

Received: 01.06.2020
Accepted: 15.12.2020
Published: 15.06.2021

Rola obszaru tylnego podwzgórza w generowaniu rytmu theta*

The role of the posterior hypothalamic area in the generation of theta rhythm

Agata Staszelis, Tomasz Kowalczyk

Katedra Neurobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

*Finansowanie w ramach grantu NCN nr2017/25/B/NZ4/01476.

Streszczenie:

Rytm theta jest jednym z najlepiej zsynchronizowanych wzorców aktywności oscylacyjnej rejestrowanych w mózgach ssaków. U ludzi, rytm ten obserwowany jest podczas snu REM, nawigacji przestrzennej, procesów pamięciowych, analitycznych oraz językowych. Może być również traktowany jako nieswoisty marker stanów patologicznych ośrodkowego układu nerwowego, takich jak choroba Alzheimera czy padaczka. Główną strukturą zaangażowaną w generowanie wzorca aktywności bioelektrycznej, zarówno u ludzi, jak i u gryzoni (najczęściej badanych zwierząt laboratoryjnych), jest formacja hipokampa. Jej funkcjonowanie zależy od współdziałania wielu innych struktur układu nerwowego. Jedną z nich jest obszar tylnego podwzgórza, który jest istotnym elementem układów neuronalnych modulujących zdolność formacji hipokampa do generowania rytmu theta. Przedstawione w artykule wyniki badań podkreślają rolę obszaru tylnego podwzgórza, jako modulatora hipokampalnego rytmu theta, ale wykazują również, że obszar ten jest zdolny do samodzielnego, niezależnego od wpływu innych struktur, generowania rytmicznej aktywności theta.

Słowa kluczowe:

rytm theta, podwzgórze, formacja hipokampa, jądro nadsuteczkwate, jądra tylnego podwzgórza

Summary:

Theta rhythm is one of the best synchronized patterns of the oscillatory activity recorded in the mammalian brain. In humans, this rhythm is associated with REM sleep, spatial navigation, memory functions, analytical and language processes. On the other hand, it can be treated as a non-specific marker of such pathological states of the central nervous system as Alzheimer's disease or epilepsy. The hippocampal formation is the key structure involved in the generation of this bioelectric phenomenon, both in humans and rodents (the most commonly studied laboratory animals). Theta rhythm appearance in the hippocampus is dependent on the interaction of multiple different structures of the nervous system. One of them is the posterior hypothalamic area (PHA), which constitutes a crucial part of the neuronal system modulating the ability of the hippocampal formation to generate theta rhythm. Although the research results encompassed in this paper emphasize the essential role of the PHA as a modulator of the hippocampal theta rhythm, it was the authors' intent to indicate that this area is also capable of generating local rhythmical theta oscillations, independently of the influence of other brain structures.

Keywords:

theta rhythm, hypothalamus, hippocampal formation, supramammillary nucleus, posterior hypothalamic nuclei

GICID

01.3001.0014.9333

DOI:

10.5604/01.3001.0014.9333

Word count:

8 495

Tables:

–

Figures:

–

References:

103

Adres autorki: mgr inż. Agata Staszelis, Katedra Neurobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/141, 90-236 Łódź; e-mail: agata.staszelis@unilodz.eu

Wykaz skrótów: **CA1** – pole cytoarchitektoniczne hipokampa właściwego, **CBX** – karbenoksolon, **CDP** – chlordia-zepoksyd, **DG** – zakręt zębany, **EC** – kora śródwęczowa, **EEG** – elektroencefalogram, **GABA** – kwas gamma-aminomasłowy, **HPC** – formacja hipokampa, **MB** – ciała suteczkowe, **MS/vDBB** – obszar przyśrodkowej przegrody i pasma przekątnego Broki, **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy, **PH** – jądra tylnego podwzgórza, **Pha** – obszar tylnego podwzgórza, **REM** – sen paradoksalny, faza snu z szybkimi ruchami gałek ocznych, **RPO** – jądro siatkowate mostu, **SPL** – spironolakton, **SuM** – jądro nadsuteczkowe.

WPROWADZENIE

Rytmiczne oscylacje obserwowane w mózgu, to swoisty wzorzec regularnej aktywności bioelektrycznej komunikujących się ze sobą grup neuronów. W zależności od poziomu organizacyjnego oscylacji neuronalnych, można mówić o mikro-, mezo- i makroskali rytmów. W mikroskali zjawisko to dotyczy potencjałów postsynaptycznych oraz potencjałów czynnościowych pojedynczych neuronów. Jeśli występuje bardzo regularny wzorzec wyładowań poszczególnych komórek, gdy wiele potencjałów czynnościowych lub postsynaptycznych jest generowanych w krótkim czasie, można mówić o synchronizacji rytmicznej w mózgu w skali mikro. Mezoskala jest natomiast powiązana z synchronizacją, której ulegają wyładowania grup (sieci) neuronów, w taki sposób, że zsumowane potencjały bioelektryczne wchodzi w interferencję. Synchronizacja większych sieci neuronalnych może być przyczyną oscylacji o wyższej amplitudzie i większym zasięgu, zwanych lokalnymi potencjałami polowymi (local field potentials). W makroskali, oscylacje powstają przez funkcjonalne sparowanie pewnych obszarów mózgu z innymi, w postaci sprzężeń zwrotnych. Jeśli są dodatnie, będzie to sprzyjało powstawaniu lokalnych potencjałów polowych, jeśli ujemne – aktywność będzie ulegała desynchronizacji [98].

Jednym z najlepiej zsynchronizowanych wzorców aktywności oscylacyjnej w mózgach ssaków jest rytm theta. Aktywność oscylacyjna theta u ludzi charakteryzuje się częstotliwością fal 4-7 Hz i rejestrowana jest głównie z przyśrodkowych okolic płata czołowego oraz okolic skroniowych kory [70]. Rytm ten obserwowany jest u człowieka w zapisie EEG m.in. podczas snu REM [17, 71], nawigacji przestrzennej powiązanej z integracją czuciowo-ruchową [30], może być też powiązany z procesami językowymi [2], analitycznymi i pamięciowymi [1, 65, 71]. Oscylacje theta, zostały wskazane jako potencjalny, nieswoisty biomarker pewnych stanów patologicznych ośrodkowego układu nerwowego (OUN), takich jak choroba Alzheimera [84, 92], padaczka [23], czy zespół stresu pourazowego [29]. Wykazano istotne różnice w obecności oscylacji w paśmie theta u pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu do osób zdrowych [32]. Istnieje ściśle powiązanie między silnym stresem a aktywnością theta związaną z procesami pamięciowymi [33]. W 2015 r. udowodniono też, że wśród pacjentów wykazujących objawy zespołu stresu pourazowego (stany lękowe, czy depresyjne) istnieje atypowy wzrost synchronizacji EEG w paśmie theta [29].

W badaniach rytmicznej aktywności ośrodkowego układu nerwowego, a zwłaszcza rytmu theta, głównym materiałem badawczym są gryzonie [38, 64], u których częstotliwość rytmu mieści się w przedziale 3-12 Hz [3]. Rytm u gryzoni ma regularny, sinusoidalny przebieg i oprócz procesów pamięciowych [3, 31, 95], czy nawigacji w przestrzeni (podobnie jak u ludzi) [95, 99], dodatkowo jest powiązany z aktywnością ruchową i integracją czuciowo-ruchową [8] oraz zjawiskiem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (long term potentiation) [40, 41]. Taki wzorzec synchronizacyjny może być rejestrowany u szczurów z różnych struktur układu nerwowego, jednak najczęściej badania rytmu prowadzi się w korze limbicznej, głównie w formacji hipokampa (hippocampal formation; HPC) [18, 22, 91].

Ze względu na podłoże neurochemiczne oraz powiązania behawioralne, u gryzoni rytm theta można podzielić na dwa typy. Rytm theta typu 1 (7-12 Hz) ma charakter niecholinergiczny, znoszony jest po podaniu większości anestetyków i powiązany z aktywnością ruchową zwierzęcia. Rytm theta typu 2 (4-7 Hz) ma charakter cholinergiczny, nie jest tłumiony przez związki anestetyczne i rejestrowany jest podczas znieczulenia zwierzęcia [3, 35, 61, 90]. Ze względu na oporność na anestetyki, ten typ rytmu może być obserwowany również u zwierząt w narkozie uretanowej [67]. Badania prowadzone w ostatnich 20 latach wykazały również, że typ 2 rytmu theta może być rejestrowany w odnerwionych preparatach HPC utrzymywanych w warunkach *in vitro* [61, 62].

Generowaniu polowych oscylacji theta w strukturach układu limbicznego towarzyszą wyładowania swoistej grupy neuronów, które określono mianem komórek związanych z rytmem theta. Colom i Bland w 1987 r. stworzyli kompleksową klasyfikację tych neuronów [24]. Wykazali obecność w obrębie HPC dwóch typów komórek, których wyładowania wiązały się z rytmiczną aktywnością hipokampalną: neuronów theta-on (aktywnych podczas epizodów rytmu theta) oraz neuronów theta-off (aktywnych jedynie podczas zdesynchronizowanej aktywności w HPC). W każdej z tych grup wyróżniono dwa dodatkowe podtypy komórek: fazowe (wyładowujące w ściśle fazowej relacji z cyklem rejestrowanego polowo rytmu theta) i toniczne (wyładowujące w sposób niezwiązany z fazą rytmu theta). W 2006 r. klasyfikację uzupełniono o tzw. neurony bramkujące, komórki, których aktywność związana jest z przejściem sieci neuronalnej HPC ze stanu desynchronizacji do rytmicznej aktywności theta [58, 63]. Późniejsze badania

wykazały obecność komórek związanych z hipokampalnym rytmem theta w innych strukturach układu limbicznego, a także strukturach wchodzących w skład tzw. wstępującego systemu synchronizacyjnego aktywność HPC [6, 26, 50].

Obszar tylnego podwzgórza (posterior hypothalamic area; PHa) obejmuje jądro nadsuteczkwate (supramammillary nucleus; SuM) oraz jądra tylnego podwzgórza (posterior hypothalamic nuclei; PH). Liczne badania wykazały, że PHa uczestniczy m.in. w kontroli czynności lokomotoryjnych [77, 83], odpowiedzi emocjonalnej organizmu [94] i wpływa na ogólny stan pobudzenia układu nerwowego [82]. Ta część podwzgórza, przez swoje połączenia z formacją hipokampa, uczestniczy również w przetwarzaniu procesów pamięciowych [74].

Jak wspomniano wyżej, obszar tylnego podwzgórza, a zwłaszcza jądro nadsuteczkwate, pełni wiele istotnych funkcji w ośrodkowym układzie nerwowym. Wykazano, że SuM jest funkcjonalnie ściśle powiązane z formacją hipokampa, uczestnicząc w kontroli i modulowaniu aktywności bioelektrycznej tej struktury. Jest ważnym łącznikiem w drogach biegnących z pnia mózgu do obszaru przyśrodkowej przegrody i dalej do HPC, zaangażowanych w generowanie rytmu theta [37, 96]. Wykazano ponadto bezpośrednie połączenia SuM ze strukturami kontrolującymi czynności emocjonalne i percepcyjne ośrodkowego układu nerwowego, co sprawia, że jądro nadsuteczkwate jest ważną częścią sieci przekształcającej informacje w celu integracji kognitywnych i emocjonalnych aspektów zachowań celowych [75]. Udowodniono, że SuM uczestniczy w konsolidacji pamięci w zadaniach związanych z unikaniem bodźców bólowych [81], a cały obszar tylnego podwzgórza może uczestniczyć w celowej aktywności ruchowej [101] oraz w kontroli ruchów powiązanych ze stanami emocjonalnymi i motywacyjnymi [85].

Wstępujący układ synchronizujący

Aktywność bioelektryczna formacji hipokampa, głównej struktury OUN zaangażowanej w generowanie rytmu theta [3, 59, 61, 64, 78], wiąże się z pobudzeniem wielu obszarów położonych na różnych piętrach OUN. Struktury te, wpływając na generowanie w HPC oscylacji w paśmie theta, określono jako wstępujący układ synchronizujący [73, 95]. Układ ten ma swój początek w śródmózgowiu, w jądrze konarowo-mostowym nakrywki (pedunculopontine tegmental nucleus) oraz jądrze boczno-grzbietowym nakrywki (laterodorsal tegmental nucleus) [25, 78]. W jądrach tych generowana jest toniczna impulsacja, która przekazywana jest m.in. do przedniego jądra siatkowatego mostu (nucleus reticularis pontis oralis; RPO) [100] oraz do jądra niepewnego (nucleus incertus) [72]. Neurony RPO unerwiają jądro nadsuteczkwate oraz jądra tylnego podwzgórza [47], a neurony jądra niepewnego wysyłają impulsację m.in. do kory przedczołowej, przedruchowej, formacji hipokampa i jądra grzbietowego szwu (dorsal raphe nucleus) [51, 78]. Inną ze struktur wchodzących w skład układu wstępującego jest obszar przyśrodkowej przegrody (medial septum;

MS) i poprzeczny pęczek pasma przekątnego Broki (vertical limb of the diagonal band of Broca; vDBB) [4, 5, 11, 15, 16, 52, 53, 103]. MS/vDBB jest głównym elementem układu wstępującego, przekazując impulsację biegnącą z pnia mózgu i struktur międzymózgowia bezpośrednio do kory limbicznej, w tym do HPC i kory śródwęczowej (entorhinal cortex; EC) [9, 66]. Podstawową rolą, jaką pełni MS/vDBB jest przekształcanie impulsacji płynącej z niższych pięter OUN w rytmiczny wzorec aktywności przekazywany następnie do struktur limbicznych, gdzie generowana jest aktywność polowa theta [10].

Na szczególną rolę obszaru tylnego podwzgórza we wstępującym układzie synchronizacyjnym wskazywać może obecność bogatych, zwrotnych połączeń PHa z formacją hipokampa. Robert Vertes i wsp. przeprowadzili znakowanie i dokładną analizę projekcji neuronów umiejscowionych w SuM [93] oraz w PH [94]. Dowiedli, że połączenia z SuM, podobnie jak z PH, w większości biegną przez pęczek przyśrodkowy kresomózgowia, unerwiając formację hipokampa, a zwłaszcza warstwę komórek ziarnistych. Wykazano również, że aksony biegnące z PHa docierają do kilku innych struktur korowych oraz podkorowych. Badania potwierdziły, że neurony jądra nadsuteczkwatego unerwiają warstwę komórek ziarnistych zakrętu zębatego (dentate gyrus; DG), a ściśle połączenia SuM z warstwą wschodową pola CA1 oraz warstwą piramidową hipokampa właściwego [68]. Oprócz połączeń wstępujących z PHa do HPC, wykazano obecność licznych włókien zstępujących z układu septo-hipokampalnego do PH i SuM [47]. Wydaje się, że funkcją tych połączeń jest modulowanie częstotliwości wyładowań neuronów w SuM i PH, podczas rytmu theta generowanego w formacji hipokampa. Układ szlaków zstępujących może być zatem supresorem oscylacji theta w trakcie okresów desynchronizacji aktywności EEG w formacji hipokampa [47].

ROLA OBSZARU TYLNEGO PODWZGÓRZA W GENEROWANIU HIPOKAMPALNEGO RYTMU THETA

Jak opisywano wyżej, obszar tylnego podwzgórza pełni istotną rolę w systemie synchronizującym aktywność formacji hipokampa [9, 47]. Jądro nadsuteczkwate i jądra tylnego podwzgórza otrzymują bogatą projekcję z pnia mózgu i wysyłają impulsację do układu septohipokampalnego, uczestnicząc w kontroli zarówno częstotliwości [100, 101], jak i amplitudy [46, 47] rytmu theta generowanego w HPC. W ostatnich latach stosowano wiele technik eksperymentalnych mających na celu sprecyzowanie roli PHa w genezie aktywności theta w HPC. Badania te można podzielić na trzy podstawowe grupy. Pierwsza z nich polegała na przeprowadzaniu lezji (fizycznych albo chemicznych) tego obszaru i obserwacji wpływu dokonanych uszkodzeń na zdolność HPC do generowania rytmu theta. W kolejnej grupie eksperymentów wykonywano przeciwną procedurę – drażnienie elektryczne PHa, po którym analizowano wynikającą z niego odpowiedź bioelektryczną formacji hipokampa. Następny typ badań polegał na obserwacji aktywności pojedynczych neuronów PHa w powiązaniu z rytmem theta generowanym jednocześnie w HPC.

Zastosowanie tych procedur doprowadziło do szczegółowego określenia udziału obszaru tylnego podwzgórza w genezie hipokampalnych oscylacji w paśmie theta.

Wpływ inaktywacji obszaru tylnego podwzgórza na hipokampalny rytm theta

Pierwsze badania dotyczące wpływu lezji obszaru tylnego podwzgórza na hipokampalny rytm theta przeprowadzili Robinson i wsp. w 1974 r. Analizowali wpływ rozległych uszkodzeń tylnego podwzgórza na zachowanie zwierzęcia i towarzyszącą mu aktywność bioelektryczną HPC. Wyniki ich badań wskazywały, że nawet duże lezje tylnego podwzgórza nie miały znaczącego wpływu na generowanie rytmu theta w formacji hipokampa [80]. Całkowicie odmienne wyniki uzyskano w następnych badaniach, prowadzonych w 1987 r. na swobodnie poruszających się szczurach [89]. W doświadczeniach tych wykonywano lezje bocznego podwzgórza, które obejmowały również PHa. Wyniki wskazały, że uszkodzenie podwzgórza powodowało wzrost aktywności zdesynchronizowanej w hipokampalnym zapisie EEG, co świadczyło o hamującym wpływie lezji na zdolność HPC do generowania aktywności rytmicznej. Różnice obserwowane w przedstawianych badaniach mogły wynikać z różnego zasięgu dokonywanych lezji oraz mniej precyzyjnych technik badawczych stosowanych we wcześniejszych eksperymentach.

Inne badania, przeprowadzone przez Glina i wsp. w 1991 r. dotyczące wpływu uszkodzeń podwzgórza na generowanie rytmu theta w HPC, potwierdziły istotny wpływ, jaki lezje PHa wywierają na aktywność bioelektryczną formacji hipokampa. Wykazano w nich, że po uszkodzeniach przyśrodkowego obszaru podwzgórza zanika zdolność do generowania hipokampalnego rytmu theta u szczurów, a przy niekompletnych lezjach PHa, zdolność generowania rytmu theta przez formację hipokampa była zachowana. Autorzy zasugerowali, że obszary związane z modulowaniem oscylacji theta w HPC są rozproszone w obrębie całego podwzgórza [34].

W dalszych badaniach, Kirk i McNaughton wykazali, że u znieczulonych uretanem szczurów iniekcje lokalnego anestetyku (prokainy) do tylnego podwzgórza obniżały amplitudę i częstotliwość hipokampalnego rytmu theta wywołanego stymulacją elektryczną RPO [48]. Autorzy wysunęli tezę, że częstotliwość rytmu theta, generowanego w HPC w wyniku stymulacji RPO, jest kodowana w jądrze nadsuteczki. Badacze potwierdzili te wnioski w następnych badaniach [69], w których dodatkowo wykazali, że podobne blokowanie jądra nadsuteczki, u swobodnie poruszających się szczurów nie miało większego wpływu na hipokampalny rytm theta. Postawiono wniosek, że SuM jest tylko jednym z dwóch lub więcej jąder zaangażowanych w kontrolę częstotliwości rytmu theta wywołanego przez elektryczną stymulację RPO u swobodnie poruszających się szczurów.

W innych eksperymentach, Thinschmidt i wsp. [88] analizowali, u szczurów anestetyzowanych uretanem, wpływ lezji lub czasowej inaktywacji SuM (iniekcja prokainy) na

generowanie aktywności rytmicznej w HPC wywołanej drażnieniem elektrycznym struktury pnia mózgu. Wykazali, że hipokampalny rytm theta indukowany przez elektryczną stymulację RPO był znacząco osłabiony po iniekcji prokainy do PHa, zarówno jeśli chodzi o częstotliwość, jak i amplitudę. Skutek osłabienia pokrywał się z czasem anestetycznego działania prokainy w SuM i wynosił około 20 minut. Autorzy potwierdzili, że zarówno częstotliwość, jak i amplituda hipokampalnego rytmu theta wywołanego drażnieniem elektrycznym RPO są modulowane u anestetyzowanych szczurów, przez połączenia biegnące z SuM do HPC.

Cykl badań dotyczący roli obszaru tylnego podwzgórza w modulowaniu amplitudy i częstotliwości hipokampalnego rytmu theta u swobodnie poruszających się szczurów przeprowadzili Pan, McNaughton i Woodnorth na przełomie XX i XXI w. W 1997 r. Pan i McNaughton [74] przeprowadzili doświadczenia, w których chlordiazepoksyd (CDP; związek nasilający działanie receptorów GABA-ergicznymi) podawany obwodowo lub bezpośrednio do SuM, wpływał wyraźnie na parametry rytmu theta obserwowanego w HPC. Wykazano, że iniekcja CDP do SuM powodowała lekki spadek częstotliwości rytmu theta, natomiast obwodowe podanie tego związku obniżało częstotliwość hipokampalnego rytmu w większym stopniu. Autorzy wnioskowali, że poza SuM, również inne struktury muszą być zaangażowane w kodowanie częstotliwości oscylacji theta w HPC u swobodnie poruszających się zwierząt. W następnych badaniach wykazali, że efekt lezji przyśrodkowego obszaru SuM na częstotliwość rytmu theta jest różny, zależnie od aktualnego zachowania zwierzęcia. Autorzy zasugerowali, że przyśrodkowy obszar jądra nadsuteczki moduluje aktywność theta generowaną w HPC tylko w czasie niektórych typów ruchu [76]. To potwierdzało wcześniejsze badania, wykazujące znaczący udział jądra nadsuteczki w kontrolę częstotliwości hipokampalnego rytmu theta u szczurów anestetyzowanych i znacznie mniejszy udział tego obszaru w kontroli częstotliwości rytmu u zwierząt swobodnie poruszających się. W dalszych, bardziej szczegółowych doświadczeniach behawioralnych przeprowadzonych przez Woodnorth i McNaughtona w 2005 r. [101] badano różnice wpływu CDP, podawanego obwodowo oraz bezpośrednio do PH, na hipokampalny rytm theta, który generowany był podczas spontanicznej aktywności ruchowej lub podczas świadomych, ukierunkowanych aktów ruchowych. Silniejszy skutek miało podanie CDP bezpośrednio do PH i podczas ruchów świadomych wywoływało redukcję częstotliwości rytmu theta, natomiast nie miało wpływu na częstotliwość rytmu podczas ogólnej aktywności ruchowej. Wyniki wskazują, że rola jąder tylnego podwzgórza ogranicza się do kodowania częstotliwości rytmu theta tylko towarzyszącego świadomym, ukierunkowanym aktom ruchowym, a w kodowanie częstotliwości, w czasie których zaangażowany jest układ GABA-ergiczny na poziomie PH.

Podczas kolejnego etapu prac, Woodnorth i McNaughton analizowali wpływ podawanego do SuM lub PH, antagonisty receptora benzodiazepinowego – flumazenilu, na zachowanie zwierząt i hipokampalną aktywność theta

[102]. Flumazenil działa jako antagonistą CDP, hamując aktywność receptorów GABA-ergicznymi i zarówno w PH, jak i przyśrodkowym SuM przeciwdziałał zależnemu od CDP hamowaniu rytmu theta generowanego w HPC. Autorzy wnioskowali, że jądro nadsuteczkwate i jądra tylnego podwzgórza współpracują ze sobą przy kodowaniu częstotliwości theta wywołanego silną aktywacją RPO. W 2003 r. [100] ci sami badacze przeprowadzili cykl badawczy, obejmujący iniekcje prokainy do SuM i PH oraz do miejsc zlokalizowanych we wstępującym systemie synchronizującym „powyżej” i „poniżej” tych jąder. Iniekcja prokainy „powyżej” przyśrodkowego SuM (tzn. w szlakach biegnących z SuM do obszaru MS/vDBB) powodowała, w większości przypadków, spadek częstotliwości hipokampalnego rytmu theta. Podobny efekt powodowała iniekcja CDP bezpośrednio do PH i SuM, prowadząc do redukcji częstotliwości rytmu w HPC. Natomiast iniekcja CDP „poniżej” przyśrodkowego SuM (tzn. w szlakach biegnących do SuM ze struktur pnia mózgu) wywierała różne efekty, w zależności od wielkości iniekcji – częstotliwość hipokampalnego rytmu theta rosła przy małej, a malała przy dużej objętości iniekcji. Autorzy dowiedli, że u swobodnie poruszających się szczurów, w genezie hipokampalnych oscylacji theta rekrutowane mogą być też inne niż PH, a struktury zlokalizowane „powyżej” i „poniżej” we wstępującym układzie synchronizującym.

Przedstawione dane wskazują, że u anestetyzowanych zwierząt aktywnością jądra nadsuteczkwatego można kontrolować zarówno amplitudy, jak i częstotliwości hipokampalnego rytmu theta. Natomiast zwierząt swobodnie poruszających się, częstotliwość rytmu jest kontrolowana prawdopodobnie przez jądro nadsuteczkwate oraz jądra tylnego podwzgórza. Rozbieżności te najprawdopodobniej są związane z modulowaniem przez omawiane struktury PHa odmiennych typów rytmu theta zwierząt swobodnie poruszających się i tych, znajdujących się w śnie anestetycznym. Jak wspomniano we wprowadzeniu u zwierząt znajdujących się w narkozie obserwowany jest typ 2 rytmu theta (mający podłoże cholinergiczne), natomiast u swobodnie poruszających się rejestrowany jest typ 1 rytmu (o charakterze niecholinergicznym). Odmiennie podłoże neurochemiczne obu typów hipokampalnego rytmu theta może wskazywać na różne obwody i szlaki neuronalne zaangażowane w jego generowanie i modulowanie, co może być podłożem obserwowanych różnic.

Wpływ elektrycznej stymulacji obszaru tylnego podwzgórza na hipokampalny rytm theta

Już w 1968 r. Kawamura i Domino [44] przeprowadzili pierwsze badania wpływu elektrycznego drażnienia obszaru tylnego podwzgórza na hipokampalny rytm theta. Doświadczenia prowadzono na anestetyzowanych kotach, u których wcześniej dokonano chemicznych lezji przedniej części śródmózgowia. Wyniki wskazały, że elektryczna stymulacja PHa wywoływała hipokampalny rytm theta, nie wywołując jednocześnie zmian EEG w korze nowej. Autorzy zasugerowali, że obszar tylnego podwzgórza jest nie tylko główną drogą przekazywania impulsów biegnących

z tworów siatkowatego do HPC, ale też sam zawiera obwody neuronalne aktywujące tę strukturę [44]. Badacze porównali te wyniki również do swoich wcześniejszych badań nad obszarem przyśrodkowej przegrody i wskazali, że rola MS/vDBB, jako rozrusznika aktywności rytmicznej w HPC, może być sprawowana wyłącznie przy obecności impulsacji docierającej do obszaru przyśrodkowej przegrody z PHa oraz tworów siatkowatego [45].

W badaniach, prowadzonych na swobodnie poruszających się szczurach, Bland i wsp. [12] wykazali, że elektryczna stymulacja grzbietowo-przyśrodkowego obszaru tylnego podwzgórza wygenerowała rytm theta w HPC oraz indukowała ruchy głowy, bieganie, czy skakanie. W badaniach tych, wzrost siły drażnienia PHa powodował proporcjonalny wzrost częstotliwości generowanego rytmu theta. Zwiększało się też tempo biegania lub siła, z jaką inicjowany był skok. Autorzy wywnioskowali, że wstępujący układ synchronizujący aktywność rytmiczną w HPC odgrywa istotną rolę w kontroli zachowań dowolnych [12], a jedną z istotnych struktur uczestniczących w tym procesie jest PHa.

W dalszym etapie badań nad rolą PHa w genezie hipokampalnego rytmu theta, Coleman i Lindsley [21] przeprowadzili eksperymenty ze stymulacją przyśrodkowych i bocznych obszarów podwzgórza u swobodnie poruszających się szczurów. Elektryczne drażnienie obszarów przyśrodkowych PHa wywoływało hipokampalny rytm theta, a stymulacja bocznych obszarów powodowała desynchronizację aktywności w HPC. Autorzy wysunęli tezę, że dwie odrębne drogi neuronalne przebiegające przez obszar tylnego podwzgórza tworzą układy mające zwrotne połączenia z formacją hipokampa, powodując modulowanie jej aktywności bioelektrycznej, a także modyfikowanie zachowania zwierzęcia.

Następnym etapem badań było określenie roli tylnego podwzgórza i przyśrodkowej przegrody we wstępującym układzie synchronizującym aktywność HPC. Eksperymenty te miały na celu określenie wpływu do przegrodowych iniekcji prokainy oraz obwodowych iniekcji atropiny na rytm theta rejestrowany w formacji hipokampa i korze śródwęchowej. Dickson i wsp. [27] stymulowali tylne podwzgórze, co prowadziło do generowania rytmu theta nie tylko w HPC, ale również EC. Rytm, obserwowany w obu strukturach limbicznych, był blokowany zarówno przez doprzedzgodowe iniekcje prokainy, jak i obwodowe podanie atropiny. Autorzy zasugerowali, że u znieczulonych uretanem szczurów, rytm theta w EC oraz HPC jest modulowany przez impulsację o charakterze cholinergicznym, muskarynowym, biegnącą za pośrednictwem przyśrodkowej przegrody z tylnego podwzgórza. Badacze wykazali również bezpośrednią zależność między intensywnością elektrycznej stymulacji PH a częstotliwością i mocą aktywności theta rejestrowanej w EC. Postawiono tezę, że neurony w PHa modulują częstotliwość i moc rytmu theta w formacji hipokampa oraz w korze śródwęchowej. W następnych doświadczeniach, ci sami autorzy [26] dowiedli, że elektryczna stymulacja PHa znacznie zwiększa częstotliwość wyładowań komórek theta-on kory śródwęchowej podczas rytmu i hamuje

wyładowania komórek theta-off w tym rejonie podczas wysokoamplitudowej aktywności zdesynchronizowanej (large irregular activity) w HPC. Hipokampalny oraz rejestrowany w EC rytm theta, indukowany przez stymulację PHa, zanikał po podaniu prokainy do przyśrodkowej przegrody. Autorzy potwierdzili, że wstępujący układ synchronizujący aktywność theta wywiera podobne skutki zarówno na formację hipokampa, jak i korę śródwęchową.

W 1994 r. Oddie i wsp. [73] przeprowadzili serię eksperymentów mającą na celu określenie roli PHa w generowaniu hipokampalnego rytmu theta. Potwierdzono wyniki prezentowane wcześniej przez Blanda [3], wskazujące, że elektryczna stymulacja PH wywołuje aktywność rytmiczną theta w HPC, a częstotliwość rytmu rośnie wraz ze zwiększaniem intensywności bodźca elektrycznego. W badaniach tych wykazano, że czasowa inaktywacja PHa poprzez iniekcję prokainy, nie miała wpływu na częstotliwość rytmu theta wywołwanego iniekcjami karbacholu (agonisty cholinergicznego) do przyśrodkowego obszaru przegrody. Zaobserwowano natomiast znaczne zmniejszenie amplitudy hipokampalnego rytmu indukowanego karbacholem. Jednak mikroinfuzje prokainy do PHa całkowicie eliminowały spontaniczny rytm theta w formacji hipokampa lub rytm wywołany w tej strukturze elektryczną stymulacją RPO lub stymulacją czuciową (tail-pinch). Ponadto, infuzja karbacholu do jąder tylnego podwzgórza wywoływała ciągle wytwarzanie rytmu theta w HPC. Badacze wywnioskowali, że PHa jest główną częścią wstępującego układu synchronizującego i jest swojego rodzaju „tłumaczem” intensywności pobudzenia biegnącego z RPO, na wyładowania komórkowe o konkretnej częstotliwości, przekazywane następnie do obszaru przyśrodkowej przegrody i ostatecznie do formacji hipokampa [73].

Podsumowując, powyższe badania wpływu elektrycznych stymulacji obszaru tylnego podwzgórza na generowanie rytmu theta w formacji hipokampa wskazują na ważną rolę, jaką odgrywa PHa w systemie neuronalnym związanym z powstawaniem oscylacji theta w HPC. Dowiedziono, że stymulacja PHa wywołuje aktywność rytmiczną theta i moduluje parametry rytmu obserwowanego w formacji hipokampa, a także w korze śródwęchowej. Zaproponowano, że obszar tylnego podwzgórza odgrywa ważną rolę w modulowaniu intensywności pobudzenia przekazywanego z RPO do obszaru przyśrodkowej przegrody i następnie do HPC.

Neurony obszaru tylnego podwzgórza związane z hipokampalnym rytmem theta

Innym elementem badań udziału obszaru tylnego podwzgórza w modulowaniu rytmu theta obserwowanego w HPC jest analiza aktywności pojedynczych neuronów PHa w powiązaniu z hipokampalną aktywnością polową. W 1991 r. Kirk i McNaughton [49] przeprowadzali badanie EEG w HPC u szczurów anestetyzowanych uretanem, jednocześnie dokonując rejestracji tylnopodwzgórzowej aktywności komórkowej. Wzorzec aktywności pojedynczych neuronów w SuM okazał się rytmiczny i zgodny w fazie z rytmem theta rejestrowanym jednocześnie w formacji

hipokampa. Doprzegrodowe iniekcje prokainy (blokowanie MS/vDBB) znosiły rytm theta w formacji hipokampa, natomiast nie wpływały na rytmiczną aktywność komórek jądra nadsuteczkwatego. Autorzy zasugerowali, że to właśnie jądro nadsuteczkwate jest prawdopodobnym obszarem odpowiedzialnym za programowanie częstotliwości hipokampalnego theta, a sygnał z niego biegnie do formacji hipokampa przez obszar przyśrodkowej przegrody.

W 1994 r. Kocsis i Vertes [55] badali wyładowania neuronów w SuM, ciałach suteczkwatych oraz przylegających obszarach międzymózgowia, przy jednoczesnej rejestracji rytmu theta w HPC. Wykazali, że w badanych strukturach obecne były neurony, których aktywność była powiązana z rytmem lokalnie generowanym w HPC. Spośród 170 badanych komórek zarejestrowali 29, których wzorzec wyładowań był zsynchronizowany z rytmem theta obserwowanym w HPC. Potwierdzili, że SuM i MB mogą być bezpośrednio powiązane z generowaniem rytmu theta i przesyłaniem rytmicznego wzorca wyładowań do różnych części układu limbicznego i przedomózgowia [55].

Inne badania dotyczące aktywności pojedynczych neuronów obszaru tylnego podwzgórza w powiązaniu z hipokampalnym rytmem theta prowadzili Bland i wsp. w 1995 r. [7]. Autorzy wykazali obecność w PHa trzech typów neuronów: theta-on tonicznych, theta-on fazowych oraz theta-off tonicznych. Wszystkie neurony związane z hipokampalnym rytmem theta zarejestrowane w jądrach tylnego podwzgórza sklasyfikowano jako komórki theta-on toniczne, natomiast komórki rejestrowane w jądrze nadsuteczkwatym sklasyfikowano jako theta-on fazowe. Aktywność neuronów umiejscowionych między tymi obszarami sklasyfikowano jako neurony toniczne theta-off. Wyniki zbieżne z badaniami Blanda i wsp. przedstawili Kirk i wsp. w 1996 r. [50]. Autorzy zaobserwowali obecność neuronów theta-on tonicznych w PH oraz neuronów theta-on fazowych w SuM, co potwierdzało wcześniejsze obserwacje. Wykazali również, że tylnopodwzgórzowe neurony związane z hipokampalnym rytmem theta utrzymywały wzorzec wyładowań nawet po infuzji prokainy do przegrody. Po podaniu prokainy, zaobserwowano znaczący wzrost częstości wyładowań neuronów PHa, podczas elektrycznej stymulacji pnia mózgu w porównaniu do czasu przed jej podaniem. Autorzy stwierdzili, iż częstotliwość wyładowań neuronów theta-on tonicznych w PH i theta-on fazowych w SuM jest niezależna od oscylacji theta generowanych w układzie septohipokampalnym natomiast wpływa na nią informacja docierająca z pnia mózgu. Ponadto, autorzy zasugerowali, iż rola jąder tylnego podwzgórza w układzie synchronizującym polega na przesyłaniu tonicznej impulsacji do układu septohipokampalnego, natomiast funkcją jądra nadsuteczkwatego jest zmiana tonicznego pobudzenia biegnącego z RPO na rytmiczny wzorzec wyładowań. Łączne toniczne oddziaływanie PH i rytmiczne SuM prowadzą do generowania epizodów aktywności oscylacyjnej w układzie septohipokampalnym [49]. W dalszych pracach, autorzy wykazali, że związana z rytmem theta w HPC aktywność neuronów SuM i PH, była niezależna od uszkodzeń szlaków nerwowych biegnących z PHa do układu

septohipokampalnego. Pozwoliło to na wysunięcie wniosku, że aktywność neuronalna jądra nadsuteczkwatego i jąder tylnego podwzgórza jest niezależna od bezpośredniej impulsacji zstępującej z MS/vDBB i/lub formacji hipokampa, jednak może być przez nią modulowana [46, 47].

W 1997 r. Kocsis i Vertes [56] przeprowadzili badania komórkowe na anestetyzowanych uretanem szczurach. Celem eksperymentu było funkcjonalne rozróżnienie neuronów w SuM i MB oraz scharakteryzowanie ich powiązania z rytmem theta w HPC, wywołanym przez elektryczną stymulację przegrody. Wykazali, że wyładowujące rytmicznie neurony tylnego podwzgórza tworzą heterogenną grupę komórek, które są powiązane z hipokampalnym rytmem theta w różnych fazach. Sklasyfikowano cztery grupy komórek pod względem ich relacji fazowych do oscylacji theta w HPC. Pierwsze dwie grupy tworzyły komórki, których wyładowania związane były ściśle z fazą rytmu theta i pojawiały się dokładnie w dodatnim lub ujemnym szczycie fali równoległe rejestrowanego hipokampalnego rytmu. Kolejne dwie grupy neuronów generowały potencjały czynnościowe również w ścisłym związku z połową aktywnością theta w HPC, ale ich wyładowania obserwowano albo na ramieniu wstępującym albo zstępującym fali hipokampalnego potencjału połowego. Autorzy tłumaczyli takie zróżnicowanie neuronów w PHa tym, że w obszarze SuM i MB mogą znajdować się połączenia hamujące i pobudzające, docierające do tych jąder zarówno z niższych pięter układu wstępującego, jak i zwrotne z formacji hipokampa. W kolejnych pracach potwierdzili [97], metodami znakowania fluorescencyjnego, obecność silnych połączeń biegnących z SuM do układu septohipokampalnego. Szlaki te są według nich bezpośrednio zaangażowane w generowanie hipokampalnego rytmu theta, przez co również w funkcje pamięciowe i przestrzenne sprawowane przez HPC. Na kolejnym etapie badań, Kocsis i Kaminski [54] przedstawili pogłębioną analizę współdziałania neuronów związanych z rytmem theta rejestrowanym w układzie septohipokampalnym. Wykazali, że aktywność neuronów umiejscowionych w SuM prowadzi do generowania oscylacji theta w HPC jedynie podczas epizodów rytmu wywołanego bodźcami sensorycznymi. Natomiast przy spontanicznej aktywności theta, wyładowania neuronów SuM związanych z rytmem są kontrolowane przez zstępujące szlaki biegnące z układu septohipokampalnego. Autorzy postawili tezę, że może istnieć silna zależność między typem zachowania zwierzęcia a funkcją, jaką pełnią neurony SuM w generowaniu oscylacji theta obserwowanych w korze limbicznej. Dalsze badania Kocsisa i wsp. potwierdziły heterogenność neuronów jądra nadsuteczkwatego, związanych z hipokampalną aktywnością oscylacyjną theta [53].

Podsumowując, badania nad aktywnością pojedynczych neuronów w obszarze tylnego podwzgórza związanych z rytmem theta w HPC wskazują na istotny udział PHa w generowaniu tego wzorca EEG. Dowiedziono, że aktywność neuronów PHa związanych z hipokampalnym rytmem theta jest niezależna od impulsacji z obszaru przyśrodkowej przegrody, ale może być przez nią modulowana.

To najprawdopodobniej jądro nadsuteczkwate jest strukturą w dużej części odpowiedzialną za programowanie częstotliwości rytmu theta w HPC, a jądra tylnego podwzgórza odpowiadają za przesyłanie tonicznej impulsacji z RPO do układu septohipokampalnego.

OBZAR TYLNEGO PODWZGÓRZA JAKO NIEZALEŻNY GENERATOR RYTMU THETA

Przedstawione wcześniej wyniki badań wskazują na istotną rolę, jaką obszar tylnego podwzgórza odgrywa w generowaniu rytmicznych oscylacji theta w korze limbicznej, a zwłaszcza w formacji hipokampa. Jednak już od początku lat 70. ubiegłego wieku pojawiają się doniesienia, że PHa może pełnić nie tylko rolę modulatora hipokampalnego rytmu theta, ale tworzyć obszar, którego obwody neuronalne mogą samodzielnie generować aktywność rytmiczną.

Pierwsze informacje o rytmie theta generowanym lokalnie w rejonie tylnego podwzgórza pojawiły się w badaniach Komisaruka [57]. Zarejestrował wyraźne epizody rytmicznej aktywności theta i towarzyszące mu wyładowania komórkowe, zarówno w hipokampie, jak i ciałach suteczkwatych u szczurów ze zniesioną farmakologicznie aktywnością ruchową. Dane przedstawiane przez autora wskazywały, że rytm theta obserwowany lokalnie w tylnej i brzusznej części podwzgórza był ściśle skorelowany z rytmem rejestrowanym jednocześnie w formacji hipokampa. Sławińska i Kasicki [85] wykazali, że rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza może być rejestrowany również u zwierząt swobodnie poruszających się. Zaobserwowali ściśle powiązanie rytmu theta rejestrowanego w PHa z aktualnym stanem behawioralnym zwierzęcia. Synchronizacja theta zaczynała się od rozpoczęcia ruchu i nigdy nie występowała, kiedy zwierzę pozostawało nieruchome.

Obecność rytmu theta rejestrowanego lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza potwierdzili również Kocsis i Vertes [56]. Analizowali aktywność rytmiczną obserwowaną w PHa po stymulacji czuciowej (tail-pinch) u szczurów znieczulonych uretanem, jednocześnie rejestrując aktywność połową w HPC. Wykazali, że oscylacje w paśmie theta rejestrowane w obszarze tylnego podwzgórza są powiązane z hipokampalną aktywnością theta. Zasugerowali, że rytm theta obserwowany w obszarze tylnego podwzgórza może być wynikiem impulsacji zstępującej, biegnącej z formacji hipokampa lub obszaru przyśrodkowej przegrody do PHa.

Pierwsze kompleksowe badania dotyczące rytmu theta generowanego lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza przeprowadzili Kowalczyk i wsp. [60]. Doświadczenia prowadzone były na modelach: znieczulonych uretanem szczurów oraz skrawków mózgowych *in vitro*. W obu modelach doświadczalnych wykazano zdolność PHa do lokalnego generowania rytmu theta o podłożu cholinergicznym muskarynowym. Eksperymenty prowadzone na modelu *in vivo* pozwoliły na wysunięcie wniosku, że rytm theta może być rejestrowany jednocześnie z obszaru tylnego podwzgórza oraz formacji hipokampa, natomiast oba wzorce aktywności oscylacyjnej generowane są niezależne. Rytm theta

obserwowany w tych badaniach w PHa różnił się częstotliwością od rejestrowanego jednocześnie w HPC. Wyniki te zostały potwierdzone w modelu *in vitro*, gdzie w całkowicie odnerwionych preparatach PHa, pozbawionych połączeń aferentnych z innymi strukturami mózgu, zarejestrowano rytmiczne oscylacje theta wywołane drażnieniem cholinergicznym.

W innych badaniach nad rytmem theta rejestrowanym lokalnie z obszaru tylnego podwzgórza [14, 63], analizowano wzorce wyładowań pojedynczych neuronów PHa w powiązaniu z lokalnie rejestrowaną połową aktywności oscylacyjną. W doświadczeniach prowadzonych w warunkach *in vivo* (szczury znieczulone uretanem) oraz *in vitro* (skrawki PHa) zarejestrowano aktywność trzech znanych wcześniej typów neuronów, których aktywność była związana z lokalnie generowanymi oscylacjami theta: komórek theta-on fazowych i tonicznych oraz komórek theta-off [14, 63].

Badania wykazały po raz pierwszy, że w jądrze nadsuteczki oraz jądrach tylnego podwzgórza obecna jest grupa neuronów, których aktywność jest ściśle powiązana z lokalnym rytmem theta występującym w PHa. Udowodniono ponadto, że neurony te można sklasyfikować według wcześniej przyjętej charakterystyki komórek theta-zależnych [24]. Najważniejszym odkryciem było opisanie nowej, nieznanej wcześniej grupy komórek obszaru tylnego podwzgórza, tzw. „timing cells” – charakteryzujących się regularnym wzorcem wyładowań o stałej częstotliwości. Autorzy zasugerowali, że mogą być istotnym elementem wstępującego systemu synchronizującego, związanym z przekształceniem tonicznego pobudzenia biegnącego z pnia mózgu na rytmiczny wzorec wyładowań wysyłany z PHa do układu septohipokampalnego [14, 63].

W dalszym etapie badań określano rozwój aktywności neuronów związanych z lokalnym rytmem theta w PHa w okresie pourodzeniowym [19]. Wykazano, że wraz ze stopniowym rozwojem tylnopodwzgórzowego rytmu theta, zachodzącym między 8 a 24 dniem po urodzeniu, stwierdzany jest proporcjonalny wzrost liczby rejestrowanych neuronów, których wzorec wyładowań powiązany jest z rytmem. Liczba obserwowanych komórek theta-on oraz „timing cells” stopniowo rosła, aż do osiągnięcia parametrów charakterystycznych dla zwierząt dorosłych około 24 dnia po urodzeniu [19].

W kolejnych doświadczeniach [13], ci sami badacze określali wpływ modulowania aktywności synaps elektrycznych na zdolność PHa do samodzielnego generowania rytmu theta. Wykazano, że podanie blokera synaps elektrycznych – karbenoksolonu (CBX), nie zniosło cholinergicznie indukowanego rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza w skrawkach PHa *in vitro*, ani u szczurów anestetyzowanych uretanem. Amplituda rejestrowanej aktywności theta była zwiększona po podaniu CBX. Wyniki te wskazują, że generowanie rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza nie jest związane z przekazywaniem informacji w obwodach neuronalnych tylnego podwzgórza przez synapsy elektryczne. Niewyjaśniony pozostawał wzrost

amplitudy tylnopodwzgórzowego rytmu theta po podaniu blokera synaps elektrycznych. Wcześniejsze dane literaturowe wskazują, że karbenoksolon, oprócz oddziaływania na synapsy elektryczne, jest także agonistą receptorów mineralokortykosteroidowych [42]. Autorzy postawili tezę, że zaobserwowany wzrost amplitudy rejestrowanego rytmu theta mógł być związany z mineralokortykoidowym oddziaływaniem CBX. W związku z tym, w dalszym etapie badań, zastosowano spironolakton (SPL; antagonistę receptorów mineralokortykoidowych). Iniekcja SPL u szczurów anestetyzowanych uretanem i perfuzja preparatów *in vitro* roztworem SPL hamowały skutek wzmocnienia tylnopodwzgórzowego rytmu theta wywołany przez CBX. Stąd autorzy zasugerowali, że w pobudzającym działaniu karbenoksolonu na lokalną aktywność theta PHa mogą pośredniczyć receptory mineralokortykoidowe [13].

PODSUMOWANIE

Obszar tylnego podwzgórza jest jednym z najistotniejszych rejonów związanych z generowaniem rytmu theta w strukturach limbicznych. Przez wiele lat uważano, że jego podstawową rolą jest modulowanie hipokampalnego rytmu przez uczestnictwo we wstępującym układzie synchronizującym aktywność w HPC. Badania, dotyczące udziału obszaru tylnego podwzgórza w generowaniu hipokampalnego rytmu theta wykazały, że PHa jest istotnym elementem układu wstępującego przez przekazywanie sygnału z niższych pięter OUN do układu septohipokampalnego [11, 73] oraz modulowanie częstotliwości rytmu theta rejestrowanego w formacji hipokampa i innych strukturach limbicznych [26, 27, 49, 50, 74, 100, 101, 102].

Istnieją dane wskazujące, że rola obszaru tylnego podwzgórza w generowaniu rytmicznej aktywności theta nie sprowadza się jedynie do przewodzenia i modulowania sygnału biegnącego z pnia mózgu do układu septohipokampalnego. Już w połowie lat 70. ubiegłego wieku pojawiały się pierwsze doniesienia wskazujące, że PHa nie tylko moduluje aktywność wyższych struktur limbicznych, ale jego sieci neuronalne są zdolne do samodzielnego generowania lokalnych oscylacji theta [57, 85, 86]. Na podstawie intensywnych prac prowadzonych w ostatnich latach wykazano, że obszar tylnego podwzgórza generuje lokalny rytm theta o podłożu cholinergicznym, niezależnie od impulsacji zstępującej z formacji hipokampa [60]. Dalsze badania elektrofizjologiczne umożliwiły scharakteryzowanie wzorców wyładowań komórek PHa w zależności od lokalnie obserwowanego rytmu theta w tej strukturze [14, 19].

Obszar tylnego podwzgórza, poza opisywanym udziałem w synchronizowaniu aktywności bioelektrycznej struktur limbicznych oraz zdolnością do samodzielnego generowania rytmu theta, odgrywa wiele istotnych funkcji w ośrodkowym układzie nerwowym. Lokalny rytm theta w PHa może mieć związek z reakcjami organizmu na bodźce stresowe [39], przetwarzaniem informacji przestrzenno-pamięciowych [87], czy z kontrolą czynności wewnętrzwydzielniczych przysadki [36]. Zauważono, że oscylacje m.in. w paśmie theta obserwowane w obszarze tylnego

podwzgórza mogą się pojawiać i zanikać cyklicznie, przy czym długość jednego cyklu wynosi około 100 min [36]. Cykliczność jest zbliżona do rytmiczności uwalniania hormonu adrenokortykotropowego [20], hormonu wzrostu [43], czy katecholamin [28]. Zasugerowano, że aktywność neuronów katecholaminergicznych w PHa może modyfikować wydzielanie m.in. hormonu adrenokortykotropowego [36, 79].

Dane przedstawione w obecnym opracowaniu podsumowują udział obszaru tylnego podwzgórza w modulowaniu rytmu theta obserwowanego w formacji hipokampa i innych strukturach limbicznych. Wskazują również, że

charakteryzowanie tego obszaru międzymózgowia nie może ograniczać się jedynie do opisu jego roli w modulowaniu rytmu theta w HPC. Najnowsze dane wskazują bowiem, że obszar tylnego podwzgórza jest zdolny do samodzielnego generowania rytmu. Odkrycie lokalnego rytmu theta w PHa wiąże się z pytaniem, jakie funkcje fizjologiczne może pełnić ten wzorzec aktywności oscylacyjnej. Stąd dalsze badania powinny być skierowane na pogłębianie wiedzy na temat mechanizmów generowania lokalnego rytmu theta w PHa oraz na szukanie jego powiązań funkcjonalnych zarówno ze stanami fizjologicznymi jak i patologicznymi ośrodkowego układu nerwowego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Anderson K.L., Rajagovindan R., Ghacibeh G.A., Meador K.J., Ding M.: Theta oscillations mediate interaction between prefrontal cortex and medial temporal lobe in human memory. *Cereb. Cortex*, 2010; 20: 1604-1612
- [2] Bastiaansen M., Hagoort P.: Oscillatory neuronal dynamics during language comprehension. W: *Progress in Brain Research*. red.: C. Neuper, W. Klimesch. Elsevier, 2006; 179-196
- [3] Bland B.H.: The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.*, 1986; 26: 1-54
- [4] Bland B.H., Declerck S., Jackson J., Glasgow S., Oddie S.: Septohippocampal properties of N-methyl-D-aspartate-induced theta-band oscillation and synchrony. *Synapse*, 2007; 61: 185-197
- [5] Bland B.H., Colom L.V.: Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.*, 1993; 41: 157-208
- [6] Bland B.H., Colom L.V., Ford R.D.: Responses of septal θ -on and θ -off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region. *Brain Res. Bull.*, 1990; 24: 71-79
- [7] Bland B.H., Konopacki J., Kirk I.J., Oddie S.D., Dickson C.T.: Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethan-anesthetized rat. *J. Neurophysiol.*, 1995; 74: 322-333
- [8] Bland B.H., Oddie S.D.: Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: The case for its role in sensorimotor integration. *Behav. Brain Res.*, 2001; 127: 119-136
- [9] Bland B.H., Oddie S.D.: Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 259-273
- [10] Bland B.H., Oddie S.D., Colom L.V.: Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 3223-3237
- [11] Bland B.H., Trepel C., Oddie S.D., Kirk I.J.: Intraseptal microinfusion of muscimol: Effects on hippocampal formation theta field activity and phasic theta-ON cell discharges. *Exp. Neurol.*, 1996; 138: 286-297
- [12] Bland B.H., Vanderwolf C.H.: Diencephalic and hippocampal mechanisms of motor activity in the rat: Effects of posterior hypothalamic stimulation on behavior and hippocampal slow wave activity. *Brain Res.*, 1972; 43: 67-88
- [13] Bocian R., Caban B., Klos-Wojtczak P., Konopacki J., Kowalczyk T.: Is electrical coupling involved in the generation of posterior hypothalamic theta rhythm? *Eur. J. Neurosci.*, 2016; 44: 2324-2333
- [14] Bocian R., Klos-Wojtczak P., Caban B., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J.: Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm recorded in anesthetized rats and brain slices. *Hippocampus*, 2016; 26: 1354-1369
- [15] Borhegyi Z., Freund T.F.: Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain Res. Bull.*, 1998; 46: 453-459
- [16] Borhegyi Z., Maglóczy Z., Acsády L., Freund T.F.: The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *Neuroscience*, 1998; 82: 1053-1065
- [17] Bódizs R., Kántor S., Szabó G., Szűcs A., Erőss L., Halász P.: Rhythmic hippocampal slow oscillation characterizes REM sleep in humans. *Hippocampus*, 2001; 11: 747-753
- [18] Buzsáki G.: Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 2002; 33: 325-340
- [19] Caban B., Staszelski A., Kaźmierska P., Kowalczyk T., Konopacki J.: Postnatal development of the posterior hypothalamic theta rhythm and local cell discharges in rat brain slices. *Dev. Neurobiol.*, 2018; 78: 1049-1063
- [20] Carnes M., Lent S., Feyzi J., Hazel D.: Plasma adrenocorticotrophic hormone in the rat demonstrates three different rhythms within 24 h. *Neuroendocrinology*, 1989; 50: 17-25
- [21] Coleman J.R., Lindsley D.B.: Behavioral and hippocampal electrical changes during operant learning in cats and effects of stimulating two hypothalamic-hippocampal systems. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1977; 42: 309-331
- [22] Colgin L.L.: Rhythms of the hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2016; 17: 239-249
- [23] Colom L.V.: Septal networks: Relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 2006; 96: 609-623
- [24] Colom L.V., Bland B.H.: State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: Evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.*, 1987; 422: 277-286
- [25] Datta S., Siwek D.F.: Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *J. Neurophysiol.*, 1997; 77: 2975-2988
- [26] Dickson C.T., Kirk I.J., Oddie S.D., Bland B.H.: Classification of theta-related cells in the entorhinal cortex: Cell discharges are controlled by the ascending brainstem synchronizing pathway in parallel with hippocampal theta-related cells. *Hippocampus*, 1995; 5: 306-319
- [27] Dickson C.T., Trepel C., Bland B.H.: Extrinsic modulation of theta field activity in the entorhinal cortex of the anesthetized rat. *Hippocampus*, 1994; 4: 37-51
- [28] Dietl H., Prast H., Philippu A.: Pulsatile release of catecholamines in the hypothalamus of conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1993; 347: 28-33

- [29] Dunkley B.T., Sedge P.A., Doesburg S.M., Grodecki R.J., Jetly R., Shek P.N., Taylor M.J., Pang E.W.: Theta, mental flexibility, and post-traumatic stress disorder: Connecting in the parietal cortex. *PLoS One*, 2015; 10: e0123541
- [30] Ekstrom A.D., Caplan J.B., Ho E., Shattuck K., Fried I., Kahana M.J.: Human hippocampal theta activity during virtual navigation. *Hippocampus*, 2005; 15: 881-889
- [31] Elazar Z., Adey W.R.: Electroencephalographic correlates of learning in subcortical and cortical structures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1967; 23: 306-319
- [32] Gallego-Jutglà E., Solé-Casals J., Vialatte F.B., Dauwels J., Cichocki A.: A theta-band EEG based index for early diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2015; 43: 1175-1184
- [33] Gärtner M., Rohde-Liebenau L., Grimm S., Bajbouj M.: Working memory-related frontal theta activity is decreased under acute stress. *Psychoneuroendocrinology*, 2014; 43: 105-113
- [34] Glin L., Zernicki B., Gottesmann C.: Hippocampal and cortical EEG activity in rats with transected hypothalamus. *Brain Res. Bull.*, 1991; 27: 637-640
- [35] Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J.: Cholinergic/GABAergic interaction in the production of EEG theta oscillations in rat hippocampal formation in vitro. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1996; 56: 147-153
- [36] Grass K., Prast H., Philippu A.: Ultradian rhythm in the delta and theta frequency bands of the EEG in the posterior hypothalamus of the rat. *Neurosci. Lett.*, 1995; 191: 161-164
- [37] Gray J.A., McNaughton N.: *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press, 2003
- [38] Green J.D., Maxwell D.S., Schindler W.J., Stumpf C.: Rabbit eeg „theta” rhythm: Its anatomical source and relation to activity in single neurons. *J. Neurophysiol.*, 1960; 23: 403-420
- [39] Hata T., Nishimura Y., Kita T., Kawabata A., Itoh E.: Electrocorticogram in rats loaded with SART stress (repeated cold stress). *Jpn. J. Pharmacol.*, 1987; 45: 365-372
- [40] Huerta P.T., Lisman J.E.: Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron*, 1995; 15: 1053-1063
- [41] Huerta P.T., Lisman J.E.: Synaptic plasticity during the cholinergic theta-frequency oscillation in vitro. *Hippocampus*, 1996; 6: 58-61
- [42] Jellinck P.H., Monder C., McEwen B.S., Sakai R.R.: Differential inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by carbenoxolone in rat brain regions and peripheral tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1993; 46: 209-213
- [43] Kawakami M., Kimura F., Tsai C.W.: Relationship between the three-hour-period sleep-wakefulness cycle and growth hormone secretion in the immature rat. *J. Physiol.*, 1984; 348: 271-283
- [44] Kawamura H., Domino E.F.: Hippocampal slow („arousal”) wave activation in the rostral midbrain transected cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1968; 25: 471-480
- [45] Kawamura H., Nakamura Y., Tokizane T.: Effect of acute brain stem lesions on the electrical activities of the limbic system and neocortex. *Jpn. J. Physiol.*, 1961; 11: 564-575
- [46] Kirk I.J.: Supramammillary neural discharge patterns and hippocampal EEG. *Brain Res. Bull.*, 1997; 42: 23-26
- [47] Kirk I.J.: Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: Mechanisms and functional implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 291-302
- [48] Kirk I.J., McNaughton N.: Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus*, 1993; 3: 517-525
- [49] Kirk I.J., McNaughton N.: Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport*, 1991; 2: 723-725
- [50] Kirk I.J., Oddie S.D., Konopacki J., Bland B.H.: Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 5547-5554
- [51] Kiss J., Csáki A., Bokor H., Kocsis K., Kocsis B.: Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [(3)H]D-aspartate labeling and immunocytochemistry. *Neuroscience*, 2002; 111: 671-691
- [52] Kiss J., Csáki A., Bokor H., Shanabrough M., Leranthe C.: The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: A combined [(3)H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience*, 2000; 97: 657-669
- [53] Kocsis B.: The effect of descending theta rhythmic input from the septohippocampal system on firing in the supramammillary nucleus. *Brain Res.*, 2006; 1086: 92-97
- [54] Kocsis B., Kaminski M.: Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus*, 2006; 16: 531-540
- [55] Kocsis B., Vertes R.P.: Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J. Neurosci.*, 1994; 14: 7040-7052
- [56] Kocsis B., Vertes R.P.: Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus*, 1997; 7: 204-214
- [57] Komisaruk B.R.: Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 1970; 70: 482-492
- [58] Konopacki J., Eckersdorf B., Kowalczyk T., Gołębiewski H.: Firing cell repertoire during carbachol-induced theta rhythm in rat hippocampal formation slices. *Eur. J. Neurosci.*, 2006; 23: 1811-1818
- [59] Konopacki J., MacIver M.B., Bland B.H., Roth S.H.: Carbachol-induced EEG „theta” activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.*, 1987; 405: 196-198
- [60] Kowalczyk T., Bocian R., Caban B., Konopacki J.: Atropine-sensitive theta rhythm in the posterior hypothalamic area: In vivo and in vitro studies. *Hippocampus*, 2014; 24: 7-20
- [61] Kowalczyk T., Bocian R., Konopacki J.: The generation of theta rhythm in hippocampal formation maintained in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, 2013; 37: 679-699
- [62] Kowalczyk T., Konopacki J.: Depth amplitude and phase profiles of carbachol-induced theta in hippocampal formation slices. *Brain Res. Bull.*, 2002; 58: 569-574
- [63] Kowalczyk T., Konopacki J., Bocian R., Caban B.: Theta-related gating cells in hippocampal formation: in vivo and in vitro study. *Hippocampus*, 2013; 23: 30-39
- [64] Kramis R., Vanderwolf C.H., Bland B.H.: Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp. Neurol.*, 1975; 49: 58-85
- [65] Lega B.C., Jacobs J., Kahana M.: Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories. *Hippocampus*, 2012; 22: 748-761
- [66] Leranthe C., Carpi D., Buzsaki G., Kiss J.: The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: Morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience*, 1999; 88: 701-718
- [67] Leung L.S.: Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 275-290

- [68] Maglóczy Z., Acsády L., Freund T.F.: Principal cells are the post-synaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, 1994; 4: 322-334
- [69] McNaughton N., Logan B., Panickar K.S., Kirk I.J., Pan W.X., Brown N.T., Heenan A.: Contribution of synapses in the medial supramammillary nucleus to the frequency of hippocampal theta rhythm in freely moving rats. *Hippocampus*, 1995; 5: 534-545
- [70] Mitchell D.J., McNaughton N., Flanagan D., Kirk I.J.: Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal „theta”. *Prog. Neurobiol.*, 2008; 86: 156-185
- [71] Nishida M., Pearsall J., Buckner R.L., Walker M.P.: REM sleep, prefrontal theta, and the consolidation of human emotional memory. *Cereb. Cortex*, 2009; 19: 1158-1166
- [72] Nuñez A., Cervera-Ferri A., Olucha-Bordonau F., Ruiz-Torner A., Teruel V.: Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *Eur. J. Neurosci.*, 2006; 23: 2731-2738
- [73] Oddie S.D., Bland B.H., Colom L.V., Vertes R.P.: The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 1994; 4: 454-473
- [74] Pan W.X., McNaughton N.: The medial supramammillary nucleus, spatial learning and the frequency of hippocampal theta activity. *Brain Res.*, 1997; 764: 101-108
- [75] Pan W.X., McNaughton N.: The supramammillary area: Its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog. Neurobiol.*, 2004; 74: 127-166
- [76] Pan W.X., McNaughton N.: The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 2002; 16: 1797-1809
- [77] Parker S.M., Sinnamon H.M.: Forward locomotion elicited by electrical stimulation in the diencephalon and mesencephalon of the awake rat. *Physiol. Behav.*, 1983; 31: 581-587
- [78] Pignatelli M., Beyeler A., Leinekugel X.: Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *J. Physiol. Paris*, 2012; 106: 81-92
- [79] Plotsky P.M., Cunningham E.T.Jr., Widmaier E.P.: Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr. Rev.*, 1989; 10: 437-458
- [80] Robinson T.E., Whishaw I.Q.: Effects of posterior hypothalamic lesions on voluntary behavior and hippocampal electroencephalograms in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 1974; 86: 768-786
- [81] Shahidi S., Motamedi F., Naghdi N.: Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. *Brain Res.*, 2004; 1026: 267-274
- [82] Sieb R.A.: A brain mechanism for attention. *Med. Hypotheses*, 1990; 33: 145-153
- [83] Sinnamon H.M.: Locomotor stepping elicited by electrical stimulation of the hypothalamus persists after lesion of descending fibers of passage. *Physiol. Behav.*, 1990; 48: 261-266
- [84] Siwek M.E., Müller R., Henseler C., Trog A., Lundt A., Wormuth C., Broich K., Ehninger D., Weiergräber M., Papazoglou A.: Altered theta oscillations and aberrant cortical excitatory activity in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Neural Plast.*, 2015; 2015: 781731
- [85] Sławińska U., Kasicki S.: Theta-like rhythm in depth EEG activity of hypothalamic areas during spontaneous or electrically induced locomotion in the rat. *Brain Res.*, 1995; 678: 117-126
- [86] Sławińska U., Kasicki S.: The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain Res.*, 1998; 796: 327-331
- [87] Sziklas V., Petrides M.: Memory impairment following lesions to the mammillary region of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 1993; 5: 525-540
- [88] Thinschmidt J.S., Kinney G.G., Kocsis B.: The supramammillary nucleus: Is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience*, 1995; 67: 301-312
- [89] Trojnar W., Jurkowlaniec E., Orzeł-Gryglewska J., Tokarski J.: The effect of lateral hypothalamic lesions on spontaneous EEG pattern in rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1987; 47: 27-43
- [90] Vanderwolf C.H.: Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1969; 26: 407-418
- [91] Vanderwolf C.H.: *An Odyssey Through the Brain, Behavior and the Mind*. Springer US, 2003
- [92] Vanderwolf C.H., Baker G.B.: Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, non-cholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent behavior. *Brain Res.*, 1986; 374: 342-356
- [93] Vertes R.P.: PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1992; 326: 595-622
- [94] Vertes R.P., Crane A.M., Colom L.V., Bland B.H.: Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1995; 359: 90-116
- [95] Vertes R.P., Kocsis B.: Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 1997; 81: 893-926
- [96] Vertes R.P., Martin G.F.: Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1988; 275: 511-541
- [97] Vertes R.P., McKenna J.T.: Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. *Synapse*, 2000; 38: 281-293
- [98] Wang X.J.: Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiol. Rev.*, 2010; 90: 1195-1268
- [99] Winson J.: Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science*, 1978; 201: 160-163
- [100] Woodnorth M.A., Kyd R.J., Logan B.J., Long M.A., McNaughton N.: Multiple hypothalamic sites control the frequency of hippocampal theta rhythm. *Hippocampus*, 2003; 13: 361-374
- [101] Woodnorth M.A., McNaughton N.: Different systems in the posterior hypothalamic nucleus of rats control theta frequency and trigger movement. *Behav. Brain Res.*, 2005; 163: 107-114
- [102] Woodnorth M.A., McNaughton N.: Benzodiazepine receptors in the medial-posterior hypothalamus mediate the reduction of hippocampal theta frequency by chlordiazepoxide. *Brain Res.*, 2002; 954: 194-201
- [103] Yoder R.M., Pang K.C.: Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus*, 2005; 15: 381-392

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.