

# **A mediális és laterális entorhinális kérgi gyrus dentatusba projiciáló reelin pozitív sejtek elektrofiziológiai összehasonlítása**

**Készítette: Kolozsvári Áron Olivér**

Biológus MSc hallgató

Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar

37. OTDK, Biológia Szekció

Témavezető: Dr. Varga Csaba

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani  
Intézet



Pécs, 2024

## Tartalomjegyzék

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>I. Bevezetés</b>                                                            | 3  |
| <b>I.1 Az entorhinális kéreg és kapcsolati rendszere</b>                       | 4  |
| <b>I.2 Az entorhinális kéreg, mint a hippocampus információs kapuja</b>        | 5  |
| <b>I.3 A mediális entorhinális kéreg</b>                                       | 6  |
| <b>I.4 A laterális entorhinális kéreg</b>                                      | 7  |
| <b>I.5 A második rétegi sejtek</b>                                             | 7  |
| <b>II. Célkitűzések</b>                                                        | 8  |
| <b>III. Anyag és módszer</b>                                                   | 8  |
| <b>III.1 Agyszeletek preparálása</b>                                           | 8  |
| <b>III.2 In vitro elektrofiziológiai kísérletek</b>                            | 9  |
| <b>III.3 Immunhisztokémia, konfokális mikroszkópia</b>                         | 11 |
| <b>III.4 Statisztikai kiértékelés</b>                                          | 12 |
| <b>IV. Eredmények</b>                                                          | 13 |
| <b>IV.1 Egér elvezetések</b>                                                   | 13 |
| <b>IV.2 CsCl intracelluláris oldattal történő elvezetés</b>                    | 13 |
| <b>IV.3 Stellate sejtek közötti különbségek a két intracelluláris oldattal</b> | 14 |
| <b>IV.4 Patkány elvezetések</b>                                                | 15 |
| <b>V. Eredmények megvitatása</b>                                               | 16 |
| <b>V.1 Egér elvezetések</b>                                                    | 16 |
| <b>V.2 CsCl intracelluláris oldattal történő elvezetés</b>                     | 18 |
| <b>V.3 Stellate sejtek közötti különbség a két intracelluláris oldattal</b>    | 18 |
| <b>V.4 Patkány elvezetések</b>                                                 | 19 |
| <b>VI. Összegzés</b>                                                           | 20 |
| <b>VII. Irodalom jegyzék</b>                                                   | 21 |
| <b>VIII. Köszönetnyilvánítás</b>                                               | 25 |

## I. Bevezetés

A hippocampus az egyik leggyakrabban kutatott agyterület az egész világon. Már az 1960-as években rájöttek arra, hogy ennek az agyterületnek fontos szerepe van a memória kialakításában. Az egyik legismertebb kutatás egy bizonyos H.M. betegen történt, akin nagymértékű bilaterális temporális lebenyírtást hajtottak végre, érintve ezzel a hippocampust és az entorhinális kérget is. A páciens a műtét után súlyos, szelektív anterográd memóriavesztésben szenvedett: a műtét előtt megtanultakra, átélt dolgokra emlékezett, azonban a műtét után új dolgokat nem tudott megtanulni vagy nem emlékezett arra, hogy már csinálta volna az adott feladatot. A beteg halála után a teljes agyat lemetszették és kiderült, hogy a hippocampus anterior része valójában intakt maradt a műtét során, azonban az entorhinális kéreg teljes mértékben eltávolításra került. Ez rámutat arra a tényre, hogy mennyire fontos szerepe van az entorhinális kéregnek a hippocampális memóriakonszolidáció kialakításában (Annese et al., 2014; Corkin et al., 1997).

Számos betegségben nyomon lehet követni azt, hogy mennyire fontos szerepe van az entorhinális kéregnek, ilyen betegség például az egész világon egyre nagyobb problémát jelentő időskori neurodegeneratív megbetegedések, mint például a demencia, ezen belül is az Alzheimer-kór. Ezekben a betegekben az elsődleges tünetek között vannak a térbeli orientációban megjelenő zavarok, amelyért elsősorban az entorhinális kéreg felel. Ezen a területen elhelyezkedő neuronokban számos patológiás elváltozás jelenik meg, mint a neurotoxikus amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) plakkok, illetve neurofibrilláris kötegek. Ezen elváltozások miatt a sejtek fiziológiai állapota megváltozik, ezzel zavart okozva a memóriában, tájékozódásban (Sivanandam & Thakur, 2012). Egy másik betegség, amely minden korosztályban előfordul és kialakulásában szintén szerepe van az entorhinális kéreg kóros elváltozásának, az epilepszia. Az epilepsziás betegek agyában a sejtek túlzott, kontrollálatlan működésbe lépnek, ezzel epilepsziás rohamok és görcsök alakulnak ki. Humán vizsgálatokban megállapították, hogy az egyik leggyakoribb drog rezisztens epilepszia, a TLE (temporális lebeny epilepszia) kialakulásában fontos szerepe van az entorhinális kéregnek. Az epilepszia ezen típusa főként a hippocampus CA1 régiójában generalizálódik, de az entorhinális kéreg is részt vesz a rohamok indukálásában. (Bartolomei et al., 2005; Beghi, 2020). Mindkét betegségben közös, hogy a hippocampus legfőbb információs kapuját, az entorhinális kérget is érinti, így az egyes sejtkapcsolatok és sejtípusok elektrofiziológiai és immunhisztokémiai megismerése nélkülözhetetlen a betegségek gyógyítása vagy kezelése érdekében.

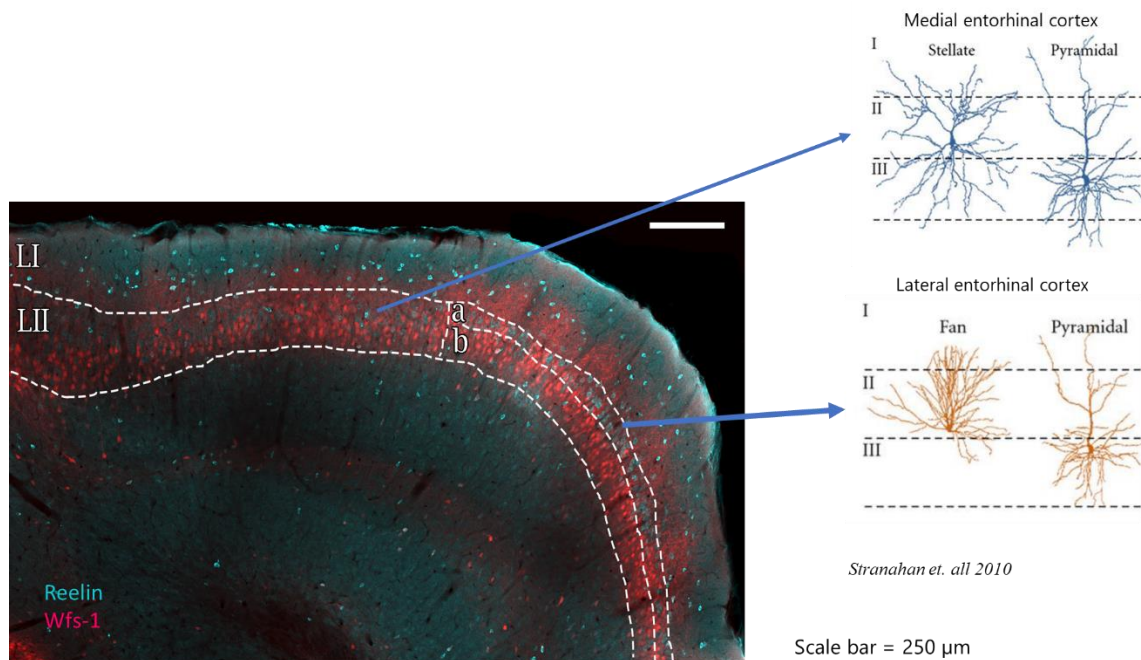
## I.1 Az entorhinális kéreg és kapcsolati rendszere

Az entorhinális kéreg (entorhinal cortex, EC) a mediális temporális lebenyben elhelyezkedő agyterület, a Brodman-féle felosztás szerint a Brodman 28-as és Brodman 34-es mezőben található. Rágcsálókban funkcionálisan két részre osztható fel, így megkülönböztetünk laterális – (lateral EC, LEC) és mediális (medial EC, MEC) entorhinális kérget (1. ábra). Az EC-ben a klasszikus kortikális rétegszerveződéssel találkozunk, így hat alréteget tudunk elkülöníteni, melyből a IV. rétegben részben vagy egészében hiányoznak a neuronok szómái, itt csupán dendritekkel és axonokkal találkozunk. A térre és időre vonatkozó információkat a MEC felszíni rétegeiben található sejtek, míg a különböző szenzoros és szociális viselkedésre vonatkozó információkat a laterális entorhinális kéregben lévő, szintén felszíni sejtek dolgozzák fel és/vagy továbbítják a hippocampus felé. Azon információk, amelyeket az entorhinális kéreg nem, vagy csak részben dolgozott fel, a hippocampusba továbbítódnak (Eichenbaum et al., 2012; Whittington et al., 2020; Canto et al., 2008; Tukker et al., 2022).

A legátfogóbb kutatást az entorhinális kéreg kapcsolatrendszerének feltárására a Burwell laboratórium végezte patkányokban. Ezek a vizsgálatok összhangban vannak számos publikációval, amelyek szerint az entorhinális kéreg fő kortikális kapcsolatát a perirhinális és parahippocampális területek alkotják. A perirhinális/parahippocampális kapcsolatokon túl a pre- és parasubiculum, valamint az olfaktorikus területek jelentős bemeneteket biztosítanak az entorhinális kéregnek, és az olfaktorikus területek esetében hasonlóan erős kimenetet kapnak az entorhinális kéregből. Ezekben a kapcsolatokban fajonkénti különbségek figyelhetők meg, amelyek azt mutatják, hogy míg a patkányban a kortiko-entorhinális reciprok kapcsolat viszonylag korlátozott és a rhinalis sulcushoz közeli területekre korlátozódik, ugyanezen kapcsolatok majomban sokkal gyakoribbak és az entorhinális kéreg szélesebb területét érintik (Canto et al., 2008, 2012).

Fontos kiemelni, hogy az entorhinális-kortikális projekciók nagyrészt a mély rétegekből, elsősorban az V. réteg piramidális neuronjaiból erednek, azonban lehetnek ebben a kapcsolati rendszerben kivételek, mint például az entorhinális-infralimbikus és entorhinális-olfaktorikus projekciók esetében, amelyek a II. és III. rétegekből erednek (Canto et al., 2008).

Az entorhinális kéreg elektrofiziológiai és morfológiai sajátosságait Canto és munkatársai nagy részletességgel elemezték, így szisztematikusan vizsgálták az egyes rétegekben található sejteket és azokat össze is hasonlították a MEC-en vagy a LEC-en belül (Canto & Witter, 2012a, 2012b), azonban a laterális és mediális entorhinális kéreg elektrofiziológiai jellemzőit ők sem hasonlították össze egymással.



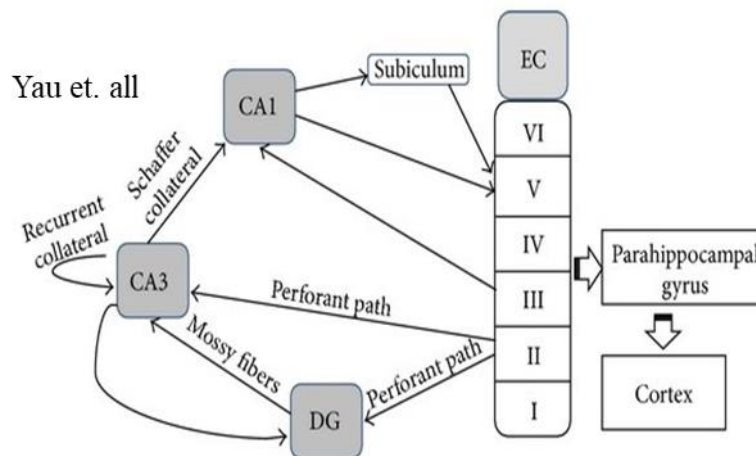
1. ábra: Az entorhinális kéreg mediális és laterális részének alakulása, illetve sejtípusai a második rétegben. A laterális entorhinális kéreg II. rétegét reelin immunhisztokémiai marker segítségével a és b alrétegekre lehet tagolni a sejtek által expresszált markerek alapján. (konfokális mikroszkópos kép saját forrás, sejtípusok: (Stranahan & Mattson, 2010).

## I.2 Az entorhinális kéreg, mint a hippocampus információs kapuja

Az EC központi szerepet játszik a kortiko-hippocampális kölcsönhatásokban, mivel gyakorlatilag az összes kortikális útvonal, amely a hippocampushoz vezet az EC-n keresztül halad át és a hippocampális efferens pályáinak jelentős része az EC-t használja kimeneti kapuként, hogy elérje a kortikális és szubkortikális területeket. Fontos kiemelni, hogy az entorhinális kéregben nem csak információ átkapcsolás, hanem információfeldolgozás is történik. A be- és kimeneti pályák rétegspecificitást mutatnak, méghozzá úgy, hogy a felszíni II. és III. rétegben található neuronok biztosítják a legtöbb hippocampális bemenetet, míg az V. és VI. réteg neuronjai a hippocampus kimeneti információinak közvetítésében játszanak fontos szerepet. Azonban nem beszélhetünk szigorú elkülönülésről az információ áramlás tekintetében a rétegek között. Az EC-n belül is nagyon erős interlamináris kölcsönhatások biztosítják az információ szabályozott áramlását. Az EC-t legalább két, citológiai szempontból különböző területre osztják, a laterális és mediális entorhinalis kéregre. A citológiai elkülönülés azt jelenti, hogy ezek a területek funkcionálisan is eltérnek egymástól, így a kortikális bemenetei is eltérőek. Mára már jól megalapozott, hogy a MEC fontos szerepet játszik a térbeli tájékozódásban, míg a LEC-ről sokkal kevesebb információ áll rendelkezésünkre, de valószínűleg szenzoros és kontextuális információkat biztosít a hippocampális hálózatnak és

szerepet játszik a nem térbeli memória időbeli sorrendjének kódolásában is (Canto & Witter, 2012a; Knierim et al., 2014; Tahvildari & Alonso, 2005).

Klinikai vizsgálatok és állatkísérletes kutatások is alátámasztják azt a tényt, hogy a memória kialakulása hippocampus és entorhinális kéreg-függő. Az entorhinális kéreg és a hippocampus közötti kapcsolat egy hurkot alkot, amely az entorhinális kéreg felszíni rétegeiből indul ki és a mély rétegeiben végződik. A kapcsolati rendszert a két terület között két neuronális útvonallal, a perforáns pályával és a temporo-ammonic útvonallal lehet jellemezni. A perforáns pálya a II. rétegből indul ki és a gyrus dentatusban végződik, míg a temporo-ammonic útvonal a III. rétegből indul ki és a CA1 régiójában végződik (Burwell et al., 1995; Takehara-Nishiuchi, 2014).



2. ábra: Az entorhinális kéreg kapcsolati rendszere a hippocampusszal, illetve a kortikális régiókkal (Yau et al., 2015).

### I.3 A mediális entorhinális kéreg

A MEC-ben, ha nem is minden, de a legtöbb funkcionálisan meghatározott idegsejttípus a tér vagy a navigáció egyes kódolási aspektusaihoz kapcsolódó funkcióval rendelkezik, amelyeknek jelentős szerepe van a térben való elhelyezkedés meghatározásában. Az elmúlt időszak egyik legjelentősebb felfedezése a grid sejtek voltak, amelyek hatszögletű mintázatban elhelyezkedve határozzák meg az állat térbeli elhelyezkedést. A MEC-ben a grid sejtek más sejttípusokkal összehangolva működnek, így beszélhetünk még olyan sejtekről, amelyek az állat fejének irányát (head-direction sejtek), sebességét (speed sejtek), környezetének határait (border sejtek), vagy tárgyak távolságát és szögét kódolják (object-vector sejtek). A MEC tehát leginkább egy olyan kortikális szerkezetű egységnek tekinthető, amely képes számításokat végezni annak érdekében, hogy meghatározza az állat helyzetét bizonyos relatív

referenciapontok kitűzésével. A MEC legfőbb bemenetei a presubiculum és parasubiculum területeiről származnak, illetve további bemeneteket kap a látókéreg asszociációs területeiről, illetve az occipitális kéregből (Miao et al., 2017; Moser et al., 2008; Nilssen et al., 2019).

#### **I.4 A laterális entorhinális kéreg**

Habár a MEC funkciója mára már jól körülhatárolt, a LEC-ről közel sem folyt annyi kutatás, emiatt pontos szerepét tekintve máig vannak kérdések. Korábbi kutatások alapján fontos szerepet játszik a kontextuális memória kialakításában, ezzel egy időben pedig a különböző szociális viselkedések során begyűjtött információfeldolgozásban lehet nagy szerepe. Kutatások során, amelyekben a LEC sejtek tüzelési mintázatát vizsgálták, azt vették észre, hogy bizonyos sejtek akkor tüzelnek, amikor a térben egy olyan pontra ért az állat, ahol egy tárgy volt elhelyezve egy korábbi kísérletben. Ugyanezen sejtek azonban nem tüzeltek akkor, amikor az adott tárgy még a dobozban volt, így arra következtethetünk, hogy a két információt két különböző sejttypus dolgozza fel. Ezzel a kísérlettel megállapítható volt, hogy a LEC-nek szerepe van a tárgyak helyének meghatározásában és a memóriából történő előhívásában (Tsao et al., 2013). A LEC legfőbb bemenetét a piriform kéreg és az olfaktorális területek adják, amelyekbe az információ feldolgozása után vissza is vetítenek a LEC sejtek (Agster & Burwell, 2009).

#### **I.5 A második rétegi sejtek**

A MEC II. rétegében két fő és három köztes morfológiát mutató principális sejttypus található. A köztes morfológiájú sejtek mindegyike piramis sejt, csupán a szóma orientációjában vannak különbségek a sejtek között. A fő sejttypusok a stellate (vagy csillag alakú) és piramis sejtek. Az MEC-ben található stellate sejtek a második réteg egész területében előfordulnak. Főként szómájuk alakjáról lehet őket felismerni, amely téglalap vagy megnyúlt alakot vesz fel. Dendritjeik vízszintesen terjednek el a második rétegen belül, de a mélyebb rétegekbe is behatolnak. Axonjaik közvetlenül a szómából indulnak ki és az angularis köteg felé haladnak. A piramis sejtek szómájára a háromszög alak jellemző, egy vastag és tüskés apikális dendrittel (1. ábra). A fő axonja az angularis köteg felé halad, kollaterálisai az I. és II. rétegben találhatóak (Canto & Witter, 2012b).

A LEC II. rétegében szintén két fő principális sejtet tudunk elkülöníteni. Ezen sejtek a MEC-ben is megtalálható piramis sejtek, melyek szómája vertikálisan orientált és háromszög alakú, apikális dendritje vastag és sűrűn tüskézett. Axonja szintén az angularis kötegben halad és kollaterálisokat ad az első, második és harmadik rétegbe. Ezen sejttypus köztes morfológiájú

alakja a szintén háromszög alakú piramis sejt, csupán abban tér el, hogy szómája horizontális irányban áll. A másik principális sejttípus a fan (vagy legyező alakú) sejt, amely nevét a szóma körül legyező alakban elhelyezkedő dendritfáról kapta. (1. ábra). Axonjai vékonyabbak, de szintén az anguláris kötegbe irányulnak, kollaterálisokat pedig a második és harmadik rétegbe adnak, illetve az első és ötödik rétegbe is (Canto & Witter, 2012a).

## **II. Célkitűzések**

Már számos publikációban leírták, hogy a stellate és fan sejtek nem csak, hogy eltérő funkcióval, de különböző típusú ioncsatornákkal is rendelkeznek, amelyek számos elektrofiziológiai paramétert befolyásolnak. A legtöbb kutatás azonban a fentiekben említett funkcionálisan eltérő principális sejteket az adott területeken belül hasonlítja össze (Aiken et al., 1995; Alonso & Klink, 1993; Solstad et al., 2006; Tahvildari & Alonso, 2005; Yoshida & Alonso, 2007). Jelenlegi kutatásunk során célkitűzésünk, hogy összehasonlítsuk a második rétegi MEC-ben található stellate és szintén a második rétegi LEC-ben található fan sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait in vitro akut egér és patkány agyszeletekben, illetve különböző intracelluláris oldatokkal megvizsgáljuk azt, hogy milyen elektrofiziológiai paramétereket befolyásolnak a különböző összetételű oldatok. A két leggyakrabban alkalmazott modellállat használatával lehetőségünk nyílik arra is, hogy összehasonlítsuk a második rétegi reelin pozitív principális sejtek elektrofiziológiai és immunhisztokémiai sajátosságait.

## **III. Anyag és módszer**

### **III.1 Agyszeletek preparálása**

Kísérleteink során hím egerek és patkányok agyában vizsgáltuk whole cell patch-clamp elvezetési módszerrel a stellate és fan sejtek elektrofiziológiai jellemzőit. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Élettani Intézetének állatházában tartottuk, ahol klímaberendezés biztosította a szabályozott hőmérsékletet ( $22 \pm 2$  °C) és a megfelelő páratartalmat (30-70%) számukra. Az állatház megvilágítása automatikusan váltakozott 12 órás világos (9 órától 21 óráig) és 12 órás sötét (21 órától 9 óráig) periódusok között.

Az elektrofiziológiai kísérleteket akut 300  $\mu$ m vastag horizontális agyszeleteken végeztük. Az állatokat isoflurán segítségével túlaltattuk, majd dekapitáltuk őket. Az agyszeleteket 4 °C-os vágó oldatban készítettük egy Leica VT1200S típusú vibratóm segítségével. A vágó oldat a következő anyagokat tartalmazta: 85 mM NaCl, 75 mM szukróz, 2.5 mM KCl, 25 mM D-glukóz, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , és 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Oldatunkat 95%-os

O<sub>2</sub> és 5%-os CO<sub>2</sub> gázzal buborékolattuk. Az agyszeleteket ebben az oldatban inkubáltuk 34-37 °C-on 20 percen át, majd egy artifiális agy-gerincvelői folyadékba (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) helyeztük át, amely a következőket tartalmazta: 2.5 mM KCl, 10 mM D-glükóz, 126 mM NaCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, and 26 mM NaHCO<sub>3</sub>. Ezt az oldatot szintén buborékolattuk 95%-os O<sub>2</sub> és 5%-os CO<sub>2</sub> gázzal. Az elvezetések előtt és alatt a szeleteket szobahőmérsékleten tartottuk. Az elvezetések során alkalmazott extracelluláris oldatok pH-ja 7.3-7.4, míg ozmolaritásuk 290-305 mOsm közé lett beállítva.

### III.2 In vitro elektrofiziológiai kísérletek

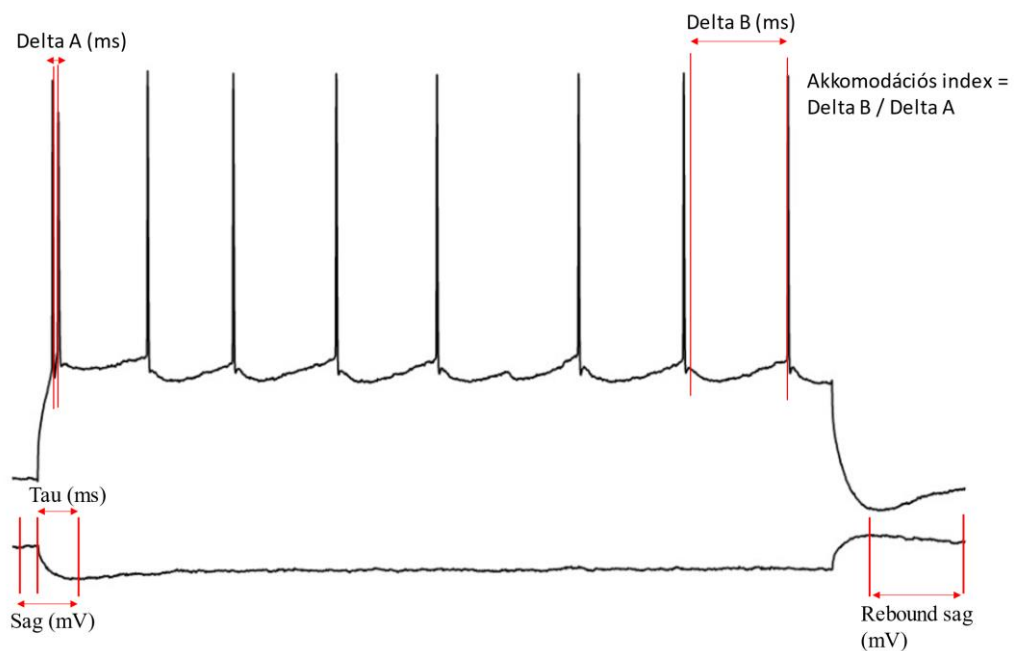
Az elvezetések során használt patch pipetták boroszilikát üvegkapillárisból készítettük, amelynek belső átmérője 1.1 mm, külső átmérője pedig 1.5 mm volt. A pipetták ellenállása 3-5 MΩ volt és egy Narishige PC-100 pipetta-húzó készülékkel készítettük el őket. Az elvezetések során egy Nikon Eclipse FN-1 mikroszkópot és egy 40x-es víz immerziós objektívet használtunk. A szeletekben található sejteket differenciális interferencia kontraszt (DIC) kép segítségével tettük láthatóvá, illetve egy monokróm kamera (ZWO\_ASI) segítségével követtük a pipettánkat az agyszeletben a számítógép monitorján.

A whole-cell elvezetéseket során egy MultiClamp 700A erősítőt használtunk, a jeleket 4 Hz-es low-pass filter segítségével szűrtük, illetve az analóg jeleket 20kHz-en digitalizáltuk egy digitalizáló segítségével (Axon Digidata 1550B). Az elvezetett jeleket Clampex 11.1 programmal rögzítettük, majd a Clampfit 11.1 szoftver segítségével analizáltuk az elektrofiziológiai kísérletek után. Az elvezetett sejteken egy szekundum hosszúságú, változó amplitúdójú négyszögjelek által létrehozott válaszokat vizsgáltunk és hasonlítottunk össze.

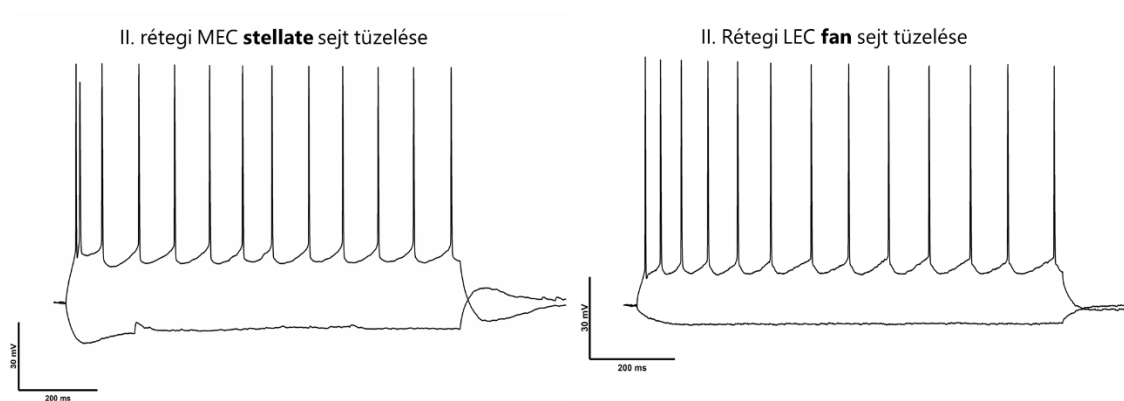
A pipettát különböző intracelluláris oldatokkal töltöttük fel a kísérletek során. A cézium-kloridot tartalmazó oldat a következőket tartalmazta: 90 mM kálium-glükonát, 3.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM ATP-Mg, 0.4 mM GTP-Na, 10 mM foszfo kreatin, 1.8 mM NaCl, 40 mM CsCl, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.05 mM EGTA. Az általánosan használt „normál” (lowCl) intracelluláris oldat alacsony klorid tartalmú volt és a következőket tartalmazta: 130 mM kálium-glükonát, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.2 mM EGTA, 2 mM ATP-Na és 1.8 mM NaCl. Az összes intracelluláris oldat 0,2% biocytint tartalmazott a posztfixálás utáni vizualizáció miatt, illetve az oldatok 7,3-as pH-ra lettek beállítva KOH segítségével, ozmolaritásuk 290-300 mOsm volt.

A sejtek négyszögjelre adott válaszát rögzítettük és különböző elektrofiziológiai paramétereket hasonlítottunk össze mind a hiperpolarizáló, mind a depolarizáló áramra adott válaszokban. Ezen paraméterek között találunk passzív és aktív membrántulajdonságokat. Az

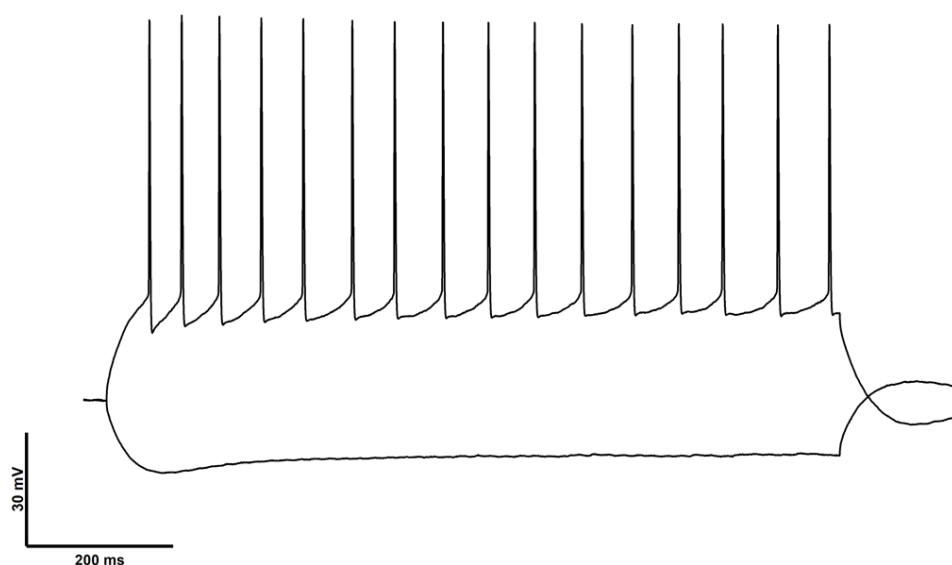
általunk mért passzív membrántulajdonságok a bemenő ellenállás, nyugalmi membránpotenciál és időállandó (tau), míg az aktív membrántulajdonságok közül az akciós potenciál küszöbértéke, sag, rebound sag és akkomodációs index értékeket vizsgáltuk (3. ábra). Az összes paramétert current clamp módban mértük meg és hasonlítottuk össze. A sejteket -65 mV-on tartottuk whole-cell konfigurációban, majd ezután egy 10 pikoamperes (pA) step protokollt alkalmaztunk, amelyet -150 pA-tól legalább 450 pA-ig vagy a felvétel leállításáig alkalmaztunk. A bemenő ellenállást tulajdonképpen a -100 pA-re adott maximális membránpotenciál változás hányadosaként határoztuk meg. A nyugalmi membránpotenciált 0 pA ráadásakor állapítottuk meg. A tau lényegében a membrán időállandója és azt az időt jelenti, amely alatt a membrán-potenciál a nyugalmi állapotból negatív, -100 pA nagyságú áramipulzus hatására a töltési görbe végső értékének 63%-ára csökken. Ezen pont megállapítására a Clampfit program segítségével görbét illesztettünk, majd ugyanezen programban található képletet alkalmaztuk. Az akciós potenciál küszöbértékét az első akciós potenciál megjelenésének kezdetekor mértük meg. A sag nagyságát a -100 pA amplitúdójó hiperpolarizáló áramra adott válasz legmélyebb és nyugalmi pontjai között mértük meg, míg a rebound sag nagyságát ugyanazon hiperpolarizáló áram megszűnése után megjelenő válasz legmagasabb és nyugalmi pontjai között mértük meg. Az akkomodációs indexet az utolsó kettő és az első kettő akciós potenciál között eltelt idő hányadosaként határoztuk meg (3. ábra).



3. ábra: A vizsgált paraméterek helyei a hiperpolarizáló és depolarizáló áramra adott válaszban egy stellate sejt esetében



4. ábra: Reprezentatív ábra a hiper- és depolarizáló áramra adott válasza egy II. rétegi mediális entorhinális kérgi stellate, valamint egy II. rétegi laterális entorhinális kérgi fan sejt esetében.



5. ábra: Reprezentatív ábra egy cézium-klorid intracelluláris oldattal elvezetett stellate sejt tüzelésére

### III.3 Immunhisztokémia, konfokális mikroszkópia

Annak megállapítására, hogy a sejtek, amelyekből elvezettünk valóban stellate vagy fan sejtek voltak, immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Előzetes publikációkból már ismert volt, hogy ezen sejtek a szómájukban expresszálják a reelin immunhisztokémiai markert, míg a másik elkülönülő principális sejttypus, a piramis sejtek a membránban megjelenő Wfs-1 markerre pozitívak (Kecskés et al., 2020; Varga et al., 2010). Így lehetőségünk volt arra, hogy nem csupán az elektrofiziológiai paramétereit vizsgáljuk meg a sejteknek, hanem a fenotípusukat is.

A sejtekből történő elvezetések után a szeleteket fixáló oldatba (4% paraformaldehid és 0,1% pikrinsav 0.1 M-os foszfát-pufferben (phosphate buffer, PB)) tettük, minimum 24 óráig, amely után a szeleteket alaposan átmostuk 0,1 M-os PB oldattal. A 300 µm vastag agyszeleteket a jobb antitest penetráció, és a teljes mikroszkóppal történő átláthatóság érdekében újrarmetsztük 60 µm vastagságúra.

Az elvezetések során biocytinnel töltött neuronok vizualizálása érdekében a szeleteket Alexa 488-konjugált streptavidinnel inkubáltuk (1:500) 0,1 M PB oldatban legalább 5 órán keresztül. A kiválasztott szeleteket a következő antitest-oldatokban inkubáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten (0,1 M PB-ben hígítva): Wfs1 (rabbit, 1:3000; Abcam, ab176909), reelin (mouse, 1:500, Millipore, MAB5367). A primer antitestek fluoreszcens jelölését különböző fluoreszcens festékekkel (Alexa 405/488/594/647) konjugált donkey másodlagos antitest oldatokban történő inkubálásával végeztük. A konfokális képeket egy Nikon Eclipse Ti2-E fluoreszcens konfokális mikroszkóppal, 10×, 20× és 60× objektívekkel készítettük el. Az elektronikus képek Z-stackingje és fényerő/kontraszt beállítása az ImageJ szoftverrel történt.

### III.4 Statisztikai kiértékelés

A vizsgált sejteket két fő csoportra osztottuk elektrofiziológiai és morfológiai tulajdonságaik alapján, így megkülönböztettünk MEC stellate és LEC fan sejteket. A sejt számok a következőképpen alakultak egérben és patkányban, illetve a cézium-kloridos elvezetések során, amelyek kizárólag egérben történtek meg (1. táblázat):

|               | Egér | Patkány | Cézium-klorid<br>intracelluláris oldat |
|---------------|------|---------|----------------------------------------|
| Stellate sejt | 12   | 8       | 5                                      |
| Fan sejt      | 13   | 10      | 6                                      |

1. táblázat. Az egyes modellállatokban, illetve a cézium-klorid intracelluláris oldattal történő elvezetések száma a stellate és fan sejtek esetében.

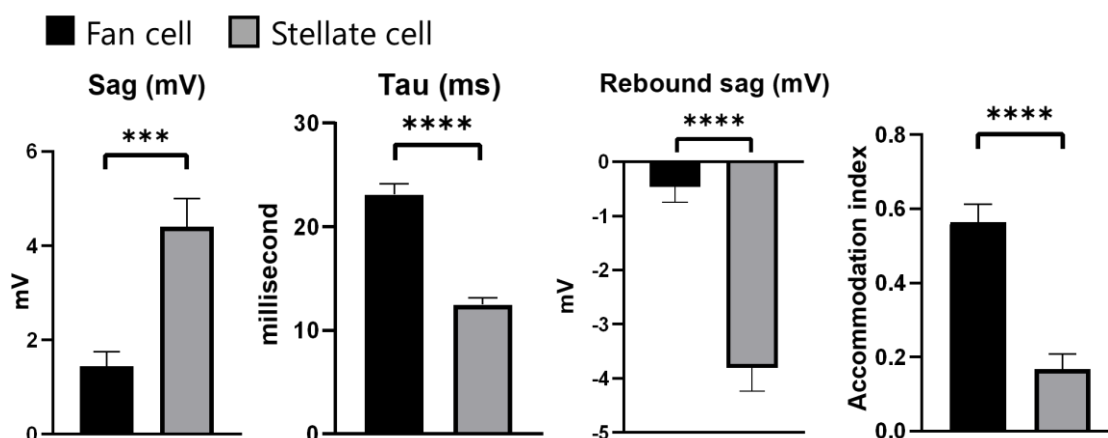
A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism programmal végeztük. A minták normál eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszttel vagy Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. A mintákat normál eloszlás esetén Welch korrelációs párosítatlan T-próbával hasonlítottuk össze, nem normál eloszlás esetén Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk a sejtek közötti eltéréseket az egyes elektrofiziológiai paraméterek tekintetében. Minden eredmény az adatok átlagát mutatja, szórásként pedig a standard error of mean érték jelenik meg.

## IV. Eredmények

Vizsgálataink során számos elektrofiziológiai paramétert hasonlítottunk össze, eredményeinkben csupán azokat a paramétereket emeltük ki, amelyek szignifikáns különbséget mutattak a két sejtpopuláció között, illetve az egér és patkány elvezetésekben eltértek valamilyen mértékben. Ezen paraméterek a nyugalmi membrán potenciál, sag, tau, rebound sag, akkomodációs index volt, amelyek kiszámításának és megállapításának a módja a III.2 fejezetben található.

### IV.1 Egér elvezetések

Egér agyszeletben történő elvezetéseinkben a sag nagysága a stellate sejtek esetében sokkal nagyobb volt ( $t=4,379$ ,  $p=0,004$ ), a tau időállandó esetében azonban nem tapasztaltunk különbséget a két sejttípus között ( $D=1$ ,  $p<0,0001$ ). A stellate sejtek rebound sag-je sokkal nagyobb mértékű volt, mint a fan sejteké ( $t=6,452$ ,  $p<0,0001$ ). Ugyanakkor a fan sejtek akkomodációs indexe szignifikánsan magasabb volt ( $D=0,8322$ ,  $p=0,0005$ ), mint a MEC-ben található stellate sejteké. (6. ábra)

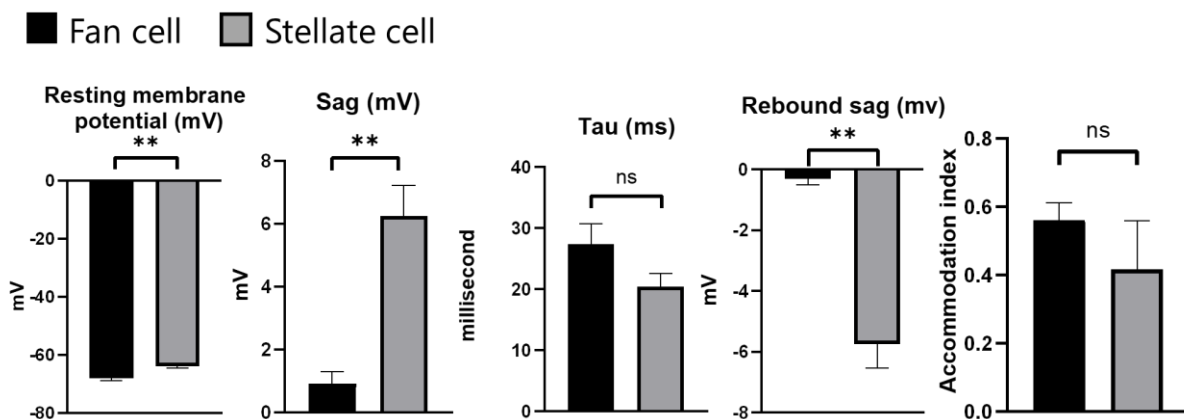


6. ábra: Egér agyszeletben normál intracelluláris oldattal elvezetett stellate (N=12) és fan (N=13) sejtek elektrofiziológiai jellemzői az egy szekundum hosszúságú váltakozó amplitudójú áramimpulzura adott válaszukban (\*\*\*) $p\leq 0,005$ ; \*\*\*\* $p\leq 0,0005$ ).

### IV.2 CsCl intracelluláris oldattal történő elvezetés

Normál intracelluláris oldat esetében nem tapasztaltunk különbséget a két sejttípus nyugalmi membránpotenciáljában, azonban a cézium-kloridot tartalmazó intracelluláris oldat miatt a fan sejtek nyugalmi membránpotenciálja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a stellate sejteké ( $D=1$ ,  $p=0,0043$ ). A sag nagysága a stellate sejtekben volt sokkal nagyobb ( $t=5,028$ ,  $p=0,0035$ ), viszont a tau esetében nem tapasztaltunk különbséget a két reelin expresszáló sejt között ( $t=1,749$ ,  $p=0,117$ ). A stellate sejtek rebound sag nagysága sokkal nagyobb volt a fan

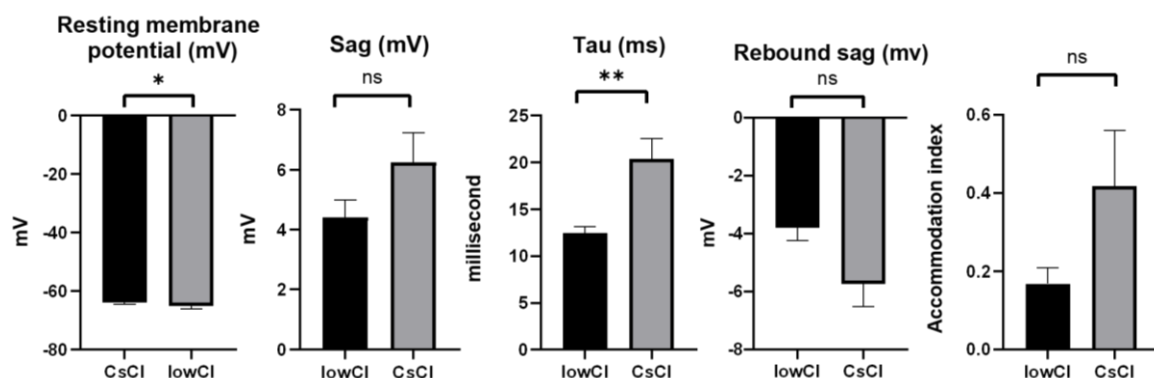
sejtekéhez képest ( $t=6,659$ ,  $p=0,0018$ ), viszont az akkomodációs indexben tekintetében teljes mértékben eltűnt a különbség ( $t=0,9611$ ,  $p=0,381$ ) (7. ábra).



7. ábra: Egér agyszeletben CsCl-ot tartalmazó intracelluláris oldattal elvezetett stellate (N=5) és fan (N=6) sejtek elektrofiziológiai jellemzői az egy szekundum hosszúságú, váltakozó amplitudójú áramimpulzura adott válaszukban (ns  $p>0,05$ ; \*\* $p\leq 0,01$ ).

### IV.3 Stellate sejtek közötti különbségek a két intracelluláris oldattal

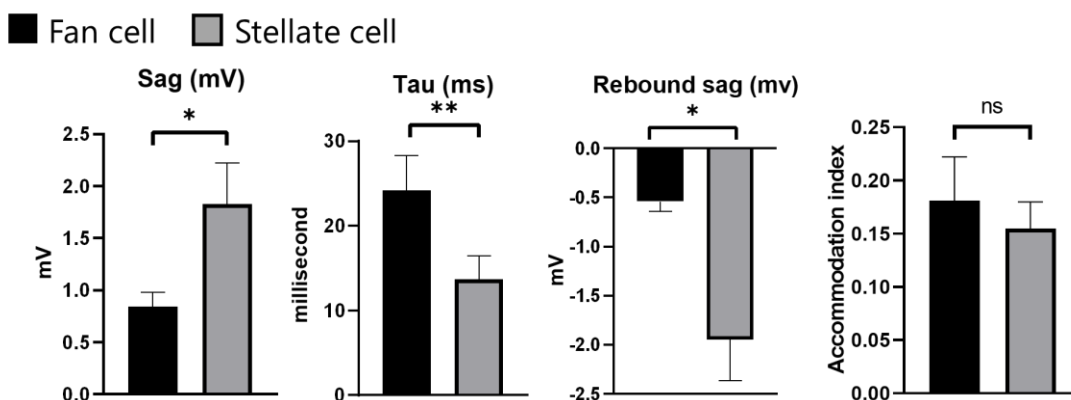
Kísérleteink során a már sokat vizsgált stellate sejtek jellemzőire is kíváncsiak voltunk a különböző intracelluláris oldattal adott válaszukban. A lowCl és CsCl intracelluláris oldatokkal történő elvezetésekben azt tapasztaltuk, hogy a nyugalmi membránpotenciáljuk sokkal nagyobb ( $D=0,6667$ ,  $p=0,0359$ ) volt a CsCl intracelluláris oldat alkalmazásakor. A sejtek időállandója szintén magasabb ( $D=0,8333$ ,  $p=0,0068$ ) volt a CsCl elvezetések során. A sag ( $t=1,596$ ,  $p=0,1536$ ), a rebound sag ( $t=2,147$ ,  $p=0,0716$ ) és akkomodációs index ( $D=0,5091$ ,  $p=0,2720$ ) tekintetében nem tapasztaltunk különbséget a két intracelluláris oldattal történő mérések között (8. ábra).



8. ábra: Egér agyszeletben lowCl (N=12) és CsCl-ot (N=5) tartalmazó intracelluláris oldattal elvezetett stellate sejtek elektrofiziológiai jellemzői az egy szekundum hosszúságú, váltakozó amplitudójú áramimpulzura adott válaszukban (ns  $p>0,05$ ; \*\* $p\leq 0,01$ ).

## IV.4 Patkány elvezetések

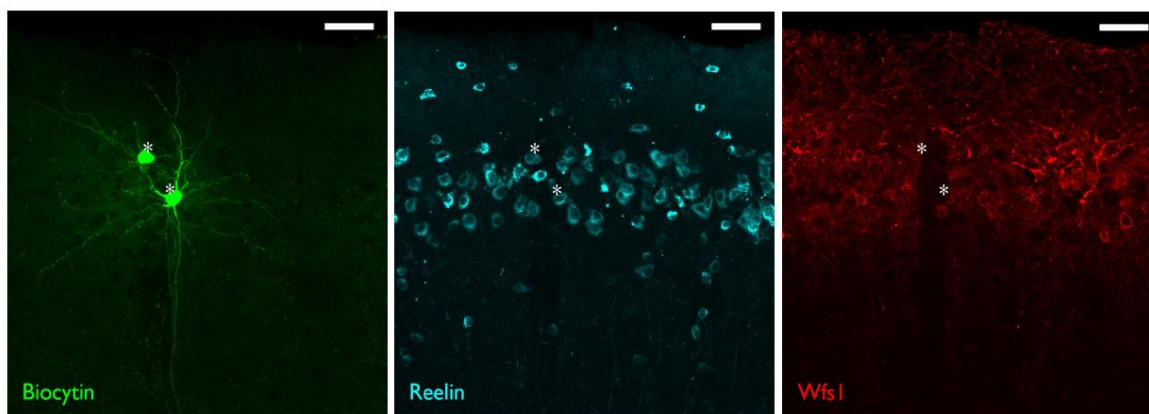
Patkány agyszeletben történő elvezetéseink során a stellate sejtekben sokkal nagyobb sag-et tapasztaltunk, mint a fan sejtekben ( $D=0,75$ ,  $p=0,0311$ ) (9. ábra). A tau időállandó a fan sejtek esetében sokkal kitartottabb volt ( $D=0,875$ ,  $p=0,0093$ ), míg a rebound sag a stellate sejtek esetében szignifikánsan nagyobb volt ( $t=3,317$ ,  $p=0,011$ ). Az akkomodációs indexben nem tapasztaltunk különbséget a két reelin pozitív sejt között ( $t=0,5445$ ,  $p=0,6031$ ) (9. ábra).



9. ábra: Patkány agyszeletben normál intracelluláris oldattal elvezetett stellate (N=8) és fan (N=10) sejtek elektrofiziológiai jellemzői az egy szekundum hosszúságú, váltakozó amplitúdójú áramimpulzura adott válaszukban (ns  $p>0,05$ ; \* $p\leq0,05$ ; \*\* $p\leq0,01$ ).

## IV.4 Immunhisztokémia festések eredményei

Az elvezetések után minden sejtet immunhisztokémiai módszerrel is megvizsgáltunk. A festések során használt reelin antitest a stellate és fan sejteket, míg a Wfs-1 immunhisztokémiai marker a piramis sejteket jelölte kizárólag. A szűrt sejteket biocytinnel jelöltük meg, így postfixálás után jól nyomon követhetők voltak a szeletben szűrt sejtek szómái és nyúlványai. A festés eredményeiről csupán egy reprezentatív képet szeretnék prezentálni, viszont minden sejt immunhisztokémiai festése ugyanilyen módon készült és nézett ki, legyen az stellate, fan vagy piramis sejt (10. ábra).



10.ábra: Konfokális mikroszkóppal készült kép a mediális entorhinális kéregben szúrt és biocytinnel feltöltött két stellate sejtről, amelyek reelin immunhisztokémiai markerre pozitívak, míg Wfs-1 immunhisztokémiai markerre negatívak (scale bar: 10  $\mu$ m).

## V. Eredmények megvitatása

Kutatásunk során a mediális entorhinális kéreg stellate és laterális entorhinális kéreg fan sejtjeinek elektrofiziológiai sajátosságait hasonlítottuk össze egérben és patkányban, valamint reelin és Wfs-1 immunhisztokémiai markerekkel is megvizsgáltuk a sejteket. Kísérleteink során normál intracelluláris oldatot alkalmaztunk, majd áttértünk egér agyszeletben történő elvezetéseink során egy cézium-kloridot tartalmazóra. Az elektrofiziológiai paraméterek összehasonlításához whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai technikát alkalmaztunk, amely során egy szekundum hosszúságú, váltakozó amplitúdójú négyszögimpulzusokat alkalmaztunk. A sejtek elektrofiziológiai jellemzőit már számos kutatásban leírták (Canto & Witter, 2012a, 2012b; Ha & Cheong, 2017; Shay et al., 2016), azonban szisztematikusan egyik kutatásban sem hasonlították össze a két reelint expresszálo sejt négyszögimpulzusra adott válaszát, ahogyan az egér és patkány agyszeletben mért különbségeket sem vizsgálták.

### V.1 Egér elvezetések

Már a kísérletek közben feltűnő volt, hogy a stellate sejtek sag nagysága sokkal nagyobb a fan sejtekéhez képest (4. ábra), ezt a statisztikai elemzés is alátámasztotta. A sag nagyságát különböző típusú hiperpolarizált-aktivált ciklikus nukleotiddal kapuzott kation (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, HCN) csatornák befolyásolják. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a stellate sejteken nagy számban vannak jelen ezek a csatornák, míg a fan sejteken kevesebb vagy nem ugyanolyan arányban vannak jelen az egyes típusok. Feltételezésünkkel megegyezően a HCN1-csatorna nagy mértékben van jelen a második rétegi stellate és piramis sejtekben. Ezen sejtekben található HCN1-csatornák szükségesek a gyors aktiválású H-áram kialakulásához és befolyásolják a nyugalmi és aktív membrántulajdonságokat. Amikor a stellate sejtek nyugalmi állapotban vannak, akkor ezek a HCN1-csatornák szabályozzák a membrán konduktanciát és szupresszálják az alacsony frekvenciájú fluktuációkat a membrán-potenciálban, míg aktív állapotban az akciós potenciálok alakját szabályozzák a repolarizációs szakaszban. A stellate sejtek a gyrus dentatusba vetítenek, így ezen csatornák a memória kialakulásában játszhatnak szerepet, amihez egy nagyon precíz és szabályozott temporális bemenet szükséges, amelyet ezen sejtek adnak (Nolan et al., 2007).

A fan sejtek időállandója sokkal nagyobb volt, mint a stellate sejteké, így elmondható, hogy egy adott stimulusra vagy más sejtről érkező akciós potenciálra a fan sejtek lassabban tudnak reagálni. Az időállandó nagysága nagyban függ a sejt passzív membrántulajdonságaitól, emiatt a különböző ioncsatornáktól, így a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  ioncsatornák különböző formái jelentősen befolyásolják az időállandó mértékét. Ezen csatornák blokkolásával a membrán kapacitanciája és rezisztenciája nagymértékben megváltozik, ezzel együtt pedig az időállandó is. Ezen ioncsatornákon kívül az A-áram is befolyásolja a tau mértékét, ezzel pedig az egyes cAMP HCN-csatornák, illetve a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  áramok is változnak (Wahl-Schott & Biel, 2009). Giocomo és munkatársai a H-áramot vizsgálták a mediális entorhinális kéreg dorso-ventrális tengelyén. Vizsgálatukban megállapították, hogy ezen tengely mentén ventrális irányban csökken a tau mértéke, amely korrelál a mi eredményünkkel, miszerint a laterális entorhinális kéregben a tau mértéke nagyon lecsökken. Ezen jelenség összefüggésben lehet a grid sejt szigetek nagyságával és egymás közötti távolságával. A szigetek távolságának a növekedése pedig összefüggésben van a küszöb alatti oszcillációk frekvenciájának csökkenésével (Giocomo & Hasselmo, 2008).

A rebound sag esetében markáns különbséget találtunk a fan és stellate sejtek között, a stellate sejtek rebound sag-je sokkal nagyobb volt. Ez a jelenség már ismert volt a II. régi stellate sejtekben, így ezen kutatások arra a konklúzióra jutottak, hogy a rebound sag szerepe egy adott gátló impulzura az egyes temporális területekről érkező tüzelési mintázatok szétválasztásában van. Ez a fázis specifikus mechanizmus lehetőséget biztosít arra, hogy csökkentse azon neuronok rebound tüzelését, amelyek más fázisú mediális szeptumból jövő bemenettel rendelkeznek, így tehát egy ritmikusságot szabályozó szerepet tölthet be a neuronális hálózatban (Shay et al., 2016).

Az akkomodációs index mértéke is különbözött a két sejtípus között, a fan sejtek sokkal nagyobb mértékben akkomodáltak, mint a stellate sejtek. Az akkomodációs index fontos szerepet tölt be a neuronális hálózatok kódolásában. Az akkomodáció megjelenése a  $\text{Ca}^{2+}$  aktivált  $\text{K}^+$  csatornák ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) működésének a jele, ez az a csatorna család, amely jelentősen befolyásolja a kálium kiáramlását a sejtéből. Az emelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  szint  $\text{K}^+$  effluxhoz vezet. A  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -csatornák működése hiperpolarizálja a membránt, amely az akciós potenciál megszűnéséhez vezet és visszacsatol a  $\text{Ca}^{2+}$  szintre úgy, hogy deaktiválja a feszültség-függő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat, ezzel pedig lecsökkenti a  $\text{K}^+$  beáramlást, mivel a  $\text{K}^+$  fordulási potenciálja -90-től -100 mV-ig tart. A biofizikai jellemzőik alapján kétféle  $\text{K}_{\text{Ca}}$  receptorról beszélhetünk, így elkülönítünk nagy konduktanciájú (200-400 pS)  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  és alacsony konduktanciájú (2-20 pS)  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ -csatornákat. Előbbire nagy hatással van a membrán depolarizációja és a  $\text{Ca}^{2+}$  influx, míg utóbbi kapuzási mechanizmusára csak a  $\text{Ca}^{2+}$  influx van hatással (Ha & Cheong, 2017).

## V.2 CsCl intracelluláris oldattal történő elvezetés

Az elvezetések során több különbséget is találtunk a stellate és fan sejtek tüzelési mintázata között, a legfeltűnőbb a dupla akciós potenciál vagy doublet jelenléte volt (4. ábra). Feltételezéseink szerint ezen jelenség hátterében különböző feszültség-függő kálium (voltage gated potassium, Kv) csatornák állnak, ezért normál intracelluláris oldatunkat egy CsCl-ot tartalmazóra cseréltük. A CsCl több Kv-csatorna antagonistájaként gátolja a  $K^+$ -ok beáramlását, ezzel pedig a doubletek kialakulását (5. ábra).

A CsCl megváltoztatta a stellate sejtek nyugalmi membránpotenciálját, míg a fan sejtek esetében ez nem volt megfigyelhető, a két sejtet összehasonlítva pedig a stellate sejtek nyugalmi membránpotenciálja szignifikánsan magasabb volt. Úgy gondoljuk, hogy a stellate sejteken sokkal többféle és sokkal nagyobb mennyiségű Kv-csatorna van jelen, ezáltal a CsCl nagyobb mértékben tudott hatni ezekre a sejtekre.

A sag esetében nem történt érdemi változás a normál intracelluláris oldathoz képest, a stellate sejtek sag-je továbbra is szignifikánsan nagyobb volt a fan sejtekéhez viszonyítva. A tau esetében azonban a két sejt között már nem volt megfigyelhető különbség, nem úgy, mint a normál intracelluláris oldatnál. Ennek oka szintén arra vezethető vissza, hogy a tau mértékét a különböző kálium csatornák nagymértékben befolyásolják, ezen csatornákat blokkolva a tau mértéke csökken. Patkány nucleus supraopticus-ban vizsgálták az extracelluláris  $Cs^+$  hatását, és azt tapasztalták, hogy a  $Cs^+$  reverzibilis módon teljesen eltünteti a H-áram jelenlétét ezen neuronokban, ezzel egyidőben pedig a tau időállandót is megváltoztatja, a mi eredményeinkkel megegyezően (Ghamari-Langroudi & Bourque, 2001). A rebound sag esetében sem történt változás, a stellate sejteké sokkal alacsonyabb volt, mint a fan sejteké.

Ahogy azt vártuk, a stellate sejtekben látható doublet a CsCl hatására teljes mértékben eltűnt minden egyes sejtben. Ezen változás az akkomodációs indexen is látszik, hiszen a két sejt között nem tapasztaltunk semmilyen különbséget ezen méréseink során, nem úgy, mint a normál intracelluláris oldatnál, ahol nagymértékű különbség volt a stellate sejtekben látható dupla akciós potenciálok miatt. Ezt a jelenségeket is a  $Cs^+$  Kv-csatornákra kifejtett intracelluláris hatásának tulajdonítjuk, azonban ennek igazolása érdekében további kísérleteink jelenleg is zajlanak.

## V.3 Stellate sejtek közötti különbség a két intracelluláris oldattal

Egerekben végzett kísérleteink során kíváncsiak voltunk arra, hogy a már sok publikációban jellemzett stellate sejtek hogyan válaszolnak a négyszögimpulzusra a lowCl és CsCl

intracelluláris oldatok alkalmazásakor. A CsCl intracelluláris oldattal történő elvezetésekben a sejtek nyugalmi membránpotenciálja sokkal magasabb, ez annak köszönhető, hogy a stellate sejtek nagyon sok feszültség-függő kálium-csatornát expresszálnak, ami pedig jelentősen befolyásolja a nyugalmi membránpotenciál értékét. A másik paraméter, amelyben szignifikáns különbséget találtunk, a tau volt. Az időállandó nagysága sokkal alacsonyabb volt a lowCl elvezetések során, amelynek oka mind a Kv-csatornák, mind a HCN-csatornák jelenléte a stellate sejteken. A különböző HCN-csatornákat nagyban befolyásolja a cézium intracelluláris jelenléte, ebben az esetben főként a HCN1-csatornának van nagy szerepe a tau nagyságának a modulálásában (Giocomo et al., 2011; Hughes et al., 1987; Wahl-Schott & Biel, 2009).

#### **V.4 Patkány elvezetések**

Kísérleteink során patkány agyszeletet is használtunk, így lehetőségünk nyílt összehasonlítani eredményeinket az egérben látottakkal. Az elvezetések során lényegében ugyanazt láttuk, mint az egérben történő kísérletekben, a stellate sejtekben látványosan jelen volt a dupla akciós potenciál a depolarizáló áram kezdetén, valamint a hiperpolarizáló áram hatására megjelenő sag mértéke is jelentősen nagyobb volt a fan sejtek esetében tapasztaltakhoz képest. Majdnem minden vizsgált paraméter statisztikailag is megegyezett az egérben tapasztaltakkal, így a jelentősen eltérő sag mértékén kívül a tau időállandó ebben az esetben is sokkal kitartottabb volt a fan sejtek esetében. A rebound sag nagysága a stellate sejtekben volt markánsabban jelen, ahogyan az egérben is láhattuk. Az egyetlen paraméter, amely nem volt megegyező egér és patkány agyszeletben, az akkomodáció volt. A fan és stellate sejtek is hasonlóképpen akkomodáltak a depolarizáló áram hatására, viszont, ha a grafikont (9. ábra) nézzük a tendencia látható, miszerint a fan sejtek akkomodációs indexe kisebb, míg a stellate sejteké nagyobb. Canto és munkatársai a mediális entorhinális kéregben vizsgálták a principális sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait patkány agyszeletben és eredményeinkkel megegyezően a második rétegi principális sejtek első két akciós potenciálja között eltelt idő szignifikánsan kisebb volt, mint az utolsó két akciós potenciál esetében (Canto & Witter, 2012b). Ugyanezen kutatás során principális sejteket is vizsgáltak, így piramis és stellate sejtek is szerepeltek a statisztikai elemzésben, de több mint valószínű, hogy a stellate sejtek doubletjei miatt alakulhatott ki ez a nagy különbség, ahogyan az általunk végzett egér elvezetéseink is mutatják. Ugyanezen kutatócsoport a laterális entorhinális kéregben is vizsgálta ezen sejtek elektrofiziológiai és morfológiai sajátosságait és minden elektrofiziológiai eredményük megegyezik a mi eredményeinkkel (Canto & Witter, 2012a).

## **VI. Összegzés**

Összegzésként elmondható, hogy ezen kutatás során olyan elektrofiziológiai paramétereket vizsgáltunk és hasonlítottunk össze a mediális és laterális entorhinális kéreg II. rétegi reelin pozitív principális sejtjeiben, amelyet eddig egyik kutatás sem tárgyalt. Ezen sejtek nagyon fontos bemenetet szolgáltatnak a hippocampus felé, ezért vizsgálatuk elengedhetetlen a kapcsolatrendszerek feltárása érdekében. A vizsgált paraméterek egy olyan komplex folyamat részei, amelyet egy egységként nagyon nehéz megvizsgálni, ezért olyan elemeket szükséges kiemelni, amelyeket jól jellemezhetünk. Ebben a dolgozatban bemutatott összehasonlító elektrofiziológiai módszertani vizsgálat alappillére azoknak a kutatásoknak, amelyekben gyógyszerjelölt vegyületeket fejlesztenek olyan kognitív deficitekkel járó betegségekre, amelyek a mai társadalmunkban egyre gyakrabban fordulnak elő.

## VII. Irodalom jegyzék

- Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2009). Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus*, 19(12), 1159–1186. <https://doi.org/10.1002/hipo.20578>
- Aiken, S. P., Lampe, B. J., Murphy, P. a, & Brown, B. S. (1995). CA1 pyramidal. *British Journal of Pharmacology*, 115, 1163–1168.
- Alonso, A., & Klink, R. (1993). Differential Electroresponsiveness of Stellate and Pyramidal-Like Cells of Medial Entorhinal Cortex Layer II. In *JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY* (Vol. 70, Issue 1). [www.physiology.org/journal/jn](http://www.physiology.org/journal/jn)
- Annese, J., Schenker-Ahmed, N. M., Bartsch, H., Maechler, P., Sheh, C., Thomas, N., Kayano, J., Ghatan, A., Bresler, N., Frosch, M. P., Klaming, R., & Corkin, S. (2014). Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4122>
- Bartolomei, F., Khalil, M., Wendling, F., Sontheimer, A., Régis, J., Ranjeva, J. P., Guye, M., & Chauvel, P. (2005). Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: An electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia*, 46(5), 677–687. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.43804.x>
- Beghi, E. (2020). The Epidemiology of Epilepsy. In *Neuroepidemiology* (Vol. 54, Issue 2, pp. 185–191). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000503831>
- Burwell, R. D., Witter, M. P., Amaral, D. G., & Burwell, K. D. (1995). *Perirhinal and Postrhinal Cortices of the Rat: A Review of the Neuroanatomical Literature and Comparison With Findings From the Monkey Brain* Address correspondence and reprint request to (Vol. 5).
- Canto, C. B., Koganezawa, N., Beed, P., Moser, E. I., & Witter, M. P. (2012). All layers of medial entorhinal cortex receive presubicular and parasubicular inputs. *Journal of Neuroscience*, 32(49), 17620–17631. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3526-12.2012>
- Canto, C. B., & Witter, M. P. (2012a). Cellular properties of principal neurons in the rat entorhinal cortex. I. The lateral entorhinal cortex. *Hippocampus*, 22(6), 1256–1276. <https://doi.org/10.1002/hipo.20997>
- Canto, C. B., & Witter, M. P. (2012b). Cellular properties of principal neurons in the rat entorhinal cortex. II. The medial entorhinal cortex. *Hippocampus*, 22(6), 1277–1299. <https://doi.org/10.1002/hipo.20993>
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? *Neural Plasticity*, 2008, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2008/381243>
- Corkin, S., Amaral, D. G., Gilberto González, R., Johnson, K. A., Hyman, B. T., Gloor, P., deToledo-Morrell, L., Morrell, F., & Murray, E. A. (1997). H. M.'s Medial Temporal Lobe

- Lesion: Findings from Magnetic Resonance Imaging. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 17, Issue 10).
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., & Lipton, P. (2012). Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1597–1608. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.006>
- Ghamari-Langroudi, M., & Bourque, C. W. (2001). Ionic basis of the caesium-induced depolarisation in rat supraoptic nucleus neurones. *Journal of Physiology*, 536(3), 797–808. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00797.x>
- Giocomo, L. M., & Hasselmo, M. E. (2008). Time constants of h current in layer II stellate cells differ along the dorsal to ventral axis of medial entorhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, 28(38), 9414–9425. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3196-08.2008>
- Giocomo, L. M., Hussaini, S. A., Zheng, F., Kandel, E. R., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2011). Grid cells use HCN1 channels for spatial scaling. *Cell*, 147(5), 1159–1170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.051>
- Ha, G. E., & Cheong, E. (2017). Spike frequency adaptation in neurons of the central nervous system. In *Experimental Neurobiology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 179–185). Korean Society for Neurodegenerative Disease. <https://doi.org/10.5607/en.2017.26.4.179>
- Hughes, D., Mcburney, R. N., Smith, S. M., & Zorec, R. (1987). CAESIUM IONS ACTIVATE CHLORIDE CHANNELS IN RAT CULTURED SPINAL CORD NEURONES. In *J. Physiol* (Vol. 392).
- Kecskés, M., Henn-Mike, N., Agócs-Laboda, Á., Szócs, S., Petykó, Z., & Varga, C. (2020). Somatostatin expressing GABAergic interneurons in the medial entorhinal cortex preferentially inhibit layerIII-V pyramidal cells. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01496-x>
- Knierim, J. J., Neunuebel, J. P., & Deshmukh, S. S. (2014). Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: Objects, path integration and local - Global reference frames. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0369>
- Miao, C., Cao, Q., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2017). Parvalbumin and Somatostatin Interneurons Control Different Space-Coding Networks in the Medial Entorhinal Cortex. *Cell*, 171(3), 507–521.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.050>
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M. B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 69–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
- Neurogliaform cells mediate feedback inhibition in the medial entorhinal cortex.* (n.d.).
- Nilssen, E. S., Doan, T. P., Nigro, M. J., Ohara, S., & Witter, M. P. (2019). Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. In *Hippocampus* (Vol. 29, Issue 12, pp. 1238–1254). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/hipo.23145>

- Nolan, M. F., Dudman, J. T., Dodson, P. D., & Santoro, B. (2007). HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, 27(46), 12440–12451. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2358-07.2007>
- Shay, C. F., Ferrante, M., Chapman, G. W., & Hasselmo, M. E. (2016). Rebound spiking in layer II medial entorhinal cortex stellate cells: Possible mechanism of grid cell function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 129, 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.004>
- Sivanandam, T. M., & Thakur, M. K. (2012). Traumatic brain injury: A risk factor for Alzheimer's disease. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 36, Issue 5, pp. 1376–1381). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.013>
- Solstad, T., Moser, E. I., & Einevoll, G. T. (2006). RAPID COMMUNICATION From Grid Cells to Place Cells: A Mathematical Model. *Hippocampus*, 1031, 1026–1031. <https://doi.org/10.1002/hipo>
- Stranahan, A. M., & Mattson, M. P. (2010). Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and Alzheimer's disease. *Neural Plasticity*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/108190>
- Tahvildari, B., & Alonso, A. (2005). Morphological and electrophysiological properties of lateral entorhinal cortex layers II and III principal neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 491(2), 123–140. <https://doi.org/10.1002/cne.20706>
- Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Entorhinal cortex and consolidated memory. In *Neuroscience Research* (Vol. 84, pp. 27–33). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.02.012>
- Tsao, A., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2013). Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Current Biology*, 23(5), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.036>
- Varga, C., Lee, S. Y., & Soltesz, I. (2010). Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output. *Nature Neuroscience*, 13(7), 822–824. <https://doi.org/10.1038/nn.2570>
- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 66, Issue 3, pp. 470–494). <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8525-0>
- Whittington, J. C. R., Muller, T. H., Mark, S., Chen, G., Barry, C., Burgess, N., & Behrens, T. E. J. (2020). The Tolman-Eichenbaum Machine: Unifying Space and Relational Memory through Generalization in the Hippocampal Formation. *Cell*, 183(5), 1249–1263.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.024>
- Yau, S. Y., Li, A., & So, K. F. (2015). Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. In *Neural Plasticity* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/717958>
- Yoshida, M., & Alonso, A. (2007). Cell-type-specific modulation of intrinsic firing properties and subthreshold membrane oscillations by the M(Kv7)-current in neurons of the

entorhinal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 98(5), 2779–2794.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00033.2007>

## **VIII. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Varga Csabának és belső konzulensemnek Dr. Völgyi Bélának a munkám és diplomadolgozatom elkészülése során nyújtott elméleti és gyakorlati útmutatásokért. Hálával tartozom a felkészülésem során nyújtott önzetlen segítségért Dr. Barabás Klaudiának, Dr. Henn-Mike Nórának és Dr. Szőcs Szilárdnak, illetve az élettani intézet állatgondozójának, Deák Gergőnek, akinek munkája nélkül ezek a kísérletek nem jöhettek volna létre.