatokban gyakran előforduló theta-, és gamma-oszcillációk alatt.

2. Célkitűzések

- Első célkitűzésem hagyományos áramstimuláció (statikus áramlépcsők) alkalmazásával a potenciális piramissejt-altípusok és alapvető élettani és biofizikai tulajdonságaik meghatározása a subiculumban, az irodalmi adatokhoz képest mélyrehatóbb analízis segítségével.
- Második célkitűzésem a két azonosított sejtípus hagyományos statikus áramstimulációja során meghatározott aktív és passzív tulajdonságok közötti kapcsolatok, az esetlegesen fennálló összefüggések vizsgálata.
- Harmadik célkitűzésem újszerű elektrofiziológiai módszer (dinamikus clamp) segítségével a különböző dinamikájú ingerlések által kiváltott válaszok összehasonlítása, illetve a statikus és dinamikus módszerrel meghatározott serkenthetőségi paraméterek összehasonlítása.

3. Anyag és módszer

3.1. Preparátumkészítés

A preparátumkészítéshez 6-8 hetes CD1 típusú hím egereket használtam. Az állatokat éteres altatást követően dekapitáltam, majd folyamatos hűtés mellett (hűtött, karbogénnel buborékoltatott mesterséges cerebrospinális folyadék - ACSF oldat) az agyakat kipreparáltam. Ezt követően vibratóm segítségével, hűtött és karbogénnel buborékoltatott kolin-kloridos metszőoldatban 200-300 mikrométer vastagságú koronális agyszeleteket készítettem, majd az

elkészült szeleteket szobahőmérsékletű, karbogénnel buborékoltatott ACSF oldatban inkubáltam legalább 1 órán keresztül.

3.2. Anyagok

Az akut agyszeletek fenntartásához standard ACSF (koncentráció mM-ban: NaCl 126; KCl 1,80; KH_2PO_4 1,25; MgSO_4 1,3; CaCl_2 2,4; NaHCO_3 26; glükóz 10) oldatot használtam, a vibratómmal való szeletkészítés ideje alatt kolin-kloridos (koncentráció mM-ban: kolin-klorid 92; KCl 2,5; NaH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 30; HEPES 20; glükóz 25; nátrium aszkorbát 5; thiourea 2; nátrium piruvát 3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 10; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5) metszőoldatot alkalmaztam. Az egészséj patch-clamp mérésekhez a következő receptorantagonistákat tartalmazó ACSF oldatot használtam: (koncentráció μM -ban) CNQX 5; bikukullin 10; AP5 20. A patch-clamp pipetták töltéséhez a következő összetételű intracelluláris oldatot alkalmaztam (koncentráció mM-ban: K-glükonát 100; KCl 10; KOH 20; MgCl_2 2; NaCl 2; HEPES 10; EGTA 0,2; glükóz 5), illetve a sejtek jelöléséhez biocitint tartalmazó intracelluláris oldatot használtam (koncentráció: 1 mM).

3.3. Elektrofiziológiai mérések

Az elkészített akut koronális agyszeleteket 1 óra inkubációs időt követően a perfúziós kamrába helyeztem, ahol folyamatos oldatcsere mellett (karbogénnel buborékoltatott, 33 °C-ra fűtött ACSF oldat) tartottam fenn őket. Normál, akut agyszelet preparátumokban a piramissejteken általában szórványos szinaptikus bemenetek figyelhetők meg, amelyek serkentő-, illetve gátló posztszinaptikus potenciálokat okoznak. Ezek ugyanakkor kismértékben kontaminálhatják a méréseket, ezért mindezek kiküszöbölésére három neurotransmitter-receptor blokkoló anyagot használtam: AP5-tel az NMDA-, CNQX-szel az AMPA-, bikukullinnal pedig a GABA_A receptorokat blokkoltam, így a neuronokat szinaptikusan teljes mértékben izoláltam egymástól. Az idegsejteket 40-szeres nagyítású vízimmerziós objektívvel, Nikon FN-S2N mikroszkóppal infravörös differenciálkontraszt üzemmódban figyeltem meg, a képet pedig Andor Zyla 5 kamerával rögzítettem. A subiculum piramissejtek ezzel az optikai rendszerrel a szelet felszínétől kb. 120 mikrométer mélységig voltak jól láthatók. A patch-clamp mérésekhez Sutter pipettahúzó segítségével üvegapillárisokból patch üvegelektrodákat készítettem, melyeket intracelluláris oldattal töltöttem meg (ellenállásuk 5-7 $\text{M}\Omega$ volt). Vizsgálataim során minden megszűrt idegsejten két mérési protokollt futtattam, majd az ingerlésekre adott válaszuk alapján a különböző serkenthetőségi és integratív tulajdonságaikat tanulmányoztam. A sikeres

patch-elést követően a sejteket először áramlépcsős (négyzetáram) stimulációnak vetettem alá (áramlépcső hossza: 400 ms, ingerlési frekvencia 0,8 Hz). Ennek során az áramlépcsők erősségét -150 pA-tól +200 pA-ig növeltem, +5 pA inkrementummal. Az áramlépcsős stimulációt követően ugyanazon sejteken dinamikus clamp kísérletet is végeztem, amely során különböző ingerlő mintázatokkal alkalmaztam. A szimulált szinaptikus bemenetek egy serkentő (AMPA-típusú) és egy gátló (GABA-típusú) konduktancia kombinációjaként lettek létrehozva. Az AMPA-bemenet megfordulási potenciálja 0 mV volt, míg a gátló szinaptikus konduktancia megfelelő értéke -80 mV volt. A két szinaptikus konduktancia valós idejű szimulációjához egy-egy preszinaptikus feszültség hullámformát alkalmaztunk, amely tüzelő preszinaptikus neuronok működését modellezte (Szabó et al., 2021). A mérés alatt 3 hullámforma szekvenciát alkalmaztam: (1) négy, időben jól szeparált (szingli) EPSP-t (serkentő posztszinaptikus potenciál), (2) egy 2,5 másodpercig tartó theta-oszcillációt [4 Hz], és (3) egy 2,5 s-os gamma-oszcillációt [20 Hz]. Az egy sweepben lévő összes ingerlés ugyanolyan szinaptikus konduktanciaértéken történt, viszont sweepenként 1,5 nS-szel inkrementáltam a konduktanciát a kezdeti 1,5 értékről a maximális 31,5 nS-ig. A dinamikus clamp kísérletben megfigyelhettem a neuronok különböző ingerlési típusokra adott válaszát, illetve ennek változását a konduktancia növekedésének függvényében.

3.4. Immunhisztokémia

A sejtek post hoc vizualizációját kisebb számú neuronon, azok biocitinnel való jelölésével végeztem. Biocitint tartalmazó intracelluláris oldatot alkalmazva a sejtek megszúrását követően, az elektrofiziológiai mérés közben feltöltődnek, így azok később immunhisztokémiai eljárással láthatóvá tehetők. Az előhíváshoz a jelölt sejteket tartalmazó (illetve kontroll, feltöltött sejteket nem tartalmazó) agyszelet preparátumokat 4%-os (PBS-ben beoldott) PFA-val 1 órán keresztül fixáltam, majd 5x20 percen keresztül 1x-es PBS-sel mostam. Ezt követően a szeleteket 1%-os TritonX100-PBS keverékével egy éjszakán keresztül permeabilizáltam, majd újabb 5x20 perces 1x-es PBS-sel történő mosás következett. A mosás után a preparátumokat 1 órás blokkolást követően (20% BSA; 0,3% TritonX100-PBS; 0,1% NaN₃) streptavidin-TRITC másodlagos ellenanyaggal 3 órán keresztül kezeltem (2% BSA; 0,5% TritonX100; 0,1% NaN₃ jelenlétében). A következő lépésben a szeleteket 5x20 percig PBS-sel mostam, majd desztillált vizes öblítést követően tárgylemezre helyeztem és DAPI-t tartalmazó Mowiol fedőanyaggal fedtem le őket.

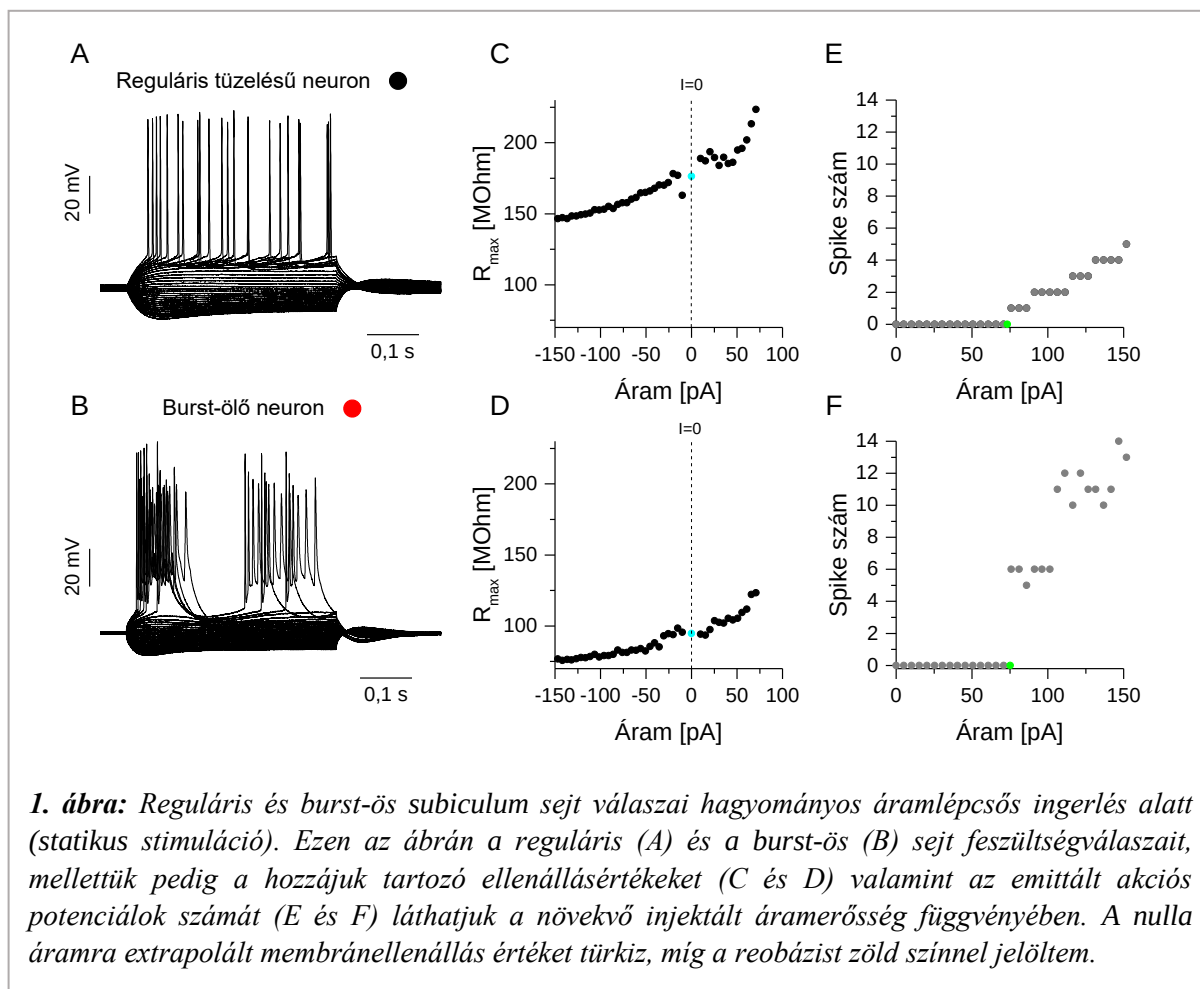
3.5. Adatok kiértékelése

Dolgozatomban összesen 133 subiculum sejt elektrofiziológiai mérése szerepel, ebből 79 reguláris és 54 burst-ös sejt volt. A mérések 18 kísérleti állatból készített akut agyszelet preparátumokon történtek. A nyers mérési fájlok kiértékelését a NeuroExpress program segítségével végeztem, majd a kinyert fiziológiai és serkenthetőségi paramétereket az Origin szoftverrel ábrázoltam. A statikus stimulációra adott feszültségválaszokból számos standard élettani paramétert határoztam meg, ilyenek voltak a nyugalmi membránpotenciál, membránellenállás és –időállandó, a depolarizáló feszültségvisszahajlás (voltage sag) mértéke, reobázis és még sok egyéb. A statikus kumulatív spike szám a 0 és +150 pA intervallumban összesen emittált akciós potenciálok száma volt. A dinamikus clamp mérésben a tüzelési küszöb konduktanciaértékét és a teljes kísérletben (1,5 és 31,5 nS intervallumban) generált akciós potenciálok számát (dinamikus kumulatív spike szám) használtam. Az immunhisztokémiai eljárással jelölt szeletek képeit Zeiss Observer Z1 fluoreszcens mikroszkóppal készítettem és a Zen szoftverrel dolgoztam fel.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Reguláris és burst-ös neuronok jellemzése a subiculumban

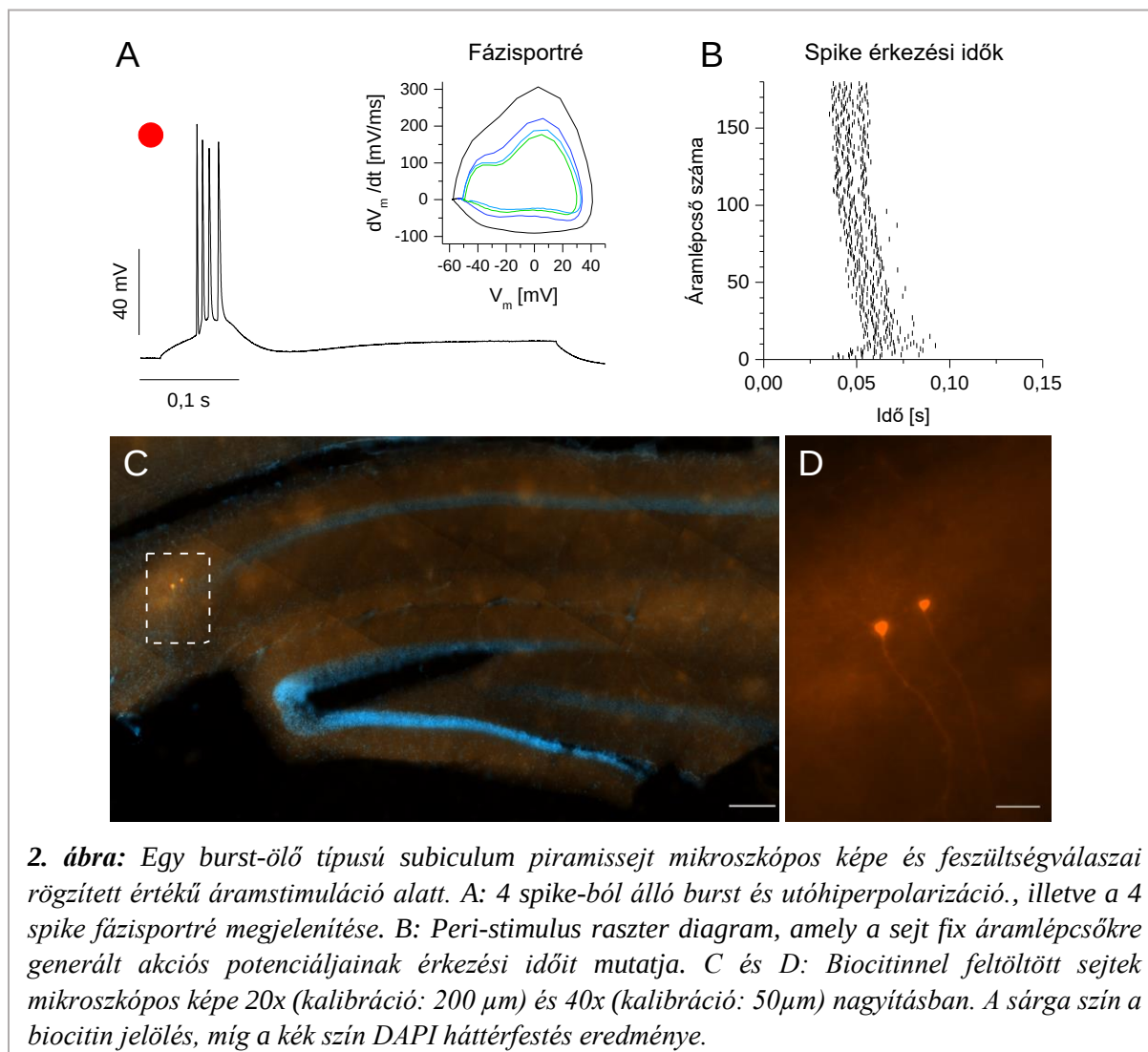
A statikus áramlépcsős stimuláció segítségével a subiculumban sikeresen azonosítottam a két eltérő tüzelést mutató sejttípust, a sejtek tüzelési profilon alapuló kategorizálása ugyanakkor nem minden esetben volt egyértelmű. Akadtak átmeneti, ún. gyengén burst-ölő sejtek, melyek egyszerre mutatnak burst-ös és reguláris jegyeket (a sejtek analízisének ezen átmeneti típusokat a burst-ös kategóriába soroltam). Az említett fiziológiai típusok tehát nem teljesen fix, élesen elkülönülő kategóriák, ugyanis a reguláris és burst-ös viselkedés között meglehetősen folyamatos az átmenet. A megszűrt sejteken egy önkényesen kiválasztott áramerősség helyett több áramértéken (-150 pA-tól +200 pA-ig, 5 pA-enként inkrementálva) is megmértem a sejtek válaszait, így a különböző membránparaméterek áramfüggését is megfigyelhettem (1. ábra).



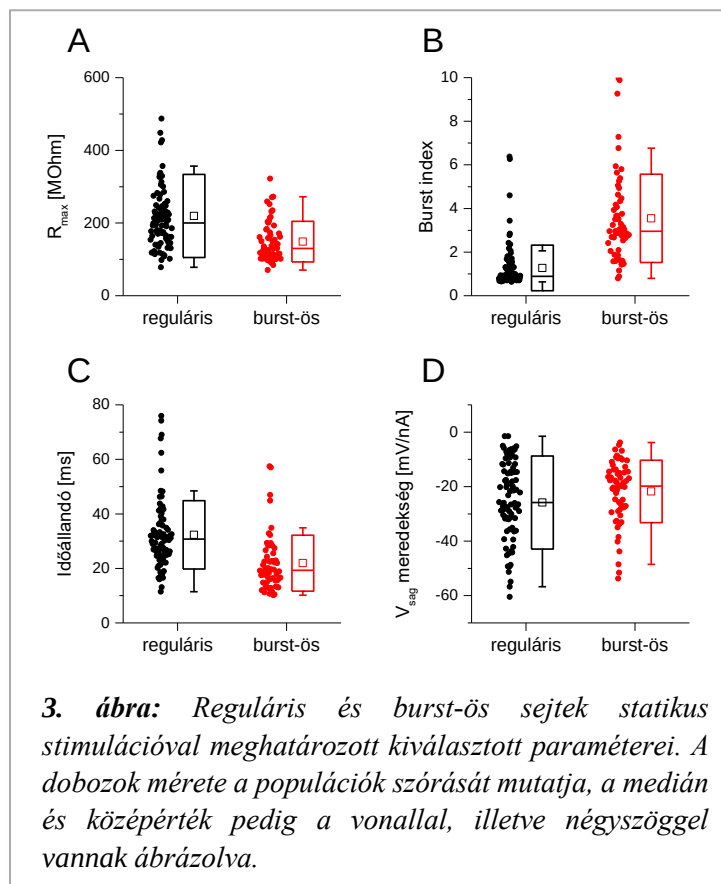
A mérés alatt kiderült, hogy mind a burst-ös, mind pedig a reguláris neuronok jellegzetes tüzelési mintázatot produkáltak, amely csak kismértékben függött az ingerlési áram szintjétől. Az 1. ábrán egy reguláris és egy burst-ös sejt áramlépcsős válaszait láthatjuk. A tüzelési profilok összehasonlítása során megfigyelhetjük, hogy a reguláris neuronok különálló, egymástól többnyire szabályos távolságra elhelyezkedő akciós potenciálok generálnak, melyek amplitúdója közel azonos. Ugyanakkor enyhe spike frekvencia adaptációt is megfigyelhetünk, tehát a spike-ok között eltelt idő nő az áramlépcső során. Ezzel szemben a burst-ös neuronok akciós potenciáljai csomagokba rendeződnek, ahol a csomagokon belül a spike-ok amplitúdója rendre csökken, de a burst végén ismét nagyobb spike-ok fordulnak elő. A burst alatt feltűnő depolarizációs potenciáldomb látható, erre épülnek az akciós potenciálok. Ezt úgy interpretálhatjuk, hogy itt egy feszültségfüggő Ca^{2+} -áram aktivációja történik, amely gyorsan ismétlődő Na^{+} -spike-okat okoz (1A és 1B panel). Megemlítendő ugyanakkor, hogy a burst-ös sejtek magasabb áramerősségek esetén gyakran a reguláris tüzelésű neuronok válaszához hasonló kimenetet produkáltak, így a feltűnő burst-ök inkább a reobázishoz közeli áramértékeknél voltak jellemzők. Láthatjuk, hogy a két sejt ellenállása jelentősen eltért: a

reguláris sejt esetében jóval nagyobb ellenállást mérhettünk a burst-ös sejthez képest (1C és 1D panel). Mindkét sejtben a membránellenállás értékek enyhén növekednek, amint az injektált áram értéke egyre pozitívabb lesz. Ezt a sejtekben kifejeződő HCN csatornák által mediált h-áramok okozzák, amelyek feltűnő feszültség visszahajlást is okoznak (voltage sag) (Maroso et al., 2016; Surges et al., 2004; Wahl-Schott & Biel, 2009). Az input-output grafikonon szintén megfigyelhetjük a tüzelési mintázatban lévő különbséget: a reguláris tüzelés esetében az akciós potenciálok száma az ingerlés erősségével folyamatosan nő, míg burst-ös tüzeléskor a spike-ok száma a csomagokban lévő több akciós potenciál miatt ugrásszerűen növekszik, kevésbé monoton módon (1E és 1F panel). A subiculum sejtek kategorizálásánál a tüzelési profilok alapján történő osztályozás mellett hasznos lehet a sejtek morfológiai összehasonlítása is, amit legegyszerűbben a sejtek biocitinnel való feltöltésével lehet megtenni. Az 2. ábrán egy biocitinnel megjelölt burst-ös sejtet láthatunk, amint depolarizáló négyszögáram hatására egy erős, jól kifejezett burst-öt generál (2A panel). Ennél a sejtnél a tüzelési kimenetet hosszabb ideig vizsgáltam rögzített áramértéknél (+120 pA) és megállapítottam, hogy a sejt burst-ölése kisebb ingadozástól eltekintve meglepően stabil volt a regisztrálás 6 perce alatt (2B panel). Az akciós potenciálokat fázisportré ábrán is megvizsgáltam, amely a membránpotenciál első időbeli deriváltját, a spike meredekségét mutatja a membránpotenciál függvényében (2A panel, Fázisportré). Itt a spike-ok feltűnő hurkokat rajzolnak ki, amelyek alakjának elemzése sokat elárul az azokat létrehozó biofizikai folyamatokról (Bean, 2007). A fázisportré megmutatja a burst alatt emittált spike-ok amplitúdójának fokozatos csökkenését és lelassulását. Emellett gyakran észleltem a felfutó élen jelentkező behajlást („kink” jelenség), amely szerint a subiculum neuronok többségében az axonális és a szomatikus Na^+ -spike-ok időben enyhén elcsúszva jönnek létre. Az elektrofiziológiai mérések mellett a sejtek morfológiáját is megvizsgálhatjuk, melynek előkísérleteit már elvégeztem és a továbbiakban szeretném folytatni. A 2C és 2D panelen a regisztrátumhoz tartozó sejt mikroszkópos képe látható, 20-szoros és 40-szeres nagyításban. Az intracelluláris oldathoz hozzáadott biocitin megfelelően

megjelölte a megszárt sejtet, amely morfológiailag hasonló a hippocampusban található piramissejtekhez.



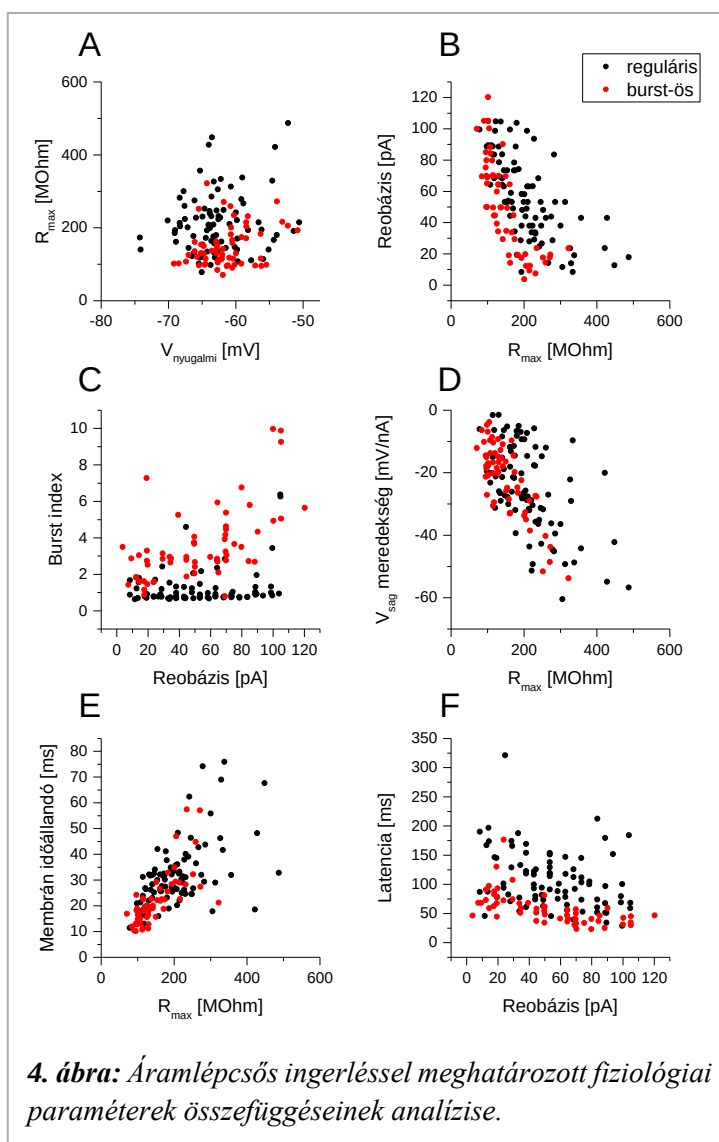
4.2. Aktív és passzív membrántulajdonságok vizsgálata és összehasonlítása reguláris és burst-ös sejtek esetében



A két sejtípus áramlépcsős ingerléséből származó adatokat összevetve arra a megállapításra jutottam, hogy a reguláris és burst-ös neuronok alapvető fiziológiai paramétereit szignifikánsan nem térnek el egymástól, azonban néhány biofizikai tulajdonságukban mégis különböznek (3. ábra). A grafikonokon eltérő színekkel mutatom be a reguláris és burst-ös sejtek a paramétereit. A színezés manuális felcímkézés eredménye, amelyet a feszültségválaszok szemrevételezésével előzetesen állapítottam meg. A sejtek ellenállása és időállandója, valamint

interspike intervallumaik alapján meghatározott burst indexük (burstiness) tekintetében jelentős különbségeket találtam. A reguláris sejteknél magasabb ellenállást és nagyobb időállandót tapasztaltam (3A és 3C panel), azonban a burst-ös sejtek által produkált feszültség visszahajlás (voltage sag) meredeksége, valamint burst indexük egyaránt nagyobb volt a reguláris sejtekhez képest (3D és 3B panel). A voltage sag vs. áramerősség reláció kitűnően jellemzi a sejtekben kifejeződő h-áramok hatását (Hernáth et al., 2019; Rátkai et al., 2021). Ennek a lineáris összefüggésnek a meredeksége csak kis mértékben tért el a két sejtípus között, azonban a burst index az akciós potenciál csomagokban lévő spike-ok időbeli közelsége miatt jóval nagyobb volt a burst-ös sejteknél. Ezt követően az általam azonosított sejtípusok statikus módszerrel mért paramétereinek korrelációit vizsgáltam (4. ábra). Az első esetben az ellenállás és a nyugalmi membránpotenciál közötti kapcsolatot vizsgáltam (4A panel), ahol szoros

összefüggést nem találtam, viszont a grafikonon jól látszik, hogy a két sejttípus hasonló átlagos nyugalmi membránpotenciál mellett eltérő ellenállással rendelkezik. A második esetben az áramerősségek meghatározott tüzelési küszöb (reobázis), illetve az ellenállás viszonyát ábrázoltam (4B panel), amely során mindkét sejttípus esetében egyértelmű negatív korrelációt találtam a két paraméter között: az ellenállás növekedésével a sejtek reobázisa csökkent, tehát a sejtek serkenthetősége az ellenállással arányosan nőtt. A harmadik esetben a burst indexet és a reobázist vettem össze (4C panel), amely során azt láttam, hogy a burst-ös sejteknél a burst index növekedésével magasabb reobázis

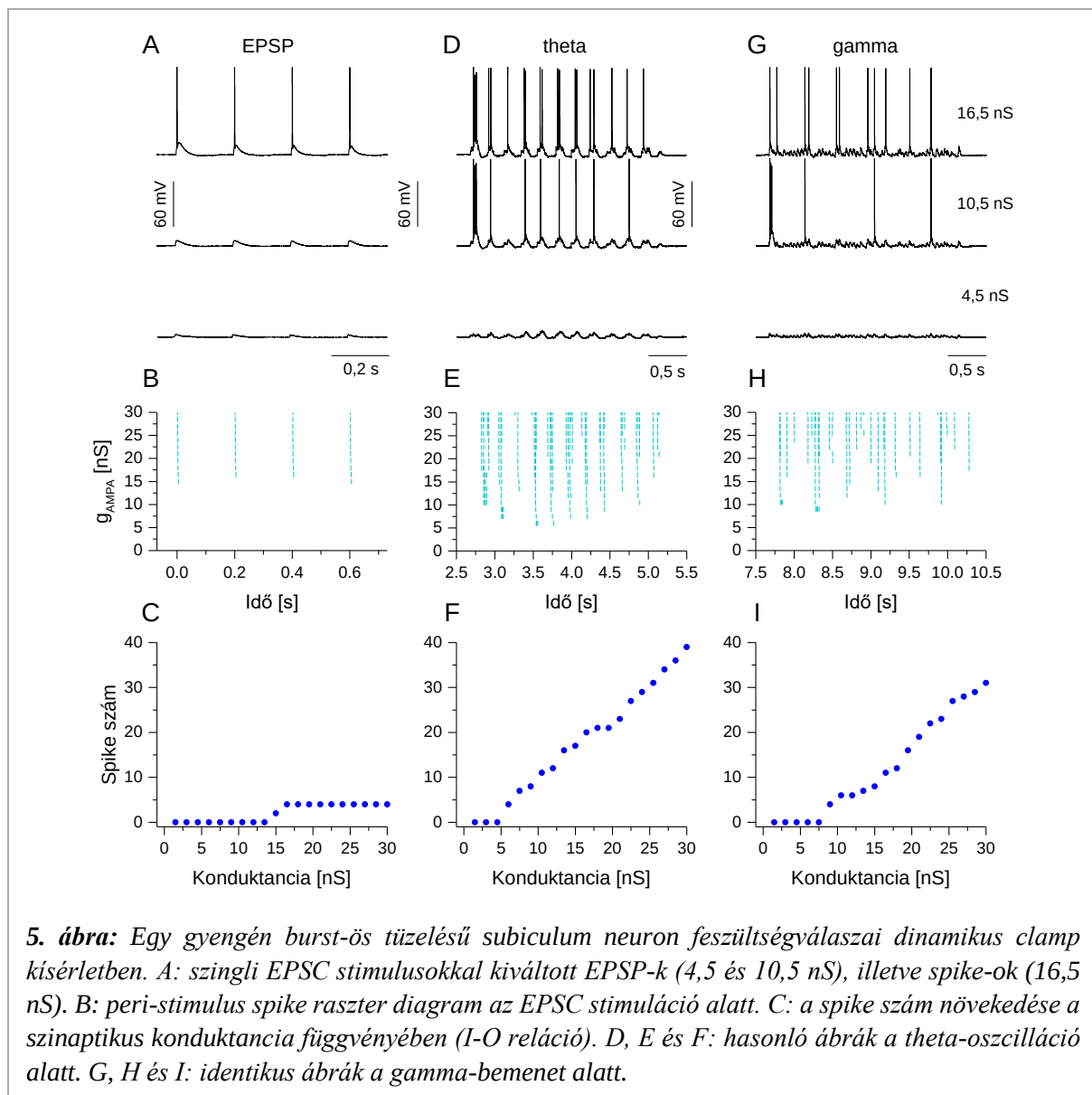


értékek fordultak elő, míg a reguláris sejtek burst indexe közel azonos volt – lényegesen a burst-ölő neuronok értékei alatt, viszont változatos reobázis értékek fordultak elő. A negyedik összehasonlítás során az ellenállás és a voltage sag meredekségének kapcsolatát vizsgáltam (4D panel). Itt a reguláris és burst-ös sejteknél hasonló összefüggést tapasztaltam: a sejtek ellenállásának növekedésével a voltage sag meredeksége is csökkent. Ezt követően a membrán időállandó és az ellenállás paramétereit ábrázoltam, ahol mindkét sejttípus esetében egy gyenge pozitív összefüggést állapíthatunk meg: a nagyobb ellenállású sejtek membrán időállandója nagyobb volt, tehát az általam injektált áramokra lassabban reagáltak. Végül a sejtek reobázisának és latenciájának összefüggését vizsgáltam, amely során a két paraméter között mind a reguláris mind pedig a burst-ös sejteknél egyértelmű negatív korrelációt állapíthattam meg. Jól látszik, hogy az alacsonyabb reobázissal rendelkező (nagyobb serkentetőségű) sejtek latenciája (az áramlépcsőre adott első akciós potenciál ideje a lépcső felfutó éléhez viszonyítva) kisebb volt, illetve a burst-ös sejtek sokkal kisebb latenciával

rendelkeztek a reguláris sejtekhez képest. Feltűnő, hogy több paraméter korrelációinak összehasonlításakor a reguláris és burst-ös sejtek szépen elkülönülő populációkba rendeződnek. Ez annak tekintetében is figyelemreméltó, hogy az egyszerű statisztikai összehasonlítás (3. ábra) gyakran nem mutat ki különbségeket a sejttypusok között. Eszerint a korrelatív elemzés igazolja a többtényezős statisztikai elemzés (klaszterezés, főkomponens analízis) létjogosultságát (Hernáth et al., 2019), amelyet további munkánkban tervezünk végrehajtani.

4.3. Reguláris és burst-ös sejtek tüzelési válaszainak összehasonlítása

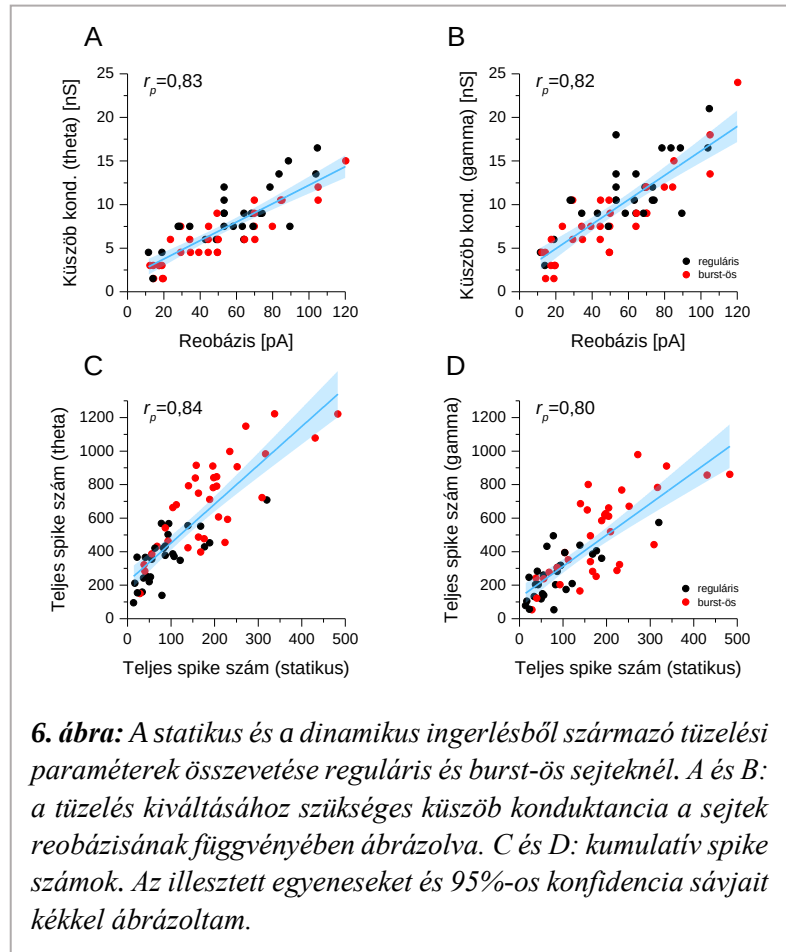
A reguláris és burst-ös sejtek statikus ingerlését követően ugyanazon sejteket dinamikus ingerlésnek vetettem alá, amely során különböző frekvenciájú és mintázatú, számítógéppel szintetizált, szimulált szinaptikus áramokat injektáltam a neuronokba. Ez a stimuláció annyiban hasonlít az áramlépcsős protokollhoz, hogy a szintetikus szinaptikus bemenetek erősségét az egymás utáni ingerlési ciklusokban folyamatosan növeltem. Ez a protokoll tehát egyfajta input-output reláció meghatározását teszi lehetővé, hasonlóan ahhoz, amit a statikus kísérletekben tettem (1. ábra, E és F panel). Az 5. ábrán egy gyengén burst-ölő sejt dinamikus clamp méréséből származó felvételeket és grafikonokat láthatunk. A legfelső panel (5A, 5D, 5G) az általam vizsgált bemenetekre (EPSP, theta és gamma ritmus) adott feszültségválaszokat tartalmazzák a mérés három különböző időpontjában (három különböző konduktanciaértéken, jobboldalt feltüntetve). A membránpotenciál válaszok alatt az egyes bemenetekhez tartozó akciós potenciálok időbeliségét láthatjuk az ingerlések során alkalmazott konduktanciaértékek függvényében (5B, 5E, 5H panel, spike raszter diagramok). Az akciós potenciálok száma fokozatosan nő a szimulált szinaptikus bemenet erősödésével, viszont a spike-ok jól definiált időablakokban érkeznek (spike események) (Szücs et al., 2010). Az időablakok egyfajta vonalkódos megjelenítésre is lehetőséget adnak (lásd alább). A legalsó paneleken (5C, 5F, 5I) végül a dinamikus ingerlésekből eredő input-output görbéket láthatjuk. A dinamikus stimuláció során mért tüzelési válaszok alapján elmondható, hogy a subiculum sejtek ugyanazon konduktanciaértékű ingerlési bemenetek közül a theta ritmusra reagáltak leginkább. Kísérleteimben a theta- és gamma-bemenetek alatt leadott serkentő és gátló szinaptikus áram nettó eredője megegyezett, csak a szimulált szinaptikus oszcillációk frekvenciája különbözött. Ezek alapján a theta és gamma bemenetek alatt kapott spike-ok száma hasonló lehetett volna, viszont a subiculum sejtek mégis preferenciát mutattak a theta ritmusra. Mindez nem meglepő, hiszen korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy a theta ritmusnak kiemelt szerepe van a különböző memória és tanulási folyamatok normál működésében (Buzsáki & Moser, 2013).



Másrésről az általam vizsgált piramissejtek intrinsic tulajdonságai és membrán időállandója miatt kevésbé tudnak a gyors gamma-frekvenciákra reagálni, mint pl. az interneuronok (Campanac et al., 2013).

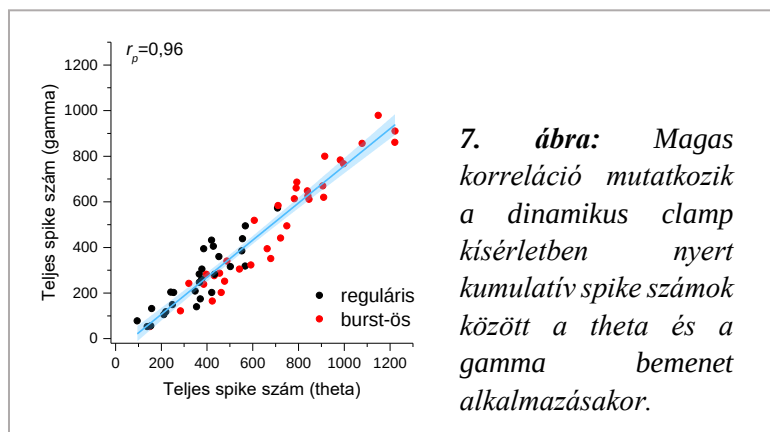
Legutolsó vizsgálatom során a statikus és dinamikus módszerekkel mért serkenthetőségi paraméterek összehasonlítását végeztem el (6. ábra). A felső két grafikonon (6A és 6B panel) a sejtek theta- és gamma oszcillációnál megfigyelt tüzelési küszöbértékei, illetve áramlépcsővel meghatározott reobázis értékeinek kapcsolata látható, valamint alattuk (6C és 6D panel) a dinamikus theta és gamma oszcillációk, illetve a statikus áramlépcsők alatt generált kumulatív spike szám relációi találhatók.

A dinamikus serkenthetőség és a statikus reobázis összefüggése mind a reguláris, mind a burst-ös sejtek esetében pozitív: a pontokra regressziós egyenest illesztve megtudhatjuk annak meredekségét, illetve Pearson-féle korrelációs indexét, ezek az értékek a grafikonokon is szerepelnek (r_p). A tüzelési küszöbhez tartozó konduktancia- és reobázis értékek összehasonlításánál azt találtam, hogy a gamma oszcillációhoz képest a theta ritmusnál tapasztalt összefüggés meredeksége alacsonyabb (6A vs. 6B),



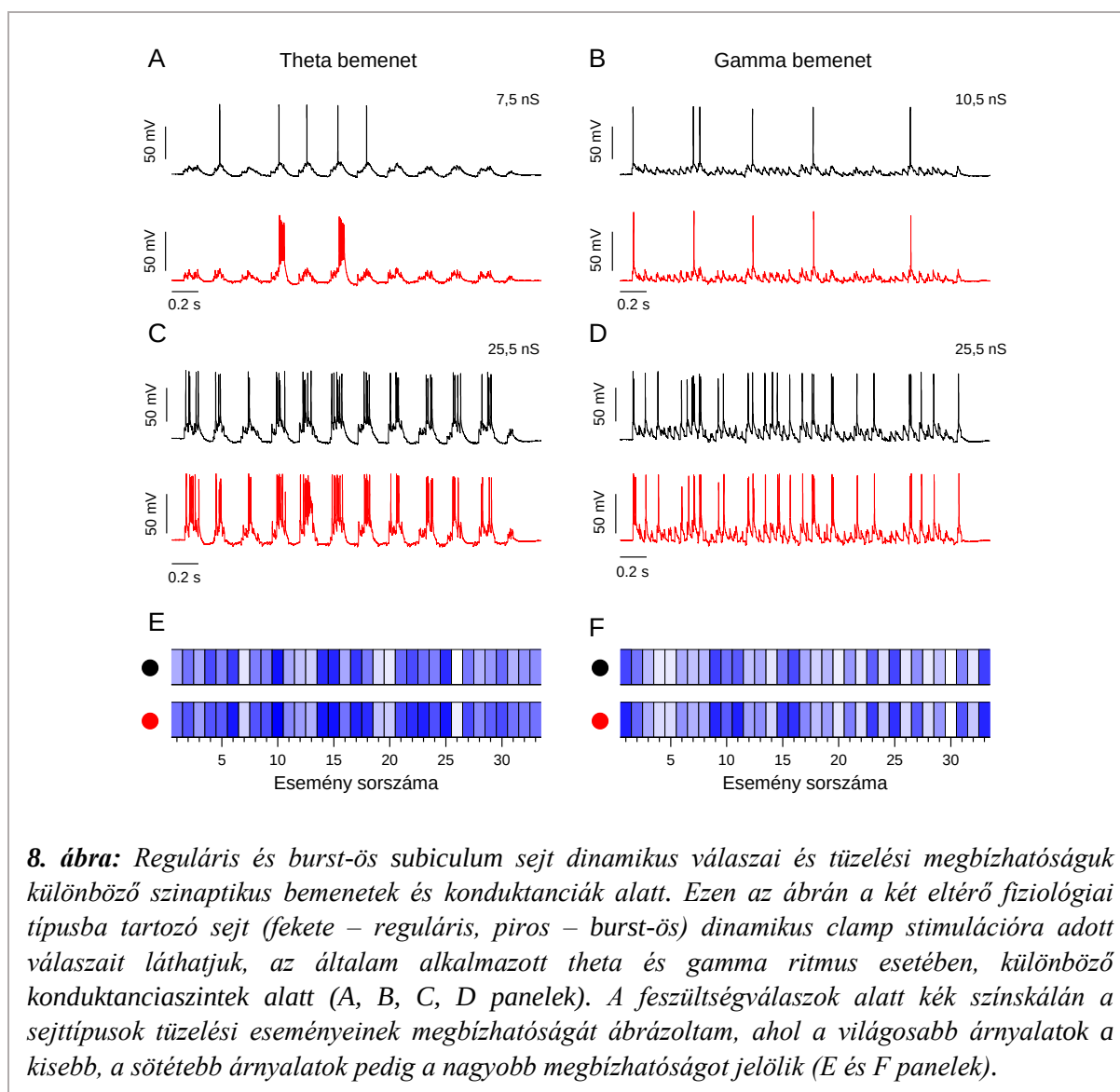
ugyanazon reobázishoz kisebb konduktanciaküszöb társult, tehát a sejtek a theta ritmusra nézve serkenthetőbbnek bizonyultak. A kumulatív spike számoknál is eltérést láthatunk a regressziós egyenesek meredekségében, ami ismét a theta bemenetre adott erőteljesebb tüzelést igazolja (6C vs. 6D). A dinamikus és statikus módszerrel mért paramétereket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a sejtek statikus és dinamikus ingerlése során mért serkenthetőségi változók jól korrelálnak egymással, amely azt mutatja, hogy a neuronok dinamikus bemenetekre adott válaszainak egyes paraméterei viszonylag jól megjósolhatók az áramlépcsős válaszaik alapján. Ezeket az észleléseinket a korábbi sejtenyészetes adatainkkal összevetve megállapíthatjuk, hogy itt a statikus vs. dinamikus serkenthetőségi mutatók között kifejezettebb összefüggést találunk (Szabó et al., 2021). Ennek egyik oka az lehet, hogy a subiculum piramissejtek alacsonyabb fiziológiai diverzitással rendelkeznek, mint a fejlődésben lévő hippocampális sejtenyészetek neuronjai. Mindemellett célszerű megvizsgálnunk, hogy a kétféle dinamikus stimuláció kumulatív spike adatai hogyan korrelálnak. Ahogy a 7. ábra mutatja, itt sokkal élesebb korrelációt észleltünk a dinamikus serkenthetőségi paraméterek között, ahol mind a burst-ös, mind pedig a reguláris sejtek esetében lineáris összefüggést láthattunk a theta és gamma ritmusra adott kumulatív spike számoknál (7. ábra, $r_p=0,96$). Ez

azt jelenti, hogy a dinamikus válaszok sokkal jobban prediktálhatók egymás alapján, mint a statikus stimulációkból.



Mindemellett azt is megfigyelhettem, hogy a burst-ös sejtek tüzelési mintázata a fluktuáló dinamikus bemenetek alatt jelentősen eltérhet a négyszögáram alatt produkált viselkedésüktől. Gyakran a jellegzetes burst-ök is elmaradnak a neuronok tüzelési

válaszaiban. Ez utóbbi jelenség különösen akkor mutatkozik meg markánsan, amikor a szinaptikus bemenetek erősek, és intenzív tüzelést váltanak ki a sejtekben. Ilyenkor a sejtek burst-ös jellegüket elveszthetik és a reguláris sejtekre jellemző akciós potenciál mintázatot generálhatnak. Mindezt a 8. ábrán láthatjuk, amely egy reguláris (fekete színnel) és burst-ös (piros színnel) sejt dinamikus clamp-pel történt stimulációját ábrázolja. A sejtek válaszát theta és gamma bemenetnél vizsgáltam a tüzelési küszöb közeli (7,5 és 10,5 nS), illetve magasabb konduktanciákon (25,5 nS) és azt találtam, hogy a két sejtípus válasza a különböző bemenetek alatt csak a kisebb ingerlési frekvencia esetében (4 Hz-es theta oszcilláció), a tüzelési küszöbhez közeli, alacsonyabb konduktanciaértékeken tért el markánsan. Az ingerlési frekvencia növekedésével (20 Hz-es gamma oszcilláció), illetve a konduktancia növelésével tehát a korábban eltérő tüzelési dinamikájú sejtek tüzelési kimenetei hasonlóvá váltak. A dinamikus stimulációra adott feszültségválaszok alatt a reguláris és burst-ös sejtekre vonatkozó tüzelési események megbízhatósági vektorai láthatók az általam alkalmazott theta és gamma frekvencia alatt. Ezek lényegében „vonalkódos” reprezentációi a dinamikus clamp stimuláció alatt észlelt spike-ok gyakoriságának, tehát, hogy milyen valószínűséggel fordulnak elő akciós potenciálok a stimulus meghatározott időpontjaiban (a világos színek a kisebb valószínűségű spike-okat jelölik, a sötétek a gyakoriakat). Ez az analízis megmutatta, hogy a reguláris és burst-ös sejtek mindkét bemenet esetében hasonló időpontokban tüzeltek, viszont ahogy láthatjuk, a



8. ábra: *Reguláris és burst-ös subiculum sejt dinamikus válaszai és tüzelési megbízhatóságuk különböző szinaptikus bemenetek és konduktanciák alatt. Ezen az ábrán a két eltérő fiziológiai típusba tartozó sejt (fekete – reguláris, piros – burst-ös) dinamikus clamp stimulációra adott válaszait láthatjuk, az általam alkalmazott theta és gamma ritmus esetében, különböző konduktanciaszintek alatt (A, B, C, D panelek). A feszültségválaszok alatt kék színskálán a sejt típusok tüzelési eseményeinek megbízhatóságát ábrázoltam, ahol a világosabb árnyalatok a kisebb, a sötétebb árnyalatok pedig a nagyobb megbízhatóságot jelölik (E és F panelek).*

burst-ös sejtek több akciós potenciált generálnak, tehát intenzívebb tüzelést mutatnak ugyanazon bemenetre (átlagosan sötétebb színek jelentkeznek a vonalkódban).

Összegzésképpen elmondható, hogy elektrofiziológiai kísérleteim során részletesen jellemeztem a subiculum piramissejtek különböző élettani és integratív tulajdonságait. A burst-ölő illetve reguláris sejtek működése markánsan eltérő volt a tüzelési küszöbhez közeli erősségű bemenetek alatt, viszont intenzívebb stimuláció során azok válaszai sok szempontból kiegyenlítettebbek lettek. Ehhez hasonló megfigyelések születtek thalamokortikális neuronokon, ahol a kutatók hagyományosabb stimulációval, lassan emelkedő áram rámpák, illetve áramzaj alkalmazása mellett figyelték a sejtek tónusos és burst-ös viselkedésének változását (Iavarone et al., 2019). A mi kísérleti megközelítésünk jobban reprezentálja az agyi áramkörökben előforduló ritmusokat, szinaptikus bemeneteket és aktivitásmintázatokat. Mindezek fényében megállapíthatjuk, hogy a burst-ölő és regulárisan tüzelő sejtek enyhe

intenzitású, alacsony frekvenciájú szinaptikus bemenetek mellett eltérő jelfeldolgozási tulajdonságokkal rendelkeznek, míg erős intenzitású, magasabb frekvenciájú bemenetek alatt viselkedésük hasonlóná válik. Méréseim tehát megmutatták a korszerű dinamikus clamp technika alkalmazásának újabb lehetőségeit a komplex idegrendszeri integratív folyamatok megértésében.

Összefoglaló

A subiculum a hippocampális formáció részét alkotó struktúra, amely elengedhetetlen szerepet játszik a hippocampusból érkező idegi jelek feldolgozásában és a különböző kortikális-szubkortikális agyterületekre való továbbításában. A subiculum principális neuronjai, a piramissejtek tüzelési profiljuk alapján két kategóriába sorolhatók: reguláris, illetve burst-ös típusokba. Ezen sejtek szerepe a neuronális információfeldolgozásban még nem eléggé feltárt. Az eddigi vizsgálatokban a kutatók többnyire hagyományos elektrofiziológiai módszereket alkalmaztak a subiculum sejtek elemzésére. Munkacsoportunk ugyanakkor hagyományos és újszerű, innovatív módszereket (dinamikus clamp) együttesen alkalmazva igyekszik feltárni a subiculum neuronjainak integratív tulajdonságait. Jelen kísérleteinket egerekből készített akut agyszeleteken, egészsejt patch-clamp technikával végeztük, amelyek során hagyományos áramlépcsőket és szimulált szinaptikus áramokat is injektáltunk a sejtekbe. A dinamikus stimuláció során szimulált theta- és gamma-oszcillációkat váltottunk ki az idegsejtekben. A statikus vs. dinamikus stimuláció igazolta a neuronális serkenthetőség differenciális szabályozását. A reguláris, illetve burst-ös neuronok tüzelési válaszai a stimuláció erősségétől függő mértékben tértek el egymástól. Eredményeink korábbi, sejtenyíratokon mért adatainkat is megerősítik és további segítségül szolgálnak a neuronokban működő ionáramok szinaptikus integrációt szabályozó hatásainak jobb megértéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Ezúttal szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Szűcs Attilának és Dr. Varró Petrának végtelen türelmükért, támogatásukért és áldozatos munkájukért, amely nélkül jelen TDK dolgozatom nem készülhetett volna el. Szakértelmükre, kedves és motiváló szavaikra mindig támaszkodhattam.

Továbbá szeretném megköszönni az Idegi Sejtbiológia, illetve Ex vivo Elektrofiziológiai Kutatócsoport összes tagjának, hogy biztató szavaikkal, segítőkész hozzáállásukkal elősegítették és gördülékennyé tették mindennapos munkámat.

5. Irodalomjegyzék

- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451–465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>
- Böhm, C., Peng, Y., Geiger, J. R. P., & Schmitz, D. (2018). Routes to, from and within the subiculum. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 373, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2848-4>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. In *Nature Neuroscience* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrn.3304>
- Campanac, E., Gasselin, C., Baude, A., Rama, S., Ankri, N., & Debanne, D. (2013). Enhanced Intrinsic Excitability in Basket Cells Maintains Excitatory-Inhibitory Balance in Hippocampal Circuits. *Neuron*, 77(4), 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.020>
- Destexhe, A., Rudolph, M., & Paré, D. (2003). The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(9). <https://doi.org/10.1038/nrn1198>
- Halabisky, B., Shen, F., Huguenard, J. R., & Prince, D. A. (2006). Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 96(2). <https://doi.org/10.1152/jn.01079.2005>
- Hernáth, F., Schlett, K., & Szücs, A. (2019). Alternative classifications of neurons based on physiological properties and synaptic responses, a computational study. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49197-8>
- Iavarone, E., Yi, J., Shi, Y., Zandt, B.-J., O'Reilly, C., van Geit, W., Rössert, C., Markram, H., & Hill, S. L. (2019). Experimentally-constrained biophysical models of tonic and burst firing modes in thalamocortical neurons. *PLOS Computational Biology*, 15(5), e1006753. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006753>
- Joksimovic, S. M., Eggan, P., Izumi, Y., Joksimovic, S. L., Tesic, V., Dietz, R. M., Orfila, J. E., DiGrucio, M. R., Herson, P. S., Jevtovic-Todorovic, V., Zorumski, C. F., & Todorovic, S. M. (2017). The role of T-type calcium channels in the subiculum: to burst or not to burst? *Journal of Physiology*, 595(19). <https://doi.org/10.1113/JP274565>

- Maroso, M., Szabo, G. G., Kim, H. K., Alexander, A., Bui, A. D., Lee, S.-H., Lutz, B., & Soltesz, I. (2016). Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron*, 89(5), 1059–1073. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.023>
- Matsumoto, N., Kitanishi, T., & Mizuseki, K. (2019). The subiculum: Unique hippocampal hub and more. In *Neuroscience Research* (Vol. 143). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.002>
- Potvin, O., Doré, F. Y., & Goulet, S. (2007). Contributions of the dorsal hippocampus and the dorsal subiculum to processing of idiothetic information and spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.01.002>
- Potvin, O., Lemay, F., Dion, M., Corrado, G., Doré, F. Y., & Goulet, S. (2010). Contribution of the dorsal subiculum to memory for temporal order and novelty detection using objects, odors, or spatial locations in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(3), 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.11.007>
- Prinz, A. A., Abbott, L. F., & Marder, E. (2004). The dynamic clamp comes of age. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 27, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.02.004>
- Rátkai, A., Tárnok, K., Aouad, H. el, Micska, B., Schlett, K., & Szücs, A. (2021). Homeostatic plasticity and burst activity are mediated by hyperpolarization-activated cation currents and T-type calcium channels in neuronal cultures. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82775-3>
- Surges, R., Freiman, T. M., & Feuerstein, T. J. (2004). Input resistance is voltage dependent due to activation of Ih channels in rat CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience Research*, 76(4), 475–480. <https://doi.org/10.1002/jnr.20075>
- Szabó, A., Schlett, K., & Szücs, A. (2021). Conventional measures of intrinsic excitability are poor estimators of neuronal activity under realistic synaptic inputs. *PLoS Computational Biology*, 17(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009378>
- Szücs, A., Berton, F., Nowotny, T., Sanna, P., & Francesconi, W. (2010). Consistency and diversity of spike dynamics in the neurons of bed nucleus of stria terminalis of the rat: A dynamic clamp study. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011920>
- van Aerde, K. I., & Feldmeyer, D. (2015). Morphological and physiological characterization of pyramidal neuron subtypes in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 25(3). <https://doi.org/10.1093/cercor/bht278>

- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), 470–494. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8525-0>
- Wheeler, D. W., White, C. M., Rees, C. L., Komendantov, A. O., Hamilton, D. J., & Ascoli, G. A. (2015). Hippocampome.org: A knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *ELife*, 4(September2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.09960>

Szerzői Hozzájárulás

- Az *ex vivo* agyszelet technika elsajátításában témavezetőm, Dr. Varró Petra segített, a kísérletekhez felhasznált állatok (18) műtéteit, az akut agyszeletek elkészítését és fenntartását laboratóriumi asszisztens közreműködésével, magam végeztem.
- Dolgozatomban összesen 133 (79 reguláris, 54 burst-ölő) subiculum sejt elektrofiziológiai méréséből kinyert adatait elemeztem, minden sejtet önállóan mértem.
- Az agyszelet preparátumok festését, a biocitinnel jelölt sejtek azonosítását Dr. Rátkai Erika Anikó tudományos munkatársunk segítségével végeztem.
- Az áramlépcsős (133 db) és dinamikus clamp (71 db) mérésekből származó nyers fájlokat a NeuroExpress program segítségével magam korrigáltam.
- A statikus és dinamikus módszerekkel meghatározott paraméterek vizsgálatához a korrigált mérési fájlokból kinyert adatokat témavezetőm, Dr. Szűcs Attila segítségével, az Origin szoftverrel ábrázoltam.

Az elkészült grafikonok elemzésével a subiculumon belül sikeresen azonosítottam a két eltérő tüzelésű principális sejtípust, összehasonlítottam azok legfontosabb élettani tulajdonságait, valamint korrelatív analízissel megállapítottam a biofizikai paramétereik között lévő jellegzetes különbségeket.