

Received: 2012.09.11
Accepted: 2013.04.05
Published: 2013.07.15

Rytm theta rejestrowany w formacji hipokampa w warunkach pozaustrojowych*

Theta rhythm recorded in the hippocampal formation *in vitro*

Tomasz Kowalczyk, Bartosz Caban, Renata Bocian

Katedra Neurobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Rytm theta to najbardziej charakterystyczny przykład procesów oscylacyjnych i synchronizacyjnych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego. Badania prowadzone od kilkudziesięciu lat wskazują na istotne powiązanie rytmu z takimi procesami jak: nawigacja przestrzenna, pamięć operacyjna, długotrwałe wzmocnienie synaptyczne, sen REM, rozpoznawanie słów czy integracja funkcji czuciowo-ruchowych. Główną strukturą układu limbicznego związaną z generowaniem rytmu jest formacja hipokampa (HPC). Pod koniec lat 80. ub.w. wykazano, że rytmiczna aktywność wolnofalowa theta może być, w pewnych ściśle określonych warunkach, indukowana również w preparatach formacji hipokampa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych. Wyniki doświadczeń prowadzonych przez ostatnie 25 lat wskazują jednoznacznie, że rytm theta rejestrowany w skrawkach mózgowych *in vitro* odtwarza większość cech rytmu naturalnie generowanego w mózgach ssaków. Celem opracowania jest scharakteryzowanie podstawowych mechanizmów związanych z generowaniem aktywności rytmicznej theta w skrawkach HPC utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych.

Słowa kluczowe: formacja hipokampa • rytm theta • *in vitro*

Summary

Theta rhythm is the best synchronized EEG activity that can be recorded in the mammalian brain. Hippocampal formation (HPC) is considered to be the main structure involved in the generation of this activity. Numerous data indicate that theta rhythm is involved in long-term potentiation, spatial learning, spatial navigation, verbal and spatial working memory, REM sleep, locomotor activities, and sensori-motor integration. Since the discovery of cholinergically-induced theta rhythm recorded from the hippocampal formation slices, central mechanisms underlying theta generation have been successfully studied in the *in vitro* conditions. Most of *in vitro* studies have been focused on the basic question regarding the similarities between cholinergically-induced theta oscillations and theta rhythm examined in the *in vivo* conditions. The results of these experiments have clearly demonstrated that the main properties of theta rhythm in both, *in vitro* and *in vivo* preparations are similar. The present review has one main objective: to characterize the basic mechanisms underlying the generation of theta rhythm in the hippocampal formation maintained *in vitro*.

Keywords: hippocampal formation • theta rhythm • *in vitro*

* Badania przedstawione w niniejszym opracowaniu były finansowane z następujących grantów badawczych: KBN 4 P05A 06015; KBN 0081/P04/2002/23; MNiSW N N303 091834; MNiSW N N 401 2811 33; NCN 2011/01/B/NZ4/00373.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1058537>

Word count: 5376

Tables: –

Figures: 5

References: 117

Adres autora: dr Tomasz Kowalczyk, Katedra Neurobiologii UŁ, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: tokowal@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **2-HS** – 2-hydroksysaklofen; **ACSF** – sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (artificial cerebrospinal fluid); **CA1, CA3** – obszar komórek piramidowych hipokampa właściwego; **CARB** – karbenoksolon; **CHIN** – chinina; **DG** – zakręt zębaty (dentate gyrus); **EEG** – elektroencefalogram; **EPSPs** – potencjały postsynaptyczne pobudzające (excitatory postsynaptic potentials); **GABA_A, GABA_B** – podtyp receptorów kwasu gamma-aminomasłowego; **GJs** – połączenia szczelinowe (gap junctions); **HPC** – formacja hipokampa; **IPSPs** – potencjały postsynaptyczne hamujące (inhibitory postsynaptic potentials); **LIA** – wysokoamplitudowa aktywność zdesynchronizowana (large irregular activity); **LTP** – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (long-term potentiation); **M1, M2** – podtyp receptorów cholinergicznym muskarynowych; **MPOs** – rytmiczne wahania potencjału błonowego (membrane potential oscillations); **MS** – obszar przyśrodkowej przegrody (medial septum); **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy.

WPROWADZENIE

Rytm theta jest jednym z najlepiej zsynchronizowanych wzorców elektroencefalograficznych (EEG) rejestrowanych w mózgach ssaków [9,22,74]. Aktywność theta u ludzi występuje w postaci regularnych fal o częstotliwości 4-7 Hz [86,110]. Rola rytmu theta, jako wyznacznika swoistych procesów nerwowych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) nie została do końca wyjaśniona, jednak badania prowadzone od kilkudziesięciu lat wskazują na istotne powiązanie rytmu z takimi procesami jak: nawigacja przestrzenna, długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP), pamięć operacyjna, sen REM, rozpoznawanie słów czy integracja funkcji czuciowo-ruchowych [15,49,86,87]. Występowanie rytmu theta w pewnych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego u ludzi, uzasadnia sens badań tego wzorca aktywności EEG, może bowiem doprowadzić do lepszego poznania etiologii takich schorzeń jak padaczka czy choroba Alzheimera [1,26,27,51].

U szczurów, najczęściej wykorzystywanych zwierząt laboratoryjnych, rytm theta generowany jest w postaci wysokoamplitudowych fal o prawie sinusoidalnym przebiegu i częstotliwości 3-12 Hz. Aktywność theta może być rejestrowana z wielu obszarów układu limbicznego, jednak główną strukturą zaangażowaną w powstawanie tego wzorca EEG jest formacja hipokampa (HPC). Doświadczenia prowadzone w latach 70. i 80. ub.w. wykazały, że rytm theta ma charakter heterogeny. W zależności od powiązań behawioralnych, wrażliwości na anestetyki oraz podłoża neurochemicznego, można wyróżnić dwa typy rytmu. Rytm theta typu 1, rejestrowany w zakresie częstotliwości 7-12 Hz, jest powiązany z ruchem zwierzęcia, ma charakter niecholinergiczny i znoszony jest

przez większość związków anestetycznych. Z kolei rytm theta typu 2, o częstotliwości 4-7 Hz, ma podłoże cholinergiczne, obserwowany jest w stanie zneruchomienia zwierzęcia i nie jest tłumiony po podaniu anestetyków [9,18,96,97,98,106].

Generowanie rytmu theta w formacji hipokampa oraz innych strukturach układu limbicznego zależne jest od aktywacji wielu struktur, od pnia mózgu, przez międzymózgowie, aż do podstawnych części kresomózgowia, które tworzą tzw. wstępujący system synchronizujący [10,15,91,108,109]. Szlaki systemu synchronizującego mają początek w przednim jądrze siatkowatym mostu oraz jądrze konarowo-mostowym nakrywki, których włókna unerwiają tylne części międzymózgowia, głównie jądra tylnego podwzgórza oraz jądra nadśutecznowate. Wstępujące drogi nerwowe ze struktur międzymózgowia docierają następnie do obszaru przyśrodkowej przegrody (MS), stanowiącego swego rodzaju „węzeł” przekazujący pobudzenie z wstępującego systemu synchronizującego do poszczególnych struktur układu limbicznego, takich jak: kora zakrętu obręczy, kora śródwęchowa czy wreszcie formacja hipokampa. Rytmiczne impulsy, przekazywane z MS do wymienionych części układu limbicznego są bezpośrednim bodźcem do generowania w nich polowej aktywności oscylacyjnej – rytmu theta [10,15,91,108, 109].

RYTM THETA IN VITRO

Na początku lat 60. ub.w. przeprowadzono pierwsze badania, w których materiałem doświadczalnym były skrawki mózgowe utrzymywane poza ustrojem [80]. Popularność modelu *in vitro* w badaniach fizjologicznych i farmako-

logicznych OUN związana jest z zaletami technicznymi, jakie niesie ze sobą ta metoda, np. szybkie preparowanie bez potrzeby stosowania anestetyków, stabilność środowiska, w jakim utrzymywane są preparaty, bezpośrednia kontrola wzrokowa tkanki nerwowej, czy wreszcie brak zakłóceń mechanicznych wynikających z ruchów oddechowych oraz pracy serca [99]. Jedną ze struktur mózgu najczęściej wykorzystywanych w badaniach pozaustrojowych jest formacja hipokampa. Po raz pierwszy została użyta do doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vitro* już w 1972 r. [116], jednak aż do lat 80. ubiegłego wieku uważano, iż skrawki HPC utrzymywane w warunkach pozaustrojowych nie są zdolne do generowania rytmu theta [78]. Sądzono, że powstawanie aktywności oscylacyjnej w formacji hipokampa musi być związane z aktywnością wstępującego systemu synchronizującego, zatem w całkowicie odnerwionych preparatach hipokampalnych rytm theta nie może być obserwowany. Dopiero w 1987 r. wykazano, że rytmiczna aktywność wolnofalowa theta może być, w pewnych ściśle określonych warunkach, indukowana również w preparatach formacji hipokampa utrzymywanych *in vitro* [66,81]. W badaniach tych wykazano, że perfuzja skrawków hipokampalnych roztworem karbacholu (agonista receptorów cholinergicznym) skutkuje generowaniem, pojawiającym się w charakterystycznych, kilkusekundowych epizodach, rytmu theta o amplitudzie 0,1-2 mV i częstotliwości w zakresie 4-12 Hz [66]. Doświadczenia te zapoczątkowały szeroki cykl badawczy, mający na celu określenie podstawowych parametrów fizjologicznych i farmakologicznych rytmu theta generowanego *in vitro* oraz odpowiedź na pytanie, czy rytm rejestrowany w warunkach pozaustrojowych można traktować jako analog aktywności rytmicznej obserwowanej *in vivo*. Wyniki badań prowadzonych zarówno na skrawkach kory nowej [5,77], kory śródmózgowej [23,44,61], obszaru tylnego podwzgórza (Kowalczyk i wsp., niepublikowane obserwacje *in vitro*), jak i formacji hipokampa [25,36,47, 50,55,56,64,67,85,88,92,113] wskazują jednoznacznie, że rytm theta rejestrowany w skrawkach mózgowych *in vitro* odtwarza większość cech rytmu naturalnie generowanego w mózgach ssaków. Co więcej, doświadczenia prowadzone w warunkach pozaustrojowych pozwoliły wykazać szczególną rolę, jaką rytm theta odgrywa w mechanizmach plastyczności synaptycznej [49,50]. W badaniach tych udowodniono, że krótka stymulacja tężcowa (niewywołująca zmian synaptycznych) może prowadzić do indukowania zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, o ile zastosowana jest w czasie generowania w preparatach HPC rytmu theta i zgodna jest z jego dodatnią fazą. Wskazuje to na bezpośredni związek aktywności rytmicznej theta z procesami uczenia się i zapamiętywania, z którymi zjawisko LTP jest ściśle związane [49,50].

Celem opracowania jest zestawienie wyników badań nad hipokampalnym rytmem theta rejestrowanym w warunkach *in vitro*. Na podstawie tych danych postaramy się scharakteryzować podstawowe mechanizmy związane z generowaniem aktywności rytmicznej theta w skrawkach formacji hipokampa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych.

PODŁOŻE FARMAKOLOGICZNE RYTMU THETA *IN VITRO*

Podstawowym układem neuroprzebieżnikowym zaangażowanym w powstawanie rytmu theta typu 2 w warunkach *in vivo* jest układ cholinergiczny. Typ 2 rytmu blokowany jest przez obwodowe [71,107] oraz dohipokampalne [96] iniekcje siarczanu atropiny (antagonista receptorów cholinergicznym muskarynowych). Zarówno obwodowe [107], jak i lokalne [96] iniekcje fizostygminy (inhibitor cholinesterazy) indukują rytm theta u szczurów. Są dane wskazujące na zaangażowanie kolejnego systemu neurotransmisyjnego w powstawaniu typu 2 rytmu theta. Rezultaty badań neurochemicznych dowodzą, że jedynie ~50% włókien biegnących do formacji hipokampa z obszaru przysiódkowej przegrody ma naturę cholinergiczną, natomiast ~30% włókien septohipokampalnych to włókna GABA-ergiczne [2,70]. Włókna te unerwiają głównie GABA-ergiczne interneurony HPC [39, 46]. Wyniki kolejnych badań wykazują, że cholinergiczne i GABA-ergiczne włókna MS oddziałują na neurony formacji hipokampa jednocześnie – pobudzająca projekcja cholinergiczna dociera do komórek głównych HPC (piramidowych i ziarnistych), podczas gdy projekcja GABA-ergiczna hamuje GABA-ergiczne interneurony struktury. Efektem tego dynamicznego współdziałania między przegrodowym systemem cholinergicznym i GABA-ergicznym, jest generowanie rytmu theta w formacji hipokampa w warunkach *in vivo* [30,100].

W 1987 r. Konopacki i wsp. wykazali, że podobnie jak w przypadku typu 2 rytmu rejestrowanego *in vivo*, rytm theta generowany w skrawkach formacji hipokampa ma podłoże cholinergiczne muskarynowe. Rytm wywołany był przez perfuzję skrawków roztworami związków procholinergicznym (karbachol, acetylocholina) i blokowany przez antagonistę receptorów cholinergicznym muskarynowych – siarczan atropiny. Jednocześnie antagonistą receptorów cholinergicznym nikotynowych – D-tubokuraryna, nie wywoływał żadnych efektów, co sugerowało swoiste muskarynowy charakter tego wzorca EEG [66]. W kolejnym etapie badań przeanalizowano współzależności układów cholinergicznym i GABA-ergicznym w generowaniu rytmu theta w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że antagonistą receptorów GABA_A – bikukulina, toruje efekt podprogowych dawek karbacholu. Blokowanie receptorów GABA_A przez bikukulinę zmniejszało hipokampalne hamowanie GABA-ergiczne, co prowadziło do powstania rytmu theta w wyniku ekspozycji preparatów na podprogową dawkę karbacholu [62]. Tak wywołany rytm theta blokowany był przez muscimol (agonista receptora GABA_A). Podobny, hamujący efekt obserwowany był po ekspozycji skrawków na działanie siarczanu atropiny [42,62]. W kolejnym cyklu doświadczalnym rytm theta wywołano przez perfuzję skrawków HPC roztworem zawierającym jedynie bikukulinę i 2-hydroksysaklofen (2-HS) (antagoniści odpowiednio: receptorów GABA_A i GABA_B) [63]. W celu określenia neurotransmisyjnych podstaw rytmu wywołanego jednocześnie perfuzją preparatów bikukuliną i 2-HS, zastosowano hemicholinę-3 – związek hamujący trans-

port choliney przez błonę komórkową, czego rezultatem jest zmniejszenie zawartości endogennej acetylocholiney [38,95]. Trzydziestominutowa premedykacja preparatów roztworem hemicholine-3 całkowicie znosiła zdolność generowania rytmu theta w skrawkach poddanych ekspozycji na mieszaninę antagonistów receptorów GABA-ergicznym (bikukulina + 2-HS). Badania wykazały zatem, że oddziaływanie endogennej acetylocholiney na receptory cholinergiczne, powiązane z zablokowaniem hamującego wpływu układu GABA-ergicznego na neurony, głównej formacji hipokampa, jest wystarczającym bodźcem do wywołania rytmu theta w skrawkach HPC [63]. Jednocześnie autorzy ci wykazali, że tak wywołany rytm jest niewrażliwy na ekspozycję preparatów na galaminę (antagonista receptorów cholinergicznych muskarynowych M2), natomiast blokowany jest przez pirenzepinę (antagonista receptorów cholinergicznych muskarynowych M1). Wyniki doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vitro* potwierdziły zatem wcześniejsze obserwacje *in vivo*, że generowanie rytmu theta w obrębie formacji hipokampa jest wynikiem współdziałania dwóch systemów neurotransmisyjnych: cholinergicznego i GABA-ergicznego [30,100]. Ponadto wykazano, że układ cholinergiczny uczestniczy w generowaniu rytmu theta poprzez oddziaływanie na receptory muskarynowe typu M1 [41,63].

WEWNĄTRZHIPOKAMPALNE GENERATORY RYTMU THETA *IN VITRO*

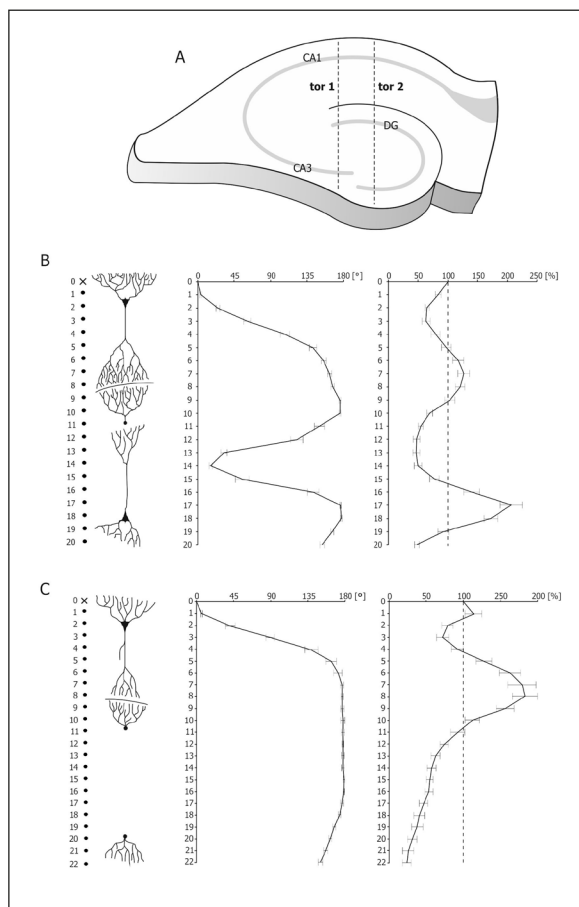
Koncepcje dotyczące generowania rytmu theta w formacji hipokampa zakładają, że potencjały polowe rejestrowane zewnątrzkomórkowo w postaci rytmicznej aktywności theta, powstają w wyniku przestrzennego sumowania synchronicznych potencjałów postsynaptycznych generowanych w poszczególnych warstwach HPC [9]. Określenie topografii potencjałów elektrottonicznych powstających w formacji hipokampa podczas generowania rytmu pozwala na identyfikację obszarów komórkowych bezpośrednio biorących udział w powstawaniu aktywności rytmicznej [9]. Badania tzw. profili warstwowych fazy oraz amplitudy rytmu theta *in vivo* prowadzone od początku lat 70 ub.w. wykazały, że istnieją dwa niezależne, wewnątrzhipokampalne generatory theta. Pierwszy z nich zlokalizowano w warstwie wschodowej pola CA1 hipokampa właściwego, a drugi w warstwie ziarnistej zakrętu zębatego (DG). Rytm theta rejestrowany z obu generatorów był odwrócony w fazie o 180° [11,17,35,114, 115]. Należy dodać, że od początku badań związanych z topografią wewnątrzhipokampalnych generatorów rytmu theta *in vivo* pojawiały się doniesienia, że obszar komórek piramidowych pola CA3 również może być zdolny do samodzielnego generowania rytmu [21,34,93].

W 1987 r. opublikowano wyniki doświadczeń prowadzonych w preparatach *in vitro*, całkowicie zgodne z powyższymi obserwacjami *in vivo* [58]. W badaniach tych stwierdzono istnienie dwóch szczytów amplitudy cholinergicznie wywołanego rytmu theta *in vitro*: pierwszego w warstwie wschodowej pola CA1 oraz drugiego w warstwie drobino-

wej DG. Dodatkowo, korzystając z modelu tzw. skrawków cząstkowych, wykazano, że pole CA1 hipokampa właściwego oraz obszar górnej blaszki zakrętu zębatego zdolne są do niezależnego generowania rytmu theta [58]. Metodą skrawków cząstkowych wykazano również, w kolejnych doświadczeniach, że w formacji hipokampa istnieje trzeci obszar zdolny do niezależnego generowania rytmu theta – pole CA3 hipokampa właściwego [59].

W kolejnych badaniach dotyczących topografii wewnątrzhipokampalnych generatorów rytmu theta rejestrowanego w warunkach pozaustrojowych posłużono się techniką profili warstwowych amplitudy i fazy. Technika ta stosowana była wcześniej w badaniach prowadzonych *in vivo* [11,17,35,114,115]. Badania topografii rytmu theta *in vitro* prowadzono w płaszczyźnie przechodzącej przez wszystkie trzy generatory rytmu, tzn. przez pole CA1, górną blaszkę DG oraz pole CA3 (ryc. 1A, tor 1) [69]. W doświadczeniach tych zarejestrowano trzy zmiany fazy rytmu theta: pierwszą, stopniową w warstwie promienistej pola CA1 oraz dwie, bardziej gwałtowne zmiany, zachodzące w grzbietowej oraz brzusznej części wnęki. Zaobserwowano jednocześnie trzy szczyty amplitudy rytmu: w warstwie wschodowej pola CA1, warstwie spłotowo-drobinowej CA1 (tuż nad bruzdą hipokampalną) oraz w okolicach warstwy piramidowej pola CA3 (ryc. 1B). W omawianych badaniach *in vitro* nie zarejestrowano szczytu amplitudy rytmu w rejonie komórek ziarnistych zakrętu zębatego. Przeciwnie, w DG obserwowano wyraźny spadek jej wartości, co sugerowało, że obszar ten może nie być zdolny do samodzielnego generowania rytmu theta [69].

Aby otrzymać dane topograficzne bezpośrednio porównywalne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w warunkach *in vivo*, w kolejnym etapie badań rejestrowano aktywność EEG *in vitro*, wzdłuż toru leżącego w identycznej płaszczyźnie, jak we wcześniejszych badaniach prowadzonych *in vivo* (ryc. 1A, tor 2) [11,17,35,114,115]. Rejestrując rytm theta wzdłuż toru biegnącego przez pole CA1 hipokampa właściwego, górną i dolną blaszkę zakrętu zębatego oraz wnękę, zaobserwowano dwa szczyty jego amplitudy – pierwszy w warstwie wschodowej i drugi w warstwie spłotowo-drobinowej pola CA1. Jednocześnie w warstwie promienistej pola CA1 zarejestrowana została pojedyncza, stopniowa zmiana fazy rytmu (ryc. 1C) [68]. Przebieg zmian fazy i amplitudy rytmu theta zarejestrowany w tych badaniach wykazywał duże podobieństwo do profilu warstwowego rytmu theta uzyskanego we wcześniejszych badaniach *in vivo*. Interesujące jest to, że podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań *in vitro* [69], drugi szczyt amplitudy zlokalizowany był nad bruzdą hipokampalną – w warstwie spłotowo-drobinowej pola CA1, natomiast w obszarze zakrętu zębatego obserwowany był wyraźny spadek amplitudy aktywności theta (ryc. 1B, C). Wyniki te, po raz kolejny wyraźnie wskazywały, że rejon komórek ziarnistych DG może nie brać udziału w procesie generowania aktywności rytmicznej w skrawkach HPC utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych.



Ryc. 1. A – lokalizacja torów elektrody rejestrującej w skrawku formacji hipokampa w badaniach profili warstwowych rytmu theta *in vitro*; B – uśredniony profil warstwowy fazy ($\pm$ SE; lewy wykres) oraz amplitudy ($\pm$ SE; prawy wykres) rytmu theta, z zaznaczonym przebiegiem elektrody rejestrującej wzdłuż drzewa dendrytycznego komórek piramidowych i ziarnistych w torze 1. Wartości amplitudy przedstawiono, jako procent wartości amplitudy rytmu theta rejestrowanego przez elektrodę stacjonarną (100% w punkcie 0). C – uśredniony profil warstwowy fazy ($\pm$ SE; lewy wykres) oraz amplitudy ($\pm$ SE; prawy wykres) rytmu theta, z zaznaczonym przebiegiem elektrody rejestrującej wzdłuż drzewa dendrytycznego komórek piramidowych i ziarnistych w torze 2. Wartości amplitudy przedstawiono, jako procent wartości amplitudy rytmu theta rejestrowanego przez elektrodę stacjonarną (100% w punkcie 0); CA1, CA3 – pola komórek piramidowych hipokampa właściwego; DG – zakręt zębaty. Szczegóły w tekście

W celu ostatecznego zweryfikowania problemu wewnątrz-hipokampalnego generatorów rytmu theta obserwowanego *in vitro* zastosowano ponownie technikę skrawków cząstkowych. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazały, że pole CA3c oraz pole CA1 hipokampa właściwego są zdolne do samodzielnego generowania rytmu theta w wyniku ekspozycji na roztwór karbacholu [68]. Jednak w żadnym z przebadanych preparatów cząstkowych, w których obszar DG pozostał w całkowitej izolacji, nie zarejestrowano aktywności rytmicznej w wyniku zastosowanego pobudzenia cholinergicznego. Stwierdzono więc, że obszar górnej blaszki zakrętu zębatego, oddzielony od dwóch pozostałych generatorów, nie wytwarza samodzielnie rytmu theta w warunkach pełnej deafferencji. Rytm theta rejestrowany z okolic komórek

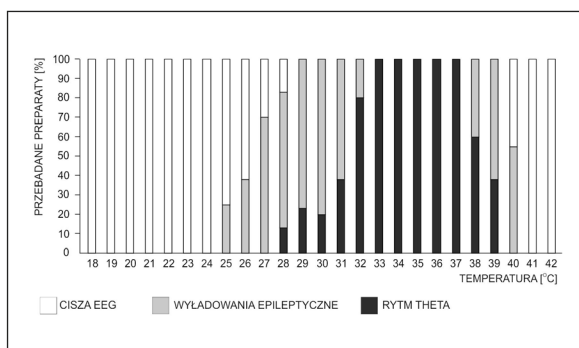
ziarnistych DG w nienaruszonym preparacie formacji hipokampa jest prawdopodobnie przewodzony biernie z innych rejonów skrawka, np. z bezpośrednio sąsiadującej z nim warstwy spłotowo-drobinowej pola CA1 [68].

WPLYW ZMIAN TEMPERATURY NA RYTM THETA *IN VITRO*

Zmiany temperatury mają istotny wpływ na większość procesów zachodzących w żywym organizmie. Pierwsze doświadczenia mające na celu badanie wpływu temperatury na czynność komórek nerwowych przeprowadzono już na początku ubiegłego stulecia [6]. Od tego czasu wykazano, że temperatura ma znaczący wpływ na takie procesy zachodzące w ośrodkowym układzie nerwowym jak: aktywność enzymatyczna i metabolizm [53,72,84], kinetyka kanałów jonowych [102], potencjał spoczynkowy i czynnościowy [3,102], czy też zjawiska zachodzące w synapsach [3, 53,84]. Badania prowadzone w warunkach *in vivo* wykazały również, że zmiany temperatury tkanki mózgowej mają istotny wpływ zarówno na amplitudę, jak i częstotliwość rejestrowanego rytmu theta [31,111,112].

Wpływ zmian temperatury na rytm theta rejestrowany w warunkach *in vitro* analizowany był w doświadczeniach, w których skrawki formacji hipokampa perfundowane były roztworem karbacholu o temperaturze 18-42°C (ryc. 2) [67]. W niskich temperaturach (18-24°C) nie zarejestrowano żadnej aktywności zsynchronizowanej („cisza EEG”). W temperaturze około 25°C, niektóre preparaty zaczęły generować nieregularną aktywność epileptyczną. Prawdopodobieństwo rejestrowania wyładowań epileptycznych rosło wraz ze wzrostem temperatury do 27°C. Dalszy wzrost temperatury spowodował istotną, jakościową zmianę rejestrowanej aktywności polowej. W niektórych preparatach pojawił się rytm theta. W temperaturze 28°C zarejestrowany był już w 12% preparatów, natomiast 70% skrawków generowało aktywność epileptyczną. Dalszy wzrost temperatury z 28 do 32°C powodował wzrost prawdopodobieństwa rejestrowania rytmu theta i jednoczesny spadek prawdopodobieństwa generowania w preparatach HPC wyładowań epileptycznych. Warto podkreślić, że w zakresie temperatur 33-37°C jedynym wzorcem aktywności EEG generowanym przez skrawki formacji hipokampa był rytm theta (ryc. 2). Dalsze podwyższanie temperatury ponownie prowadziło do wzrostu prawdopodobieństwa rejestrowania wyładowań epileptycznych. W wyższych temperaturach (41-42°C) nie obserwowano żadnego zsynchronizowanego wzorca aktywności elektroencefalograficznej [67].

W opisywanych badaniach *in vitro* szczegółowej analizie poddano następujące parametry rytmu theta: częstotliwość, amplitudę, czas trwania epizodów oraz czas trwania przerw między epizodami rytmu. Zaobserwowano liniowy wzrost częstotliwości rytmu theta skorelowany ze wzrostem temperatury w zakresie 28-32°C. Dalszy wzrost temperatury nie miał znaczącego wpływu na wartość tego parametru rytmu theta – w zakresie 33-39°C częstotliwość stabilizowała się. Odmienny wpływ zmiany temperatury miały na amplitudę rejestrowanego rytmu. W całym zakresie w jakim rejestrowany był badany



Ryc. 2. Rozkład prawdopodobieństwa rejestrowania rytmu theta, aktywności epileptycznej lub ciszy elektroencefalograficznej przedstawiony jako procent preparatów generujących odpowiedni wzorec EEG w danej temperaturze

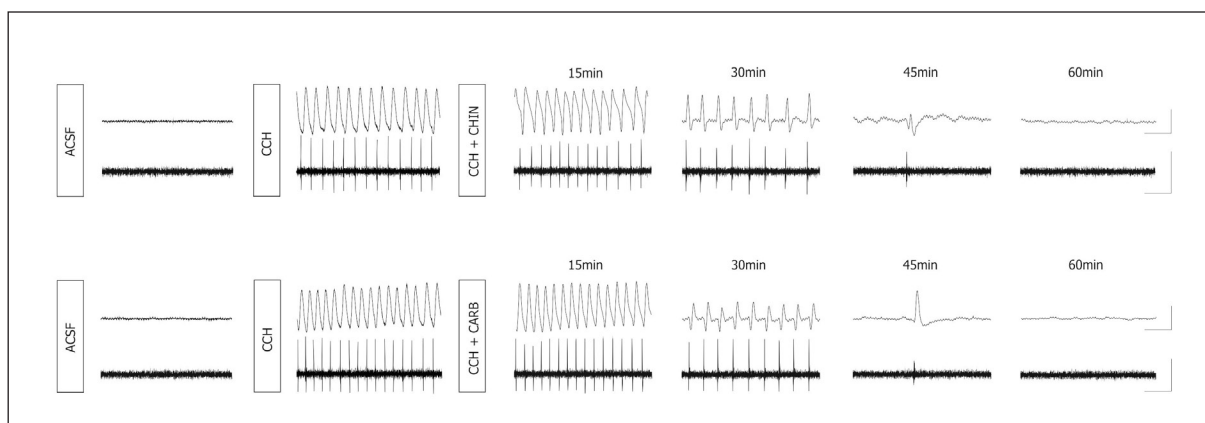
wzorzec aktywności EEG (28–39°C) jego amplituda rosła liniowo. Podobna liniowa zależność od temperatury w całym badanym zakresie dotyczyła czasu trwania epizodów rytmu theta. Czas trwania przerw między epizodami rytmu wykazywał liniową zależność od temperatury jedynie w zakresie 28–32°C, w którym ulegał on stopniowemu skracaniu. W wyższych temperaturach (33–39°C) czas trwania przerw między epizodami rytmu stabilizował się na jednym poziomie [67].

Wyniki omawianych badań wskazują, że dwa podstawowe parametry rytmu theta (częstotliwość i czas trwania przerw między epizodami), rejestrowanego w wyniku cholinergicznego pobudzenia preparatów formacji hipokampa *in vitro*, stabilizują się na optymalnym poziomie w zakresie temperatur 33–37°C. Sugeruje to, że temperatura tkanki mózgowej może mieć bezpośredni wpływ na mechanizmy synchronizacyjne w sieciach neuronalnych formacji hipokampa, powodując zmianę aktualnie generowanego wzorca EEG (przejście aktywności epileptycznej w rytm theta w temperaturze ~33°C i rytmu theta w epilepsję w temperaturze ~37°C) [67].

UDZIAŁ SYNAPS ELEKTRYCZNYCH W GENEROWANIU RYTMU THETA *IN VITRO*

Synapsy elektryczne to błonowe struktury kanałowe określone jako tzw. połączenia szczelinowe (gap junctions, GJs). Biochemiczną identyfikację białek tworzących heksagonalną strukturę głównego kanału połączenia szczelinowego (koneksonu) opisali Kumar i Gilula w 1986 r. [73]. Dzięki połączeniom szczelinowym istnieje możliwość natychmiastowego przepływu prądu jonowego między komórkami, zgodnie z różnicą potencjałów [82]. Badania prowadzone od końca lat 80. ubiegłego wieku wskazywały na istotną rolę synaps elektrycznych w powstawaniu synchronicznej aktywności EEG w ośrodkowym układzie nerwowym. W badaniach tych wykazano, że połączenia szczelinowe biorą udział w generowaniu aktywności epileptycznej [24,52], rytmu gamma [103] i tzw. szybkich oscylacji (150–200 Hz) [33]. Co ciekawe, istnieje niewiele danych doświadczalnych dotyczących udziału przewodnictwa elektrycznego w powstawaniu rytmu theta. Dopiero kilka lat temu przeprowadzono systematyczne badania dotyczące udziału połączeń szczelinowych w powstawaniu rytmu theta u swobodnie poruszających się kotów [43] oraz anestetyzowanych szczurów [19,20]. W doświadczeniach tych wykazano, że iniekcje blokerów synaps elektrycznych – karbenoksolonu lub chininy, prowadziły odpowiednio do zniesienia lub tłumienia lokalnie rejestrowanego rytmu theta. Efekt iniekcji obu związków był długotrwały, lecz w pełni odwracalny [19,43]. Iniekcje trimetyloaminy (związku otwierającego synapsy elektryczne) do HPC wywoływały dobrze zsynchronizowaną aktywność połową theta o podwyższonej amplitudzie i mocy [20]. Wyniki te wskazują, że synapsy elektryczne stanowią istotny element strukturalny, odpowiedzialny za synchronizację aktywności sieci neuronalnych formacji hipokampa, niezbędny do generowania rytmu theta w warunkach *in vivo*.

W celu przeanalizowania udziału połączeń szczelinowych w generowaniu indukowanego karbacholem rytmu the-

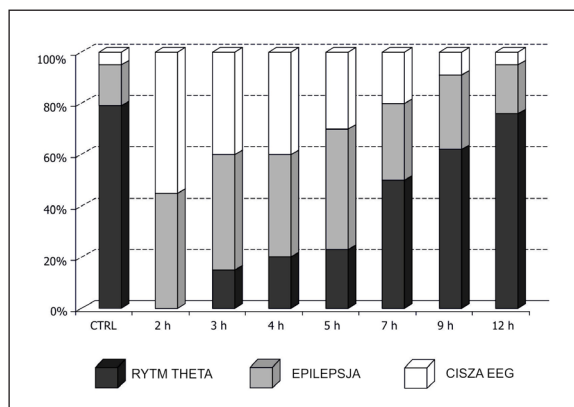


Ryc. 3. Schemat wpływu chininy (CHIN) i karbenoksolonu (CARB) na indukowany karbacholem (CCH) rytm theta oraz związaną z rytmem aktywność komórkową. Górny rząd pokazuje rozwój efektu blokującego aktywność połową oraz komórkową w odpowiedzi na perfuzję preparatów formacji hipokampa roztworem chininy (w 15, 30, 45 i 60 min od rozpoczęcia perfuzji). Dolny rząd pokazuje rozwój efektu blokującego aktywność połową oraz komórkową w odpowiedzi na perfuzję preparatów formacji hipokampa roztworem karbenoksolonu (w 15, 30, 45 i 60 min od rozpoczęcia perfuzji). Należy zwrócić uwagę, że perfuzję preparatów HPC roztworami blokerów GJs rozpoczynano, gdy w skrawkach obserwowany był rytm theta wywołany roztworem karbacholu. Kalibracja: 0,2 s, 500 mV. Szczegóły w tekście

ta oraz związanej z rytmem aktywności komórkowej *in vitro*, przeprowadzono trzy niezależne cykle badawcze. W pierwszym z nich skrawki formacji hipokampa, generujące wywołany cholinergicznym rytmem theta, poddawano perfuzji roztworami blokerów połączeń szczelinowych – chininy (CHIN) lub karbenoksolonu (CARB; ryc. 3) [65]. Perfuzja skrawków hipokampalnych wspomnianymi blokerami powodowała stopniowy zanik wywołanej wcześniej aktywności oscylacyjnej. Pełny efekt blokowania występował po 40-45 min i rozwijał się w trzech charakterystycznych fazach. W pierwszej fazie wywołany wcześniej rytm theta oraz towarzyszące mu rytmiczne wyładowania komórkowe nie ulegały zmianie. Częstotliwość wyładowań komórkowych oraz częstotliwość i amplituda rejestrowanego rytmu theta były podobne do obserwowanych w kontroli, przed perfuzją skrawków chininą lub karbenoksolonem. W drugiej fazie, pojawiającej się zazwyczaj 25-35 min od rozpoczęcia perfuzji preparatów roztworami blokerów GJs, rytm theta ulegał wyraźnej desynchronizacji, a jego częstotliwość ulegała obniżeniu. W ostatniej fazie, obserwowanej po 40-45 min od chwili rozpoczęcia perfuzji, występował całkowity zanik zarówno aktywności komórkowej, jak i połowej (ryc. 3). Blokujący wpływ chininy i karbenoksolonu nie był odwracalny: utrzymywał się nawet po 2-3 godzinach płukania skrawków w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) niezawierającym blokerów GJs [65].

Aby ocenić, czy efekt hamowania rytmu theta *in vitro* po zablokowaniu połączeń szczelinowych jest odwracalny, przeprowadzono drugi cykl badań, w którym skrawki inkubowano wstępnie w roztworze chininy lub karbenoksolonu przez 45 min [65]. Po okresie preinkubacji w roztworach blokerów połączeń szczelinowych, preparaty utrzymywano przez kolejne 1, 2 lub 3 godziny w ACSF niezawierającym blokerów GJs. W preparatach preinkubowanych przez 45 min w roztworze chininy, a następnie płukanych przez 1 godzinę w ACSF nie rejestrowano aktywności połowej ani wyładowań komórkowych po podaniu karbacholu. W preparatach płukanych przez 2 godziny w ACSF, a następnie poddanych perfuzji karbacholem, pojawiała się bardzo rzadka aktywność epileptyczna, która ulegała wyraźnemu nasileniu w preparatach płukanych w ACSF przez 3 godziny. Z kolei w skrawkach preinkubowanych przez 45 min w roztworze karbenoksolonu, a następnie płukanych przez 1 lub 2 godziny w ACSF nie rejestrowano synchronicznej aktywności EEG w odpowiedzi na drażnienie cholinergiczne, natomiast po 3 godzinach płukania, preparaty generowały jedynie rzadkie, nieregularne wyładowania epileptyczne [65]. Uzyskane wyniki wskazywały, że zablokowanie synaps elektrycznych bardzo silnie obniża stopień synchronizacji lokalnych sieci neuronalnych formacji hipokampa, a obserwowany efekt jest w znacznym stopniu nieodwracalny.

W celu ostatecznego zweryfikowania, czy wpływ blokowania synaps elektrycznych nie jest związany z uszkodzeniem tkanki i może ulec odwróceniu, przeprowadzono kolejny cykl doświadczeń [19]. W badaniach tych zwierzęta poddawano dootrzewnowej iniekcji karbenoksolonu na 1,



Ryc. 4. Rozkład prawdopodobieństwa wywołania rytmu theta lub aktywności epileptycznej perfuzją roztworem karbacholu skrawków formacji hipokampa preparowanych 2-12 godzin po dootrzewnowej iniekcji karbenoksolonu. Prawdopodobieństwo wyrażone jest jako procent preparatów przebadanych w danym przedziale czasowym. CTRL – kontrola, bez iniekcji karbenoksolonu. Szczegóły w tekście

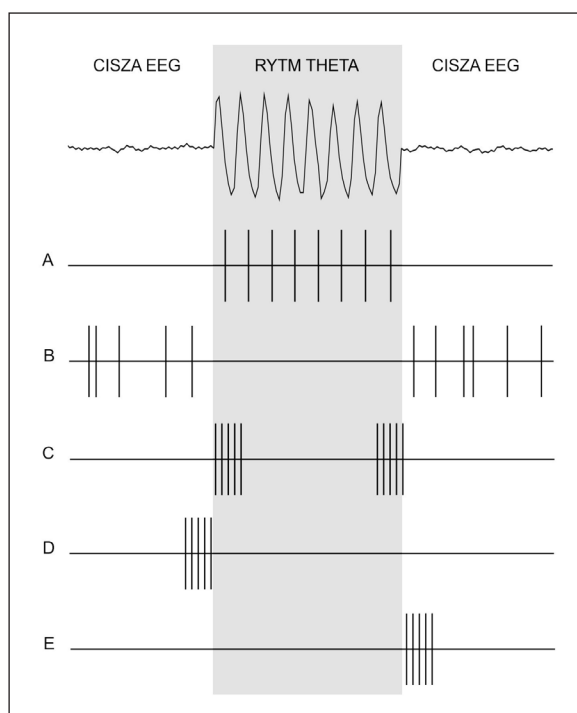
2, 3, 4, 6, 8 lub 12 godzin przed rozpoczęciem procedury preparowania skrawków HPC. Preparaty formacji hipokampa pobierane od zwierząt, u których okres odroczenia pomiędzy dootrzewnową iniekcją CARB a procedurą preparowania był krótki, nie generowały żadnej synchronicznej aktywności EEG (ryc. 4). Iniekcja CARB dokonywana 1-3 godziny przed preparowaniem skrawków, w dużym stopniu zmniejszała prawdopodobieństwo pojawienia się rytmu theta w preparatach poddanych następnie pobudzeniu cholinergicznemu. Większość preparatów nie generowała żadnej aktywności zsynchronizowanej (cisza EEG), a w niektórych występowała jedynie nieregularna aktywność epileptyczna. Wraz z wydłużaniem czasu odroczenia pomiędzy dootrzewnową iniekcją CARB, a procedurą preparowania skrawków, wzrastało prawdopodobieństwo rejestrowania rytmu theta. Gdy okres odroczenia procedury i preparowania wynosił 6-8 godzin, rytm theta rejestrowany był prawie w połowie preparatów. Całkowity powrót zdolności skrawków hipokampa do generowania rytmu theta zaobserwowano, gdy czas odroczenia procedury uzyskiwania preparatów wynosił 12 godzin (ryc. 4) [19]. Wykazano zatem, że efekt zaniku zdolności skrawków formacji hipokampa do generowania rytmu theta po zablokowaniu połączeń szczelinowych jest wydłużony, ale w pełni odwracalny. Wszystkie opisane wyżej badania wskazują, że synapsy elektryczne mają znaczący wpływ na utrzymanie optymalnego poziomu synchronizacji, niezbędnego do generowania aktywności rytmicznej w sieciach neuronalnych formacji hipokampa *in vitro*.

BADANIA AKTYWNOŚCI NEURONÓW ZWIĄZANYCH Z RYTMEM THETA *IN VITRO*

W 1960 roku dokonano pierwszych zewnątrzkomórkowych rejestracji aktywności neuronów hipokampalnych, wyładowujących rytmicznie podczas generowanego lokalnie rytmu theta [45]. Po dziesięciu latach, Macadar i wsp. wy-

różnili dwie podklasy komórek HPC związanych z rytmem. Neurony typu 1 wyładowywały rytmicznymi salwami potencjałów czynnościowych, związanymi ściśle z fazą rejestrowanego polowo rytmu. Neurony typu 2 charakteryzowały się nieregularnymi, pojedynczymi wyładowaniami, niezwiązanymi z obserwowaną polową aktywnością theta [79]. Uniwersalny system klasyfikacji neuronów, których aktywność związana jest z rytmem theta, wprowadzony został jednak dopiero w roku 1987 przez Coloma i Blanda [28]. Autorzy ci podzielili neurony o aktywności skorelowanej z rytmem theta na dwie odrębne populacje, które ze względu na relacje między generowanymi przez nie potencjałami czynnościowymi a polową aktywnością rytmiczną, określili jako komórki theta-on i theta-off. Wyznacznikiem charakteryzującym komórki theta-on jest wzrost poziomu wyładowań podczas polowego rytmu theta i brak aktywności, gdy w zapisie EEG pojawia się desynchronizacja. Komórki theta-off wyładowują podczas aktywności zdesynchronizowanej (LIA), natomiast gdy w zapisie EEG pojawia się rytm theta, pozostają nieaktywne. Oba typy komórek związanych z rytmem mają dwie podklasy – komórki toniczne oraz fazowe. Neurony fazowe charakteryzują się wyładowaniami pojawiającymi się w salwach powiązanych z fazą rejestrowanego równocześnie rytmu, podczas gdy neurony toniczne wyładowują pojedynczymi potencjałami czynnościowymi niezwiązanymi z fazą rejestrowanego polowo rytmu [12,28]. Specyficzny wzorec wyładowań komórek theta-on i theta-off opisany został w wielu strukturach OUN związanych z generowaniem aktywności rytmicznej, na przykład: w przegrodzie [16], korze obręczy [29], obszarze tylnego podwzgórza [54], korze śródwęchowej [32], obszarze mostu [109], a także w korze nowej [76]. Obecność neuronów związanych z rytmem theta w wymienionych strukturach mózgu, od pnia mózgu poczynając na korze mózgowej kończąc, pozwala przypuszczać, że stanowią one podstawę organizacji mechanizmów komórkowych, warunkujących zjawiska oscylacji i synchronizacji w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego.

Badania aktywności komórek związanych z rytmem theta rejestrowanym w warunkach *in vitro* miały na celu scharakteryzowanie wzorców wyładowań tych neuronów oraz próbę ich sklasyfikowania zgodnie z kryteriami wprowadzonymi w doświadczeniach prowadzonych wcześniej w warunkach *in vivo* [28]. W badaniach tych zarejestrowano trzy podstawowe wzorce aktywności neuronów HPC wyładowujących w czasie generowania cholinergicznego wywołanego rytmu theta obserwowanego *in vitro* [60]. Pierwszy wzorec prezentowały neurony theta-on fazowe (ryc. 5A), wyładowujące dokładnie w czasie generowanych jednocześnie epizodów polowej aktywności rytmicznej. Neurony te pozostawały „ciche” (nieaktywne) w przerwach między epizodami rytmu. Wykazano, że aktywność neuronów tej grupy związana była ściśle z fazą rejestrowanego jednocześnie rytmu theta i charakteryzowała się stałą częstotliwością wyładowań. Drugi wzorec zaobserwowano w przypadku neuronów wyładowujących jedynie w czasie przerw między epizodami rytmu. Analiza wykazała, że komórki tej grupy charakteryzowały się arytmicznymi wyładowaniami o zmiennej częstotliwości



Ryc. 5. Typy aktywności neuronów związanych z rytmem theta rejestrowanych w warunkach *in vitro*. A – schemat wyładowań neuronu theta-on fazowego. B – schemat wyładowań neuronu theta-off tonicznego. C – schemat wyładowań neuronu bramkującego A. D – schemat wyładowań neuronu bramkującego B. E – schemat wyładowań neuronu bramkującego C. Szczegóły w tekście

(ryc. 5B). Neurony te określono jako komórki theta-off toniczne [60]. Zarejestrowanie licznej populacji neuronów theta-on i theta-off w preparatach HPC utrzymywanych w warunkach *in vitro* pozwoliło wykazać, że aktywność pojedynczych neuronów, rejestrowana w czasie generowania wywołanego karbacholem rytmu theta, nie różni się zasadniczo od aktywności komórkowej obserwowanej *in vivo*, a kryteria wprowadzone do klasyfikacji zachowania neuronów związanych z rytmem theta *in vivo* [28] są w znacznej mierze uniwersalne.

Najbardziej interesującym odkryciem omawianego cyklu badań było zarejestrowanie trzeciej, nieopisywanej wcześniej grupy komórek, których aktywność różniła się znacząco od znanych wcześniej wzorców wyładowań. Wyładowania tych komórek powiązane były z pojawianiem się i zanikaniem rejestrowanych *in vitro* epizodów rytmu theta, stąd określono je mianem komórek bramkujących rytm. Komórki bramkujące typu A (ryc. 5C) wyładowywały tylko na początku i na końcu każdego kolejnego epizodu rytmu theta, podczas gdy komórki bramkujące typu B (ryc. 5D) wyładowywały w okresie bezpośrednio poprzedzającym epizody rytmu, a ich aktywność zanikała, gdy w zapisie aktywności polowej pojawiał się rytm theta [60]. W naszych niedawnych badaniach wykazaliśmy, że istnieje trzeci rodzaj neuronów bramkujących rytm. Komórki bramkujące typu C (ryc. 5E) wyładowują tylko na początku przerwy między epizodami rytmu theta (Ko-

walczyk, niepublikowane obserwacje *in vitro*). Wydaje się, że opisywane neurony bramkujące mogą pełnić funkcje związane z programowaniem w formacji hipokampa *in vitro* czasu trwania epizodów polowej aktywności theta oraz czasu trwania przerw między epizodami. Co więcej, wewnętrzny mechanizm bramkowania rytmu wydaje się uniwersalny. Wskazują na to wyniki najnowszych badań, w których po raz pierwszy wykazano obecność trzech typów komórek bramkujących również w warunkach *in vivo* – w formacji hipokampa anestetyzowanych szczurów (Kowalczyk i wsp. niepublikowane obserwacje *in vivo*).

WEWNĄTRZKOMÓRKOWE PODSTAWY RYTMU THETA *IN VITRO*

Badania wewnątrzkomórkowe wykazały, że podczas rejestrowanego polowo rytmu theta, potencjał błonowy neuronów theta-on fazowych ulega specyficznym zmianom. Zjawisko to nazwano rytmicznymi wahaniami potencjału błonowego (rhythmic membrane potential oscillations – MPOs) [4,14,40,57,75,89]. MPOs, określane często jako wewnątrzkomórkowy rytm theta, skorelowane są ściśle z fazą rejestrowanej zewnątrzkomórkowo aktywności rytmicznej i zanikają, gdy w zapisie polowym rytm theta przestaje być obserwowany [14,57]. Nie wyjaśniono dotąd, jakie mechanizmy są zaangażowane w generowanie rytmicznych wahań potencjału błonowego, istnieją jednak dane wskazujące, że główną rolę w powstawaniu MPOs odgrywają postsynaptyczne potencjały hamujące (IPSPs) generowane rytmicznie na komórkach głównych formacji hipokampa [4,37,101,117]. Jednak wyniki innych doświadczeń wskazują, że to generowanie postsynaptycznych potencjałów pobudzających (EPSPs) jest podstawą rytmicznych wahań potencjału błonowego komórek związanych z rytmem theta [40,89,90].

Rejestracje wewnątrzkomórkowe, prowadzone w preparatach hipokampalnych utrzymywanych w warunkach *in vitro*, potwierdziły obecność rytmicznych wahań potencjału błonowego w komórkach HPC podczas rejestrowanego polowo rytmu theta [25,81,83]. MPOs rejestrowane w preparatach utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych pojawiają się zgodnie z fazą rejestrowanego polowo rytmu theta i podobnie jak w preparatach *in vivo*, zanikają, gdy zanika rytm obserwowany zewnątrzkomórkowo [13]. Co ciekawe, badania prowadzone w warunkach *in vitro* pozwoliły na sformułowanie nowej, najbardziej chyba prawdopodobnej, hipotezy wyjaśniającej mechanizmy leżące u podstaw powstawania MPOs. Zgodnie z nią, rytmiczne wahania potencjału błonowego nie są związane z generowaniem potencjałów postsynaptycznych (EPSPs czy IPSPs), ale powstają jako efekt specyficznych właściwości błony komórkowej neuronów, w których są rejestrowane [12,13]. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań, w których nie zaobserwowano zaniku MPOs, mimo zablokowania transmisji synaptycznej w preparatach HPC, poprzez obniżenie poziomu jonów Ca^{2+} , Na^{+} lub perfuzję preparatów roztworem tetrodotoksyny (TTX) [83,104]. Ponadto, sama możliwość rejestrowania rytmicznych wahań potencjału błonowego w preparatach formacji hipokampa pozbawionych rytmicznej impulsacji z wstępującego systemu synchronizującego, pobudzanych tonicznie roztworem

karbacholu wskazuje, że rytmicznie generowane potencjały postsynaptyczne nie są niezbędne do generowania MPOs w neuronach formacji hipokampa [13,83,104]. Rytmicznie generowane potencjały postsynaptyczne nakładają się prawdopodobnie na endogenne MPOs komórek fazowych theta-on, modulując je w ten sposób [57].

PODSUMOWANIE

Wewnątrzhipokampalne mechanizmy generowania rytmu theta w warunkach *in vitro*

Przedstawione wyżej wyniki badań prowadzonych na modelu preparatów HPC utrzymywanych *in vitro* wskazują jednoznacznie, że rytm theta rejestrowany w warunkach pozaustrojowych stanowi odpowiednik rytmu obserwowanego w formacji hipokampa *in vivo*. Połączenie wniosków płynących z omówionych badań pozwala na przedstawienie prawdopodobnego mechanizmu generowania aktywności oscylacyjnej w obrębie skrawka formacji hipokampa.

Jak wspomniano wcześniej, w warunkach naturalnych, generowanie rytmu theta jest wynikiem aktywacji wstępującego systemu synchronizującego, który przekazuje pobudzenie do formacji hipokampa poprzez obszar przyśrodkowej przegrody [10,15, 91,108,109]. Projekcja cholinergiczna z MS powoduje toniczne pobudzanie hipokampalnych komórek theta-on (neuronów piramidowych i ziarnistych), natomiast projekcja GABA-ergiczna z tego obszaru dociera do GABA-ergicznych interneuronów HPC, zmniejszając ogólny poziom hamowania w sieciach neuronalnych odpowiadających za generowanie aktywności oscylacyjnej. Wzajemne interakcje między cholinergicznym pobudzeniem a GABA-ergicznym hamowaniem płynącym z przyśrodkowego obszaru przegrody prowadzi do generowania w formacji hipokampa aktywności oscylacyjnej (rytmu theta) lub zdesynchronizowanej (LIA) [30,100]. W preparatach formacji hipokampa utrzymywanych w warunkach pozaustrojowych cholinergiczno-GABA-ergiczne oddziaływania szlaków z przegrody zastąpione są poprzez toniczne pobudzenie cholinergiczne (perfuzja skrawków HPC roztworem karbacholu) lub toniczne pobudzenie cholinergiczne i łączne toniczne hamowanie układu GABA-ergicznego (perfuzja roztworem karbacholu i bikukuliny lub 2-hydroksysaklofenu) [42,62,63,66]. Toniczne pobudzenie cholinergiczne fazowych komórek theta-on (neuronów piramidowych obszarów CA1 i CA3), które może być połączone z tonicznym hamowaniem GABAergicznym neuronów theta-off (interneuronów), prowadzi do generowania rytmicznych wahań potencjału błonowego w komórkach fazowych theta-on. Zsumowane MPOs, powstające w neuronach piramidowych obszarów CA1 i CA3, rejestrowane są zewnątrzkomórkowo, jako polowy rytm theta [13].

Interesujące jest to, że rytm rejestrowany w warunkach *in vitro* pojawia się w postaci kilkusekundowych epizodów, przedzielonych okresami ciszy elektroencefalograficznej. Innymi słowy, mimo że pobudzenie cholinergiczne (sto-

sowane w większości badań *in vitro*) preparatów HPC jest ciągle (perfuzja roztworem karbacholu), aktywność rytmiczna pojawia się i zanika cyklicznie, podobnie jak się to dzieje w warunkach *in vivo* [9,67]. Obserwacje te wskazują, że mechanizmy związane z „włączaniem” i „wyłączaniem” stanu oscylacji w sieciach neuronalnych formacji hipokampa są zlokalizowane wewnątrz samych tych sieci, a synchronizacyjne połączenia z innych struktur mózgu (*vide* obszar przyśrodkowej przegrody) nie są niezbędne do występowania cykliczności rytmu.

Pierwszymi badaniami bezpośrednio wskazującymi, że mechanizmy związane z pojawianiem się i kontrolą długości epizodów rytmu mogą być umiejscowione w samej sieci neuronalnej formacji hipokampa były doświadczenia dotyczące wpływu temperatury na rytm theta rejestrowany w warunkach *in vitro*. W badaniach tych wykazaliśmy, że czas trwania epizodów rytmu theta wywołanego cholinergicznie w skrawkach HPC, może być modulowany przez temperaturę tkanki – wzrost poziomu temperatury powodował skracanie się epizodów rytmu theta i przerw między nimi [67]. W kolejnych doświadczeniach wykazaliśmy, że elementami neuronalnymi związanymi z procesem „włączania” i „wyłączania” epizodów oscylacji w HPC są odkryte przez nas komórki bramkujące [60]. Wydaje się, że to aktywność cholinergicznie wzbudzanych komórek bramkujących związana jest z zapoczątkowaniem i zakończeniem każdego kolejnego epizodu rytmu theta. Innymi słowy, to właśnie neurony bramkujące uruchamiają stan oscylacji w sieciach neuronalnych formacji hipokampa oraz kontrolują czas jego trwania [60]. Interesujące jest i to, że ten wewnętrzny mechanizm bramkowania długości epizodów rytmu theta oraz przerw między epizodami nie jest jedynie cechą odnerwionych sieci neuronalnych HPC utrzymywanych *in vitro*. Nasze niedawne badania wskazują, że komórki bramkujące mogą być rejestrowane również w warunkach *in vivo*, w formacji hipokampa unerwionej przez wstępujący system synchronizujący (Kowalczyk i wsp., niepublikowane obserwacje *in vivo*).

Kolejny problem wymagający komentarza, dotyczy mechanizmów związanych z utrzymaniem odpowiedniego poziomu synchronizacji poszczególnych elementów sieci neuronalnych HPC w czasie trwania epizodu rytmu theta. Okazało się, że bezpośredni udział w tym procesie mają synapsy elektryczne łączące neurony formacji hipokampa [19,65]. Wykazaliśmy, że to właśnie dzięki obecności połączeń elektrycznych możliwe jest zsynchronizowanie aktywności neuronów związanych z generowaniem rytmu w oscylacje rejestrowane połowo, jako rytm theta. Jak pisał Bennett: „dzięki połączeniom szczelinowym występującym między neuronami, wiele komórek działa z precyzją jednego neuronu” [7]. Jest to stwierdzenie prawdopodobnie najtrafniej opisujące istotę procesu synchronizacyjnego leżącego u podstaw generowania rytmu theta.

Na koniec należy podkreślić, że omówione wyżej procesy związane z uruchamianiem i utrzymywaniem stanu oscylacji w sieciach neuronalnych HPC zachodzą jedynie w dwóch obszarach preparatów formacji hipokampa *in vitro*. Wykazaliśmy mianowicie, że tylko warstwy komórek piramido-

wych pól CA1 i CA3 zdolne są do samodzielnego generowania rytmu theta w warunkach pozaustrojowych [68,69]. Powstaje zatem pytanie, dlaczego opisywany wcześniej profil warstwowy rytmu powstającego *in vitro* w dwóch generatorach, charakteryzuje się trzema szczytami amplitudy i trzema zmianami fazy (ryc. 1B). Jest to o tyle istotne, że wykazano wcześniej, iż zmiana fazy rejestrowanego rytmu jest wyznacznikiem występowania lokalnego generatora aktywności rytmicznej [35,48]. Odpowiedź na powyższe pytanie może być następująca: w skrawkach HPC umiejscowione są dwa niezależne generatory rytmu o charakterze dipoli elektrycznych. W obu tych generatorach powstaje rytm, którego faza zmienia się o 180° na długości dendrytów szczytowych komórek piramidowych (zmiana fazy w obrębie generatora). Skoro rytm theta *in vitro*, rejestrowany jednocześnie z warstwy wschodowej pola CA1 i warstwy wschodowej pola CA3, jest zawsze odwrócony w fazie o 180°, to rytm rejestrowany jednocześnie w warstwie spłotowo-drobinowej CA1 oraz rytm rejestrowany w środkowej części wnęki są również odwrócone w fazie o 180°. Odwrócenie fazy rytmu theta obserwowane między warstwą spłotowo-drobinową a warstwą dendrytów szczytowych komórek pola CA3c, jest więc jedynie zmianą bieguną, powstającą między sygnałami EEG generowanymi niezależnie w obszarach CA1 i CA3 [69]. Jeśli zaś chodzi o trzy szczyty amplitudy (ryc. 1B), to dipolarny charakter generatora rytmu [11,17,35,114, 115] zlokalizowanego w warstwie komórek piramidowych pola CA1 prowadzi do powstawania dwóch szczytów amplitudy aktywności rytmicznej (w warstwie wschodowej – na dendrytach podstawnych neuronów piramidowych CA1 i w warstwie spłotowo-drobinowej – na dendrytach szczytowych tych neuronów). Trzecie maksimum amplitudy, obserwowane jest w obszarze komórek piramidowych pola CA3. Pojedynczy szczyt amplitudy rejestrowany w tym obszarze związany jest prawdopodobnie z bardzo krótką osią dendrytów szczytowych neuronów piramidowych tego obszaru [94,105].

Przedstawione wyżej dane wskazują, że zdolność do generowania synchronicznej aktywności oscylacyjnej – rytmu theta jest atrybutem sieci neuronalnych formacji hipokampa *per se*. Toniczne pobudzenie cholinergiczne skrawków HPC prowadzi do aktywacji komórek bramkujących rytm theta – neuronów odpowiedzialnych za uruchamianie mechanizmów oscylacyjnych w formacji hipokampa. Wyładowania swoistych komórek bramkujących powodują aktywację komórek theta-on w czasie epizodu rytmu theta oraz komórek theta-off podczas przerwy między epizodami rytmu. Zsumowane rytmiczne wahania potencjału błonowego fazowych komórek theta-on obserwowane są w postaci epizodu połowego rytmu theta. Odpowiedni poziom synchronizacji elementów sieci neuronalnych formacji hipokampa, zaangażowanych w powstawanie rytmu, utrzymywany jest dzięki występowaniu między nimi połączeń szczelinowych (synaps elektrycznych). Tak generowany rytm theta charakteryzuje się swoistym profilem warstwowym powstającym w wyniku jednoczesnego generowania połowej aktywności rytmicznej w dwóch niezależnych generatorach: warstwach komórek piramidowych pól CA1 i CA3 hipokampa właściwego.

PÍSMIENICTWO

- [1] Adaya-Villanueva A., Ordaz B., Balleza-Tapia H., Márquez-Ramos A., Peña-Ortega F.: Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides*, 2010; 31: 1761-1766
- [2] Amaral D.G., Kurz J.: An analysis of the origin of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1985; 240: 37-59
- [3] Andersen P., Moser E.I.: Brain temperature and hippocampal function. *Hippocampus*, 1995; 5: 491-498
- [4] Artemenko D.P.: Participation of hippocampal neurons in the generation of theta-waves. *Neurophysiology*, 1972; 4: 531-539
- [5] Bao W., Wu J.Y.: Propagating wave and irregular dynamics: Spatiotemporal patterns of cholinergic theta oscillations in neocortex, in vitro. *J. Neurophysiol.*, 2003; 90: 333-341
- [6] Barnstein J.: Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen ströme. *Arch. Ges. Physiol.*, 1902; 92: 521-562
- [7] Bennett M.V.: Gap junctions as electrical synapses. *J. Neurocytol.*, 1997; 26: 349-366
- [8] Bianchi R., Wong R.K.: Carbachol-induced synchronized rhythmic bursts in CA3 neurons of guinea pig hippocampus in vitro. *J. Neurophysiol.*, 1994; 72: 131-138
- [9] Bland B.H.: The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.*, 1986; 26: 1-54
- [10] Bland B.H.: Medial septum: Node the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. W: *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region*. red.: Numer R. Springer Verlag. New York, 2000; 115-145
- [11] Bland B.H., Andersen P., Ganes T.: Two generators of hippocampal theta activity in rabbits. *Brain Res.*, 1975; 94: 199-218
- [12] Bland B.H., Colom L.V.: Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.*, 1993; 41: 157-208
- [13] Bland B.H., Colom L.V., Konopacki J., Roth S.H.: Intracellular records of carbachol-induced theta rhythm in hippocampal slices. *Brain Res.*, 1988; 447: 364-368
- [14] Bland B.H., Konopacki J., Dyck R.H.: Relationship between membrane potential oscillations and rhythmic discharges in identified hippocampal theta-related cells. *J. Neurophysiol.*, 2002; 88: 3046-3066
- [15] Bland B.H., Oddie S.D.: Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 259-273
- [16] 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
- [17] Bland B.H., Whishaw I.Q.: Generators and topography of hippocampal theta (RSA) in the anesthetized and freely moving rat. *Brain Res.*, 1976; 118: 259-280
- [18] Bocian R., Konopacki J.: The effect of posterior hypothalamic injection of cholinergic agents on hippocampal formation theta in freely moving cat. *Brain Res. Bull.*, 2004; 63: 283-294
- [19] Bocian R., Posłuszny A., Kowalczyk T., Gołębiewski H., Konopacki J.: The effect of carbenoxolone on hippocampal formation theta rhythm in rats: In vitro and in vivo approaches. *Brain Res. Bull.*, 2009; 78: 290-298
- [20] Bocian R., Posłuszny A., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J.: Gap junction modulation of hippocampal formation theta and local cell discharges in anesthetized rats. *Eur. J. Neurosci.*, 2011; 33: 471-481
- [21] Buzsaki G.: Electroanatomy of the hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat. W: *Electrical activity of the archicortex*, red.: G. Buzsaki, C.H. Vanderwolf. Akademiai Kiado, Budapest, 1985; 143-164
- [22] Buzsaki G.: Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 2002; 33: 325-340
- [23] Cappaert N.L., Lopes da Silva F.H., Wadman W.J.: Septo-temporal dynamics of theta oscillations in hippocampal-entorhinal slices. *Hippocampus*, 2009; 19: 1065-1077
- [24] Carlen P.L., Skinner F., Zhang L., Naus C., Kushnir M., Perez-Velazquez J.L.: The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2000; 32: 235-241
- [25] Chapman C.A., Lacaille J.C.: Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 8637-8645
- [26] Chauviere L., Raftai N., Thinus-Blanc C., Bartolomei F., Esclapez M., Bernard C.: Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 5402-5410
- [27] Colom L.V.: Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 2006; 96: 609-623
- [28] 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
- [29] Colom L.V., Christie B.R., Bland B.H.: Cingulate cell discharges related to hippocampal EEG and their modulation by muscarinic and nicotinic agents. *Brain Res.*, 1988; 460: 329-338
- [30] Colom L.V., Nassif-Caudarella S., Dickson C.T., Smythe J.W., Bland B.H.: In vivo intrahippocampal microinfusion of carbachol and bicuculline induces theta-like oscillations in the septally deafferented hippocampus. *Hippocampus*, 1991; 1: 381-390
- [31] Deboer T., Tobler I.: Temperature dependence of EEG frequencies during natural hypothermia. *Brain Res.*, 1995; 670: 153-156
- [32] 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
- [33] Draguhn A., Traub R.D., Schmitz D., Jefferys J.G.: Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature*, 1998; 394: 189-192
- [34] Feder R., Ranck J.B.Jr.: Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. II. Hippocampal slow waves and theta cells firing during bar pressing and other behaviors. *Exp. Neurol.*, 1973; 41: 532-555
- [35] Feenstra B.W., Holsheimer J.: Dipole-like neuronal sources of theta rhythm in dorsal hippocampus, dentate gyrus and cingulate cortex of the urethane-anesthetized rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1979; 47: 532-538
- [36] Fellous J.M., Sejnowski T.J.: Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5-2 Hz), theta (5-12 Hz), and gamma (35-70 Hz) bands. *Hippocampus*, 2000; 10: 187-197
- [37] Fox S.E., Wolfson S., Ranck J.B.: Investigating of mechanisms of hippocampal theta rhythms: Approaches and progress. W: *Neurobiology of the hippocampus*, red.: W. Siefert., Academic Press, New York. 1983; 303-319
- [38] Freeman J.J., Macri J.R., Choi R.L., Jenden D.J.: Studies on the behavioral and biochemical effects of hemicholinium in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1979; 210: 91-97
- [39] Freund T.F., Antal M.: GABA-containing neurons in the septum controlled inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 1988; 336: 170-173

- [40] Fujita Y., Sato T.: Intracellular records from hippocampal pyramidal cells in rabbit during theta rhythm activity. *J. Neurophysiol.*, 1964; 27: 1012-1025
- [41] Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J.: Muscarinic (M1) mediation of hippocampal spontaneous theta rhythm in freely moving cats. *NeuroReport*, 1993; 4: 1323-1326
- [42] 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
- [43] Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J.: Electrical coupling underlies theta rhythm in freely moving cats. *Eur. J. Neurosci.*, 2006; 24: 1759-1770
- [44] Goutagny R., Manseau F., Jackson J., Danik M., Williams S.: In vitro activation of the medial septum-diagonal band complex generates atropine-sensitive and atropine-resistant hippocampal theta rhythm: an investigation using a complete septohippocampal preparation. *Hippocampus*, 2008; 18: 531-535
- [45] 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
- [46] Gulyas A.I., Seress L., Toth K., Acsady L., Antal M., Freund T.F.: GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus in the Macaque monkey. *Neuroscience*, 1991; 41: 381-390
- [47] Heynen A.J., Bilkey D.K.: Induction of RSA-like oscillations in both the in-vitro and in-vivo hippocampus. *NeuroReport*, 1991; 2: 401-404
- [48] Holsheimer J., Boer J., Lopes da Silva F.H., van Rotterdam A.: The double dipole model of theta rhythm generation: simulation of laminar field potential profiles in dorsal hippocampus of the rat. *Brain Res.*, 1982; 235: 31-50
- [49] 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
- [50] Huerta P.T., Lisman J.E.: Synaptic plasticity during the cholinergic theta-frequency oscillation in vitro. *Hippocampus*, 1996; 6: 58-61
- [51] Hyman B.T., Van Hoesen G.W., Damasio A.R., Barnes C.L.: Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 1984; 225: 1168-1170
- [52] Jahromi S.S., Wentlandt K., Piran S., Carlen P.L.: Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model. *J. Neurophysiol.*, 2002; 88: 1893-1902
- [53] Janssen R.: Thermal influences on nervous system function. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1992; 16: 399-413
- [54] Kirk I.J., Oddie S.D., Konopacki J., Bland B.H.: Evidence of differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 5547-5554
- [55] Konopacki J.: Development of oscillatory activity in the limbic cortex in vitro. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1996; 56: 407-421
- [56] Konopacki J.: Theta-like activity in the limbic cortex in vitro. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 311-323
- [57] Konopacki J., Bland B.H., Colom L.V., Oddie S.D.: In vivo intracellular correlates of hippocampal formation theta-on and theta-off cells. *Brain Res.*, 1992; 586: 247-255
- [58] Konopacki J., Bland B.H., MacIver M.B., Roth S.H.: Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators. *Brain Res.*, 1987; 436: 217-222
- [59] Konopacki J., Bland B.H., Roth S.H.: Carbachol-induced EEG „theta” in hippocampal formation slices: evidence for a third generator of theta in CA3c area. *Brain Res.*, 1988; 451: 33-42
- [60] 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
- [61] Konopacki J., Gołębiewski H.: Theta rhythms in the rat medial entorhinal cortex in vitro: evidence for involvement of muscarinic receptors. *Neurosci. Lett.*, 1992; 141: 93-96
- [62] Konopacki J., Gołębiewski H.: Theta-like activity in hippocampal formation slices: cholinergic-GABAergic interaction. *NeuroReport*, 1993; 4: 963-966
- [63] Konopacki J., Gołębiewski H., Eckersdorf B., Błaszczyk M., Grabowski R.: Theta-like activity in hippocampal formation slices: the effect of strong disinhibition of GABAA and GABAB receptors. *Brain Res.*, 1997; 775: 91-98
- [64] Konopacki J., Gołębiewski H., Eckersdorf B., Kowalczyk T., Bocian R.: In vitro recorded theta-like activity in the limbic cortex: comparison with spontaneous theta and epileptiform discharges. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2000; 60: 67-85
- [65] Konopacki J., Kowalczyk T., Gołębiewski H.: Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res.*, 2004; 1019: 270-274
- [66] 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
- [67] Kowalczyk T., Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J.: Window effect of temperature on carbachol-induced theta-like activity recorded in hippocampal formation in vitro. *Brain Res.*, 2001; 901: 184-194
- [68] Kowalczyk T., Gołębiewski H., Konopacki J.: Is the dentate gyrus an independent generator of in vitro recorded theta rhythm? *Brain Res. Bull.*, 2009; 80: 139-146
- [69] Kowalczyk T., Konopacki J.: Depth amplitude and phase profiles of carbachol-induced theta in hippocampal formation slices. *Brain Res. Bull.*, 2002; 58: 569-574
- [70] Köhler C., Chan-Palay V., Wu J.Y.: Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Ant. Embryol.*, 1984; 169: 41-44
- [71] Kramis R., Vanderwolf C.H., Bland B.H.: Two types of hippocampal rhythmic slow activity in both the rabbit and the rat: Relations to behavior and the effects of atropine, diethyl ether, urethane and pentobarbital. *Exp. Neurol.*, 1975; 49: 58-85
- [72] Krnjevic K., Walz W.: Acidosis and blockade of orthodromic responses caused by anoxia in rat hippocampal slices at different temperatures. *J. Physiol.*, 1990; 422: 127-144
- [73] Kumar N.M., Gilula N.B.: Cloning and characterisation of human and rat liver cDNAs encoding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.*, 1986; 103: 767-776
- [74] Leung L.S.: Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 275-290
- [75] Leung L.S., Yim C.Y.: Intracellular records of theta rhythm in hippocampal CA1 cells of the rat. *Brain Res.*, 1986; 367: 323-327
- [76] Lukatch H.S., MacIver M.B.: Synaptic mechanisms of thiopental-induced alterations in synchronized cortical activity. *Anesthesiology*, 1996; 84: 1425-1434
- [77] Lukatch H.S., MacIver M.B.: Physiology, pharmacology, and topography of cholinergic neocortical oscillations in vitro. *J. Neurophysiol.*, 1997; 77: 2427-2445
- [78] Lynch G., Schubert P.: The use of in vitro brain slices for multidisciplinary studies of synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1980; 3: 1-22
- [79] Macadar O., Roig J.A., Monti J.M., Budelli R.: The functional relationship between septal and hippocampal unit activity and hippocampal theta rhythm. *Physiol. Behav.*, 1970; 5: 1443-1449

- [80] MacIvlin H.: Techniques in tissue metabolism. 5. Chopping and slicing tissue samples. *Biochem. J.*, 1961; 78: 213-218
- [81] MacIver M.B., Harris D.P., Konopacki J., Roth S.H., Bland B.H.: Carbachol-induced rhythmical slow wave activity recorded from the dentate granule cells in vitro. *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 1986; 29: 159-161
- [82] MacVicar B.A., Dudek F.E.: Electrotonic coupling between pyramidal cells: a direct demonstration in rat hippocampal slices. *Science*, 1981; 213: 782-785
- [83] MacVicar B.A., Tse F.W.: Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J. Physiol.*, 1989; 417: 197-212
- [84] Masino S.A., Dunwiddie T.V.: Temperature-dependent modulation of excitatory transmission in hippocampal slices is mediated by extracellular adenosine. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 1932-1939
- [85] McMahon L.L., Williams J.H., Kauer J.A.: Functionally distinct groups of interneurons identified during rhythmic carbachol oscillations in hippocampus in vitro. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 5640-5651
- [86] 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
- [87] Natsume K., Kometani K.: Theta-activity-dependent and -independent muscarinic facilitation of long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Res.*, 1997; 27: 335-341
- [88] Natsume K., Kometani K.: Desynchronization of carbachol-induced theta-like activities by alpha-adrenergic agents in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Res.*, 1999; 33: 179-186
- [89] Núñez A., Garcia-Austt E., Buno W.Jr.: Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res.*, 1987; 416: 289-300
- [90] Núñez A., Garcia-Austt E., Buno W.: Synaptic contributions to theta rhythm genesis in rat CA1-CA3 hippocampal pyramidal neurons in vivo. *Brain Res.*, 1990; 533: 176-179
- [91] 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
- [92] Osehobo E.P., Andrew R.D.: Osmotic effects upon the theta rhythm, a natural brain oscillation in the hippocampal slice. *Exp. Neurol.*, 1993; 124: 192-199
- [93] Petsche H., Stumpf C.: Topographic and toposcopic study of origin and spread of the regular synchronized arousal pattern in the rabbit. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1960; 12: 589-600
- [94] Pyapali G.K., Sik A., Penttonen M., Buzsáki G., Turner D.A.: Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: Intracellular staining in vivo and in vitro. *J. Comp. Neurol.*, 1998; 391: 335-352
- [95] Robinson T.E., Green D.J.: Effects of hemicholinium-3 and choline on hippocampal electrical activity during immobility vs. movement. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1980; 50: 314-323
- [96] Rowntree C.I., Bland B.H.: An analysis of cholinergic neurons in the hippocampal formation by direct microinfusion. *Brain Res.*, 1986; 362: 98-113
- [97] Sainsbury R.S.: Type 2 theta in the guinea pig and the cat. W: *Electrical activity of the archicortex*. red.: Buzsáki G., Vanderwolf, C.H. Akademiai Kiado, Budapest, 1985; 11-22
- [98] Sainsbury R.S.: Hippocampal theta: a sensory-inhibition theory of function. *Neurosci Biobehav Rev.*, 1998; 22: 237-241
- [99] Schwartzkroin P.A.: To slice or not to slice. W: *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*, red.: G.A. Kerkut, H.V. Wheal. Academic Press, London. 1981; 143-164
- [100] Smythe J.W., Colom L.V., Bland B.H.: The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1992; 16: 289-308
- [101] Soltesz I., Deschenes M.: Low- and high-frequency membrane potential oscillations during theta activity in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus under ketamine-xylazine anesthesia. *J. Neurophysiol.*, 1993; 70: 97-116
- [102] Thompson S.M., Masukawa L.M., Prince D.A.: Temperature dependence of intrinsic membrane properties and synaptic potentials in hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurosci.*, 1985; 5: 817-824
- [103] Traub R.D., Bibbig A., Fisahn A., LeBeau F.E., Whittington M.A., Buhl E.H.: A model of gamma-frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 4093-4106
- [104] Tse F.W., MacVicar B.A.: Phosphoinositides and GTP binding proteins involved in muscarinic generation of hippocampal rhythmic slow activity. *Neurosci. Lett.*, 1989; 102: 58-63
- [105] Turner D.A., Li X.G., Pyapali G.K., Ylinen A., Buzsáki G.: Morphometric and electrical properties of reconstructed hippocampal CA3 neurons recorded in vivo. *J. Comp. Neurol.*, 1995; 356: 580-594
- [106] Vanderwolf C.H.: Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1969; 26: 407-418
- [107] Vanderwolf C.H.: Neocortical and hippocampal activation relation to behavior: Effects of atropine, eserine, phenothiazines, and amphetamine. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 1975; 88: 300-323
- [108] Vertes R.P.: An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J. Neurophysiol.*, 1981; 46: 1140-1159
- [109] Vertes R.P., Kocsis B.: Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 1997; 81: 893-926
- [110] Walter W.G., Dovey V.J.: Electro-encephalography in cases of sub-cortical tumour. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1944; 7: 57-65
- [111] Weiss T.: Effect of body temperature on theta rhythm in the rat hippocampus. *Physiol. Bohemoslov.*, 1964; 13: 246-255
- [112] Whishaw I.Q., Vanderwolf C.H.: Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering. *Physiol. Behav.*, 1971; 6: 391-397
- [113] Williams J.H., Kauer J.A.: Properties of carbachol-induced oscillatory activity in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 1997; 78: 2631-2640
- [114] Winson J.: Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1974; 36: 291-301
- [115] Winson J.: Hippocampal theta rhythm. I. Depth profiles in the curarized rat. *Brain Res.*, 1976; 103: 57-70
- [116] Yamamoto C.: Intracellular study of seizure-like afterdischarges elicited in thin hippocampal sections in vitro. *Exp. Neurol.*, 1972; 35: 154-164
- [117] Ylinen A., Soltesz I., Bragin A., Penttonen M., Sik A., Buzsáki G.: Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 1995; 5: 78-90

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.