

Stacjonarne Studia Doktoranckie  
Mikrobiologii, Biotechnologii  
i Biologii Eksperymentalnej

# **Agata Anna Szymańska**

## **Udział receptorów glutaminianergiczných i kortykosteroidowych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza**

The involvement of glutamatergic  
and corticosteroid receptors  
in the generation of theta rhythm  
in the posterior hypothalamic area

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze Neurobiologii  
Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor:  
dr. hab. Tomasz Kowalczyk, prof. UŁ

Najbardziej chciałabym podziękować mojemu Mężowi Kubie – nieskończoność Twojej wiary we mnie oraz Twoja realna pomoc były prawdopodobnie jedynymi powodami, dla których udało mi się dokończyć pisanie tej pracy.

Mojemu promotorowi, dr. hab. Tomaszowi Kowalczykowi, prof. UŁ, pragnę złożyć podziękowania za cierpliwość i merytoryczną opiekę nad pisanem pracy.

Pracownikom Katedry Neurobiologii UŁ (obecnym, jak i byłym) jestem wdzięczna za każdą pomoc, każdy uśmiech i każde dobre słowo, a szczególnie mocno chciałabym podziękować dr hab. Renacie Bocian oraz dr hab. Markowi Wieczorkowi, prof. UŁ za ogromne wsparcie przy analizie wyników.

Dziękuję mojej Mamie za wierne kibicowanie mi na tej wyboistej naukowej drodze.

Pragnę też wyrazić wdzięczność mojej Córeczce, lecz jest mi ciężko znaleźć słowa, które prawdziwie oddadzą to, co czuję.

Chciałabym też serdecznie podziękować moim przyjaciółkom, których cierpliwość do słuchania naukowych narzekań była godna podziwu.

Badania do niniejszej rozprawy doktorskiej były prowadzone i finansowane w ramach projektu OPUS 13 nr 2017/25/B/NZ4/01476 o tytule "Neuronalne i behawioralne korelaty rytmu theta generowanego w obszarze tylnego podwzgórza - badania *in vivo* oraz *in vitro*", finansowanego z funduszy Narodowego Centrum Nauki (NCN).

## SPIS TREŚCI

Alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów	1
Streszczenie w języku polskim	3
Streszczenie w języku angielskim	6
<b>1. Wstęp</b>	<b>9</b>
1.1. Oscylacje w ośrodkowym układzie nerwowym	10
1.2. Rytm theta	11
1.2.1. Rytm theta w HPC	13
1.2.2. Charakterystyka rytmu theta w różnych modelach badawczych	14
1.2.3. Neurony związane z rytmem theta	17
1.3. Wstępujący układ synchronizujący	19
1.4. Obszar tylnego podwzgórza a rytm theta	21
1.5. Wpływ hamowania aktywności PHa na hipokampalny rytm theta	23
1.6. Wpływ drażnienia elektrycznego PHa na hipokampalny rytm theta	27
1.7. Komórki PHa związane z hipokampalnym rytmem theta	30
1.8. PHa jako niezależny generator rytmu theta	34
1.8.1. Niecholinergiczne podłoże rytmu theta w PHa	37
<b>2. Cele</b>	<b>40</b>
<b>3. Materiały i metody</b>	<b>43</b>
3.1. Procedury przedeksperymentalne	44
3.1.1. Przygotowanie sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego	44
3.1.2. Przygotowanie odczynników chemicznych w celu wywołania, modulacji lub blokowania aktywności rytmicznej w skrawkach mózgowych	45
3.2. Przygotowanie preparatów obszaru tylnego podwzgórza	46
3.3. Rejestracja aktywności EEG w preparatach PHa	48
3.3.1. Wzmacnianie, filtrowanie i cyfryzacja sygnału EEG	48

3.4. Protokoły doświadczalne	50
3.4.1. Protokół I: wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznych w obszarze tylnego podwzgórza na zdolność do generowania rytmu theta	51
3.4.2. Protokół II: lokalny, glutaminianergiczny rytm theta w PHa a aktywność pojedynczych neuronów i ich charakterystyka	52
3.4.3. Protokół III: wpływ pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na lokalny, glutaminianergiczny rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza	54
3.5. Analiza parametrów rejestrowanego rytmu theta	54
<b>4. Wyniki</b>	<b>56</b>
4.1. Określenie zdolności preparatów obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych	58
4.1.1. Wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję roztworem kwasu kainowego	58
4.1.2. Wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję roztworem NMDA	61
4.1.3. Wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję roztworem AMPA	63
4.1.4. Porównanie parametrów rytmu theta wywołanego pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję kwasem kainowym i NMDA	63
4.2. Określenie charakterystyki wyładowań pojedynczych neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta	65
4.2.1. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA	66
4.2.1.1. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA – neurony chronometryczne	67
4.2.1.2. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA – neurony niezależne od rytmu theta	68
4.2.1.3. Aktywność neuronów theta-zależnych wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA – neurony theta-on fazowe	69
4.2.2. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych NMDA	70

4.2.2.1. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym NMDA – neurony chronometryczne	71
4.2.2.2. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym NMDA – neurony niezależne od rytmu theta	72
4.3. Określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na rytm theta wywołany pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym w preparatach PHa	73
<b>5. Dyskusja</b>	<b>77</b>
5.1. Glutaminianergiczne podłoże rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza	79
5.2. Aktywność pojedynczych neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta	86
5.3. Modulacja glutaminianergicznego rytmu theta w PHa poprzez pobudzenie receptorów kortykosteroidowych	93
<b>6. Wnioski</b>	<b>100</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>102</b>
<b>8. Dorobek naukowy</b>	<b>119</b>

## **ALFABETYCZNY WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

**ACSF** – sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. artificial cerebrospinal fluid);

**ACTH** – adrenokortykotropina (ang. adrenocorticotropic hormone);

**AMPA** – kwas  $\alpha$ -amino-3-hydrokso-5-metylo-4-izoksazolopropionowy;

**CA1** – pole cytoarchitektoniczne hipokampa właściwego;

**CBX** – karbenoksolon;

**CCH** – karbachol;

**CORT** – kortykosteron;

**CRH** – hormon uwalniający kortykotropinę, kortykoliberyna (ang. corticotropin-releasing hormone);

**D-AP5** - kwas 2-Amino-5-fosfonopentanowy;

**DNQX** - 6,7-dinitrochinosalino-2,3-dion;

**EC** – kora śródwęchowa (ang. entorhinal cortex);

**EEG** – elektroencefalografia;

**FFT** – algorytm transformaty Fouriera (ang. Fast Fourier Transform);

**GABA** – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy;

**HPA** – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis);

**HPC** – formacja hipokampa (ang. hippocampal formation);

**LFP** – lokalne potencjały polowe (ang. local field potentials);

**LIA** – wysokoamplitudowa aktywność zdesynchronizowana (ang. large irregular activity);

**MFB** – pęczek przyśrodkowy przodomózgowia (ang. medial forebrain bundle);

**MPOs** – wahania potencjału błonowego (ang. membrane potential oscillations);

**MS** – przegroda przyśrodkowa (ang. medial septum);

**MS/vDBB** – kompleks przegrody przyśrodkowej i jądra pasma przekątnego Broki;

**NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy;

**NR** – neurony niezależne od rytmu theta (ang. non-related neurons);

**OUN** – ośrodkowy układ nerwowy;

**PH** – jądra tylnego podwzgórza (ang. posterior hypothalamic nuclei);

**PHa** – obszar tylnego podwzgórza (ang. posterior hypothalamic area);

**PPT** – jądro konarowo-mostowe nakrywki (ang. pedunculo-pontine tegmental nucleus);

**PVN** – jądro przykomorowe (ang. paraventricular nucleus);

**RPO** – przednie jądro siatkowate mostu (ang. oral pontine reticular nucleus);

**SPL** – spironolakton;

**SuM** – jądro nadsuteczki (ang. supramammillary nucleus);

**vDBB** – jądro pasma przekątnego Broki (ang. vertical limb of the diagonal band of Broca).



## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Jednym z typów oscylacji rejestrowanych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) jest rytm theta, który charakteryzuje się miarowym, niemal sinusoidalnym przebiegiem. Funkcjonalnie jest on powiązany z procesami pamięciowymi, integracją sensomotoryczną, aktywnością ruchową oraz nawigacją przestrzenną. U gryzoni rytm theta można zarejestrować w przedziale częstotliwości 3-12 Hz z różnych obszarów ośrodkowego układu nerwowego, przy czym najczęściej badaną strukturą pozostaje formacja hipokampa (HPC). Nie działa ona jednak samodzielnie – powstawanie rytmu theta w HPC związane jest z aktywacją szeregu struktur położonych na różnych piętrach OUN, które określono jako wstępujący układ synchronizujący. Układ ten ma swój początek w jądrach pnia mózgu, skąd impulsacja toniczna przekazywana jest do obszaru tylnego podwzgórza (PHa). W skład tego obszaru wchodzi jądro nadsuteczkwate (SuM) i jądra tylnego podwzgórza (PH), które przekazują impulsację do obszaru przegrody przyśrodkowej, skąd dociera ona do struktur limbicznych, w tym formacji hipokampa.

Jednym z modeli doświadczalnych wykorzystywanych przy badaniach nad aktywnością theta jest model izolowanych preparatów *in vitro*. Pierwsze badania pozaustrojowe wykorzystujące hipokampalne skrawki mózgu przeprowadzone zostały już w 1966 roku przez Yamamoto i McIlwaina. Z kolei w 1987 roku przeprowadzono badania elektrofizjologiczne na skrawkach, w których zarejestrowano rytm zbliżony do aktywności theta obserwowanej *in vivo* – zapoczątkowało to cykl badań nad rytmem theta w warunkach pozaustrojowych. Dzięki odpowiedniemu przygotowaniu preparatów i późniejszemu ich

utrzymywaniu w warunkach zbliżonych do naturalnego środowiska, można zapewnić neurochemiczną charakterystykę skrawków jak najbardziej podobną do tej naturalnej. W warunkach *in vitro* można obserwować rytm theta typu 2 o przedziale częstotliwości 4-7 Hz i potwierdzonym charakterze cholinergicznym.

W badaniach prowadzonych przez Kowalczyka i wsp. dowiedziono, że obszar tylnego podwzgórza zdolny jest nie tylko do modulowania hipokampalnego rytmu theta (jako element wstępującego układu synchronizującego), ale również do generowania lokalnego rytmu theta samodzielnie. W związku z tym, że podłoża neurochemiczne oraz neuronalne oscylacji theta w PHa są wciąż nie w pełni poznane, głównymi celami tego opracowania było określenie tego, jaki udział w powstawaniu i/lub modulowaniu rytmu w obszarze tylnego podwzgórza mają receptory glutaminianergiczne i kortykosteroidowe oraz opisanie charakterystyki wyładowań pojedynczych neuronów tego obszaru związanych z lokalnym glutaminianergicznym rytmem theta. W zaprezentowanych w niniejszej pracy doświadczeniach rytm theta rejestrowano z preparatów PHa utrzymywanych pozaustrojowo.

W pierwszym cyklu doświadczalnym badano zdolność preparatów *in vitro* PHa do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu różnego typu receptorów glutaminianergicznych. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać, iż preparaty *in vitro* PHa są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych zarówno poprzez perfuzję roztworem kwasu kainowego, jak i roztworem NMDA. Natomiast preparaty te nie są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję roztworem AMPA.

W drugim cyklu badawczym określano charakterystykę wyładowań pojedynczych neuronów obszaru tylnego podwzgórza w powiązaniu z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta. Na podstawie wyników skonkludowano, iż większość neuronów wzbudzonych w PHa aktywacją glutaminianergiczną wykazuje wzorzec aktywności niezwiązany z lokalnym rytmem theta – tylko pojedyncze komórki sklasyfikowano, jako tzw. neurony theta-zależne, a dokładniej komórki theta-on. Istnieje też duża grupa neuronów rejestrowanych w obszarze tylnego podwzgórza po pobudzeniu glutaminianergicznym, która zaklasyfikowana została jako neurony chronometryczne.

W trzecim cyklu badawczym, celem była charakterystyka wpływu aktywacji receptorów kortykosteroidowych na glutaminianergiczny rytm theta rejestrowany w PHa. Wykazano, że pobudzenie receptorów kortykosteroidowych podczas generowania epizodów rytmu theta wywołanych przez aktywację receptorów glutaminianergicznych w preparatach PHa powoduje wzmocnienie oscylacji – zarówno amplitudy, jak i mocy dominującego pasma częstotliwości rejestrowanego lokalnie rytmu theta.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej dowodzą, iż receptory glutaminianergiczne typu kainowego oraz typu NMDA, w przeciwieństwie do receptorów typu AMPA, biorą udział w generowaniu lokalnego rytmu theta w PHa. Z kolei aktywacja receptorów mineralokortykosteroidowych moduluje tak wywołany rytm, prowadząc do zwiększenia jego podstawowych parametrów.

## STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

One of the types of oscillations recorded in the central nervous system (CNS) is the theta rhythm, which is characterized by a regular, almost sinusoidal course. Functionally, it is related to memory processes, sensorimotor integration, motor activity, and spatial navigation. In rodents, theta rhythm can be recorded in the frequency range of 3-12 Hz from various areas of the CNS, with the hippocampal formation (HPC) remaining the most frequently studied structure. However, the HPC does not work independently - the generation of the theta rhythm in the HPC is associated with the activation of a number of structures located on different levels of the CNS, which have been defined as the ascending synchronizing pathway. This system originates in the brainstem nuclei, from which tonic impulses are transmitted to the posterior hypothalamic area (PHa). This region includes the supramammillary nucleus (SuM) and the posterior hypothalamic nuclei (PH), which transmit impulses to the medial septal area, from where it reaches limbic structures, including the hippocampal formation.

One of the experimental models used in research on theta activity is the model of isolated *in vitro* preparations. The first extracorporeal studies using hippocampal brain sections were carried out in 1966 by Yamamoto and McIlwain. Subsequently, in 1987, electrophysiological studies were carried out on brain sections in which a rhythm similar to the theta activity observed *in vivo* was recorded - this initiated a series of studies on the theta rhythm in *in vitro* conditions. By appropriately preparing the brain sections and maintaining them in conditions similar to those of the natural environment, it is possible to ensure that the neurochemical characteristics of the sections are as close as possible to the natural ones. Using the

*in vitro* method, a type 2 theta rhythm, with a frequency range of 4-7 Hz and a confirmed cholinergic character, can be observed.

Research conducted by Kowalczyk et al. demonstrated that the PHa is capable not only of modulating the hippocampal theta rhythm (as part of the ascending synchronizing pathway), but also of generating the local theta rhythm on its own. Since the neurochemical and neuronal basis of theta oscillations in the PHa are still not fully understood, the main goals of this study were to determine the role of glutamatergic and corticosteroid receptors in the formation and/or modulation of the rhythm in the posterior hypothalamic area and to describe the characteristics of single neurons' discharges in this area related to the local glutamatergic theta rhythm. In the experiments presented in this paper, the theta rhythm was recorded from the PHa preparations maintained extracorporeally.

In the first experimental cycle, the ability of *in vitro* PHa preparations to generate local theta rhythm after stimulation of various types of glutamatergic receptors was tested. The obtained results allowed us to demonstrate that *in vitro* PHa preparations can generate a local theta rhythm after stimulation of glutamatergic receptors both by perfusion with kainic acid solution and NMDA solution. However, the sections are not able to generate a local theta rhythm after stimulation of glutamatergic receptors by perfusion with AMPA solution.

In the second research cycle, the discharge characteristics of single neurons in the posterior hypothalamus were determined in connection with the local glutamatergic theta rhythm. Based on the results, it was concluded that most neurons stimulated in the PHa by glutamatergic activation show an activity pattern unrelated to the local theta rhythm - only single cells were classified as the so-called

theta-dependent neurons, or more precisely theta-on cells. There is also a large group of neurons recorded in the posterior hypothalamus after glutamatergic stimulation, which are classified as timing neurons.

In the third research cycle, the aim was to characterize the effect of activation of corticosteroid receptors on the glutamatergic theta rhythm recorded in the PHa. It has been shown that stimulation of corticosteroid receptors during the generation of theta rhythm episodes caused by the activation of glutamatergic receptors in the PHa preparations results in amplification of oscillations - both the amplitude and the power of the dominant frequency of the locally recorded theta rhythm.

The results presented in this doctoral dissertation prove that kainate-type and NMDA-type glutamatergic receptors, unlike AMPA-type receptors, are involved in the generation of the local theta rhythm in the PHa. In turn, activation of mineralocorticoid receptors modulates the rhythm induced by such a stimulation, leading to an increase in its basic parameters.

# 1. WSTĘP

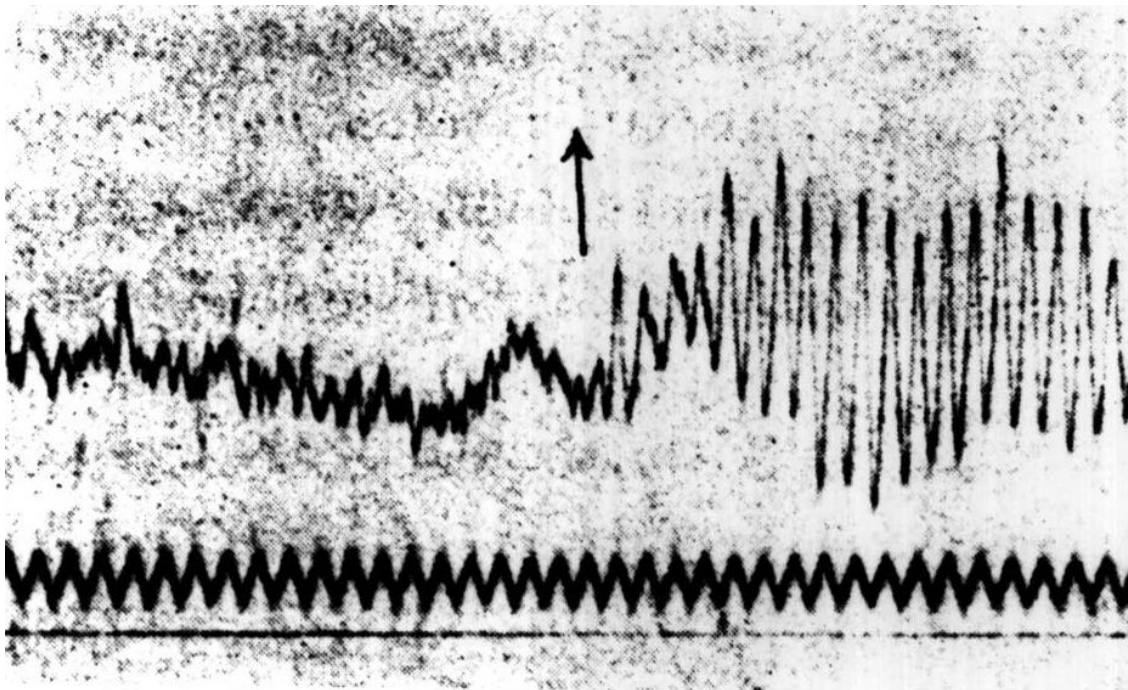
## 1.1. Oscylacje w ośrodkowym układzie nerwowym

Oscylacje (rytmy) w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) stanowią specyficzny wzorzec regularnej aktywności bioelektrycznej, wynikającej z komunikacji pomiędzy grupami neuronów. Rozróżnia się odmienne skale rytmów, w zależności od poziomu organizacyjnego oscylacji. W mikroskali mowa jest o rytmicznej synchronizacji wyładowań poszczególnych neuronów – potencjałów czynnościowych pojedynczych komórek oraz potencjałów postsynaptycznych. W mezoskali istotna jest synchronizacja grup (sieci) neuronów, podczas której ma miejsce interferencja zsumowanych potencjałów bioelektrycznych. Gdy większe sieci neuronalne ulegają synchronizacji i oscylacje mają wyższą amplitudę oraz dalszy zasięg, można mówić o lokalnych potencjałach polowych (ang. local field potentials; LFP). W makroskali kluczowym elementem są funkcjonalne sprzężenia zwrotne pomiędzy odległymi od siebie obszarami mózgu. Dodatnie sprzężenia zwrotne sprzyjać będą powstawaniu LFP, natomiast ujemne skutkować będą desynchronizacją (Wang, 2010).

Zsynchronizowana aktywność bioelektryczna ośrodkowego układu nerwowego może przejawiać różny zakres częstotliwości i z tego powodu wyróżnia się różne rytmy: alfa, beta, theta, delta, gamma. Odrębne wzorce aktywności encefalograficznej (EEG) u człowieka zauważył niemiecki badacz i psychiatra, a jednocześnie twórca aparatury umożliwiającej rejestrowanie aktywności EEG, Hans Berger (Buzsáki, 2006). Początkowo, większość swoich eksperymentów prowadził na sobie, swoich dzieciach oraz na pacjentach z defektami kości czaszki. Wyniki badań pozwoliły zaobserwować Bergerowi dwa główne typy fal: fale o wyższej amplitudzie i częstotliwości ok. 10 Hz, występujące podczas czuwania,



po zamknięciu oczu oraz fale o amplitudzie niższej, lecz znacznie szybsze, występujące podczas gdy pacjent miał otwarte oczy. Pierwszy rodzaj oscylacji badacz nazwał falami alfa, a drugi falami beta, gdyż taka była kolejność, w jakiej je dostrzegł (Ryc. 1; Buzsáki, 2006; Niedermeyer, 1997).



*Ryc. 1 Zapis EEG 14-letniej córki Hansa Bergera Ilse podczas i po liczeniu 196 / 7. Należy zwrócić uwagę na powrót fal alfa po zakończeniu obliczeń matematycznych (miejsce zaznaczone strzałką; Niedermeyer, 1997).*

## 1.2. Rytm theta

Rytm theta, z którym powiązany jest temat niniejszej pracy doktorskiej, to jeden z najsilniej zsynchronizowanych wzorców aktywności oscylacyjnej obserwowany w mózгах ssaków. U ludzi rytm ten rejestrowany jest z przyśrodkowego obszaru płata czołowego oraz z kory skroniowej i charakteryzuje się przedziałem częstotliwości fal od 4 do 7 Hz (Mitchell i wsp., 2008). Aktywność oscylacyjna theta u człowieka występuje w zapisie elektroencefalograficznym np. podczas nawigacji przestrzennej, która powiązana jest z integracją sensomotoryczną (Ekstrom i wsp.,

2005), podczas snu paradoksalnego (Bódizs i wsp., 2001; Nishida i wsp., 2009) oraz podczas aktywności związanych z procesami językowymi (Bastiaansen i Hagoort, 2006), pamięciowymi czy analitycznymi (Anderson i wsp., 2010; Lega i wsp., 2012; Nishida i wsp., 2009). Co więcej, rytm theta został określony jako prawdopodobny, nieswoisty „biomarker” niektórych stanów patologicznych OUN. Znalaziono statystycznie istotne zmiany w obecności aktywności theta u pacjentów z chorobą Alzheimera, gdy porównywano ich zapis EEG z zapisami osób zdrowych (Gallego-Jutglà i wsp., 2012, 2015). Innym zaburzeniem, przy którym występowanie tego wzorca EEG mogłoby być potencjalnie pomocne w diagnozie jest np. padaczka (Colom, 2006). Wykazano również ścisłą zależność między silnymi reakcjami stresowymi a obecnością rytmu theta i przetwarzaniem zadań pamięciowych (Gärtner i wsp., 2014; Vertes i McKenna, 2000). Ponadto, udowodniono odmienny wzrost synchronizacji elektroencefalograficznej w częstotliwości theta u pacjentów z objawami stresu pourazowego takimi jak stany depresyjne i lękowe (Dunkley i wsp., 2015).

Podstawowym materiałem wykorzystywanym w neurobiologicznych badaniach aktywności oscylacyjnej OUN są gryzonie, szczególnie myszy i szczury (Green i wsp., 1960; Kramis i wsp., 1975). U tej grupy ssaków rytm theta określany jest w przedziale częstotliwości 3-12 Hz i charakteryzuje się regularnym, zbliżonym do sinusoidy, przebiegiem (Bland, 1986). Aktywnościami, z którymi jest on powiązany u gryzoni, są procesy pamięciowe (Bland, 1986; Elazar i Adey, 1967; Vertes i Kocsis, 1997), nawigacja przestrzenna (Vertes i Kocsis, 1997; Winson, 1978), integracja czuciowo-ruchowa (Bland i wsp., 2006), aktywność motoryczna (Bland i Oddie, 2001), ale też zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (long term

potentiation; LTP; Huerta i Lisman, 1996, 1995). Rytm theta u gryzoni rejestrowany jest z różnych struktur OUN, lecz najczęściej prowadzone są badania w korze limbicznej, a w szczególności formacji hipokampa (hippocampal formation; HPC; Buzsáki, 2002; Colgin, 2016; Vanderwolf, 2003). Doświadczenia przeprowadzane w tej strukturze pomagały zdefiniować podstawowe cechy charakterystyczne aktywności oscylacyjnej theta i stanowią kanon jej poznania.

### 1.2.1. Rytm theta w HPC

Badania rytmu theta w formacji hipokampa pozwoliły określić zarówno jego powiązania z różnymi typami aktywności behawioralnej zwierząt, jak i podłoże neurochemiczne tego wzorca EEG. W ciągu ostatnich lat zostało eksperymentalnie udowodnione, że rytm theta można rejestrować zarówno w modelu swobodnie poruszających się szczurów (O'Keefe i Dostrovsky, 1971; Woodnorth i McNaughton, 2002), w modelu znieczulonych uretanem zwierząt w warunkach *in vivo* (Bocian i wsp., 2011; Green i Arduini, 1954), jak i w modelu *in vitro*, czyli w odnerwionych preparatach formacji hipokampa (Konopacki i wsp., 1987b; Kowalczyk i wsp., 2013a; Kowalczyk i Konopacki, 2002).

Ze względu na specyfikę neurochemiczną, rytm theta u gryzoni podzielono na dwa typy: rytm theta typu 1 oraz 2. Typ 1 (7-12 Hz) jest związany z aktywnością ruchową zwierzęcia i ma charakter niecholinergiczny (prawdopodobnie głównie serotoninerdyczny; Gutiérrez-Guzmán i wsp., 2017; Vanderwolf i Baker, 1986). Co więcej, podanie większości anestetyków skutkuje tłumieniem tego typu rytmu, obserwowany jest zatem u zwierząt swobodnie poruszających się (Vanderwolf, 1969). Typ 2 (4-7 Hz) związany jest ze zniecieruchomieniem zwierzęcia i ma charakter cholinergiczny. Ten typ rytmu theta wywoływany jest przez podawanie agonistów

receptorów cholinergicznym muskarynowych (acetylocholinę, karbachol; CCH), a blokowany przez antagonistę tych receptorów (siarczan atropiny; Bland, 1986). Dodatkowo, podawanie związków anestetycznych nie ma wpływu na generowanie tego typu rytmu, przez co jest możliwy do obserwowania i analizowania w badaniach z wykorzystaniem narkozy farmakologicznej (Bland, 1986; Gołębiewski i wsp., 1996; Kowalczyk i wsp., 2013a; Leung, 1998; Vanderwolf, 1969). Istnieją również dowody na to, że przy generowaniu tego typu rytmu theta bierze udział układ GABAergiczny (GABA - kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; Konopacki i Gołębiewski, 1993; Smythe i wsp., 1992). Warto dodać, iż istnieją dane eksperymentalne wskazujące również, na prawdopodobny udział transmisji glutaminianergicznej w generowaniu hipokampalnej aktywności theta. Badania prowadzone w ostatnich kilkunastu latach pozwoliły wykazać, iż septohipokampalne projekcje glutaminianergiczne mogą pełnić funkcję swoistego łącznika pomiędzy rytmem theta typu 2, modulowanym przez pobudzenie cholinergiczne i GABAergiczne, a rytmem theta typu 1, związanym z ruchem zwierzęcia (Bland i wsp., 2007; Kazmierska i Konopacki, 2013).

### 1.2.2. Charakterystyka rytmu theta w różnych modelach badawczych

Pierwszym istotnym modelem wykorzystywanym w badaniach rytmu theta jest **model *in vivo***, w którym to zwierzęta poddaje się narkozie farmakologicznej. Jednymi z pierwszych badań wykorzystujących i szerzej opisujących rejestrację aktywności elektrofizjologicznej z HPC podczas uśpienia zwierzęcia były doświadczenia Greena i Arduiniego, które to autorzy przeprowadzili na królikach, kotach oraz małpach (Green i Arduini, 1954). W kolejnych latach, głównym modelem zwierzęcym, na którym badało się ten wzorzec aktywności EEG, zostały

gryzonie, a przede wszystkim szczury i myszy. Wiodącym naukowcem, którego grupa badawcza wysoce przyczyniła się do głębszego poznania charakterystyki hipokampalnego rytmu theta, był Brian H. Bland. Jego zespół badał mechanizmy elektrofizjologiczne oraz neurochemiczne związane z generowaniem rytmu theta w HPC (Bland, 1986). Naukowcy wykazali, iż u gryzoni oscylacje theta tworzone są przez sinusoidalną aktywność polową o częstotliwości od 3 do 12 Hz i wysokiej amplitudzie (od 0,2 do 2 mV) (Bland, 1986; Bland i wsp., 2002; Bland i Colom, 1993; Bland i Oddie, 2001).

Kolejnym często stosowanym modelem badawczym jest **model swobodnie poruszających się zwierząt**. Jednymi z pierwszych naukowców, którzy wykorzystali ten model byli O'Keefe i Dostrovsky (1971). Zarejestrowali oni aktywność elektryczną pojedynczych neuronów w HPC u swobodnie poruszających się szczurów, które mogły bez przeszkód eksplorować duże pomieszczenie (O'Keefe i Dostrovsky, 1971; O'Keefe i Nadel, 1978). Wykazali, że niektóre neurony w hipokampie były selektywnie aktywne w określonych lokalizacjach w środowisku. To przełomowe odkrycie przyczyniło się do tezy, że hipokamp odgrywa fundamentalną rolę w nawigacji przestrzennej i procesach pamięciowych, i ostatecznie doprowadziło do opracowania teorii tzw. komórek miejsca (ang. place cells), czyli neuronów formacji hipokampa, które ulegają selektywnej aktywacji, gdy zwierzę znajduje się w określonym miejscu w środowisku (Burgess i O'Keefe, 2011).

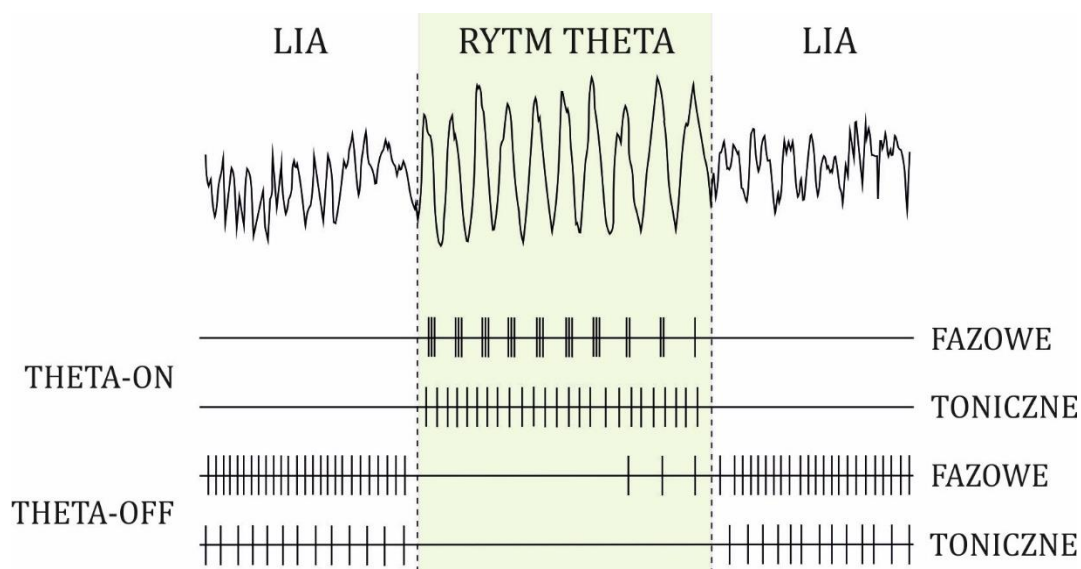
Trzecim modelem doświadczalnym, który jednocześnie jest najistotniejszy w świetle niniejszego opracowania, jest **model *in vitro***. Pierwszych skrawków mózgu zawierających formację hipokampa użyto w badaniach pozaustrojowych już

w 1966 roku (Yamamoto i McIlwain, 1966). W badaniach prowadzonych w tym modelu doświadczalnym najbardziej kluczowym elementem jest odpowiednie preparowanie skrawków mózgowych. Dzięki temu wewnętrzna budowa, układ połączeń synaptycznych oraz charakterystyka neurochemiczna preparatu pozostają zbliżone do naturalnych (Konopacki i wsp., 1987; Konopacki i wsp., 1987a; Skrede i Westgaard, 1971). Niezbędnym jest też utrzymywanie ich w warunkach przypominających naturalne środowisko. W związku z tym, że preparaty *in vitro* są odnerwione, przez co połączenia między HPC a innymi strukturami OUN, istotnymi dla generowania aktywności theta, są przerwane, w warunkach pozaustrojowych nie rejestruje się spontanicznego rytmu theta w formacji hipokampa (Kowalczyk i wsp., 2013a). Jednakże aktywność ta może być wywołana farmakologicznie (np. przez podanie związków procholinerdycznych), a rytm wywołany przez takie wzbudzenie posiada podobne parametry do tych opisanych wyżej, obserwowanych w modelu *in vivo*. Kolejnym podobieństwem oscylacji theta w obu modelach jest występowanie ich w charakterystycznych kilkusekundowych epizodach, jednak w modelu *in vivo* między epizodami obecne są fragmenty aktywności zdesynchronizowanej, podczas gdy w modelu *in vitro* widoczna jest cisza EEG (Konopacki i wsp., 1987a). Aktywność theta obserwowana w warunkach pozaustrojowych klasyfikowana jest jako rytm typu 2, co potwierdzone jest przez zniesienie go po perfuzji skrawków roztworem siarczanu atropiny, co wskazuje na jego podłoże cholinergiczne (Konopacki i wsp., 1992; Kowalczyk i wsp., 2013a).

### 1.2.3. Neurony związane z rytmem theta

Polowej aktywności rytmicznej w paśmie theta obecnej w strukturach układu limbicznego towarzyszy aktywność specyficznych grup neuronów nazwanych „komórkami związanymi z rytmem theta” lub neuronami „theta-zależnymi”. Każda z grup tych neuronów wyładowuje w charakterystyczny dla siebie sposób, stąd wyróżniono ich specyficzną klasyfikację (Colom i Bland, 1987), która od lat jest sukcesywnie rozszerzana.

W 1987 roku Colom i Bland wykazali, iż w formacji hipokampa istnieją dwa typy neuronów wyładowujących w sposób związany z rytmiczną aktywnością HPC: komórki theta-on i theta-off, aktywne odpowiednio, podczas epizodów rytmu i aktywności zdesynchronizowanej obecnej w zapisie polowym. Ponadto, wyróżniono dwa podtypy tych komórek w obu grupach: toniczne i fazowe. Wyładowania neuronów tonicznych nie są związane fazowo z rytmem theta, w przeciwieństwie do drugiego podtypu komórek, które wyładowują w ścisłym powiązaniu z fazą rytmu theta rejestrowanego polowo (Colom i Bland, 1987). Analizując ten podział, nasuwa się podstawowe pytanie – dlaczego mowa jest o neuronach theta-off fazowych, skoro wyładowują one pomiędzy epizodami rytmu, a fazowość komórki określa się poprzez powiązanie jej aktywności z fazą rytmu? Otóż, komórki theta-off fazowe zaczynają generować potencjały czynnościowe pod koniec epizodu theta i wtedy wykazują fazowość względem niego (Ryc. 2; Colom i Bland, 1987).

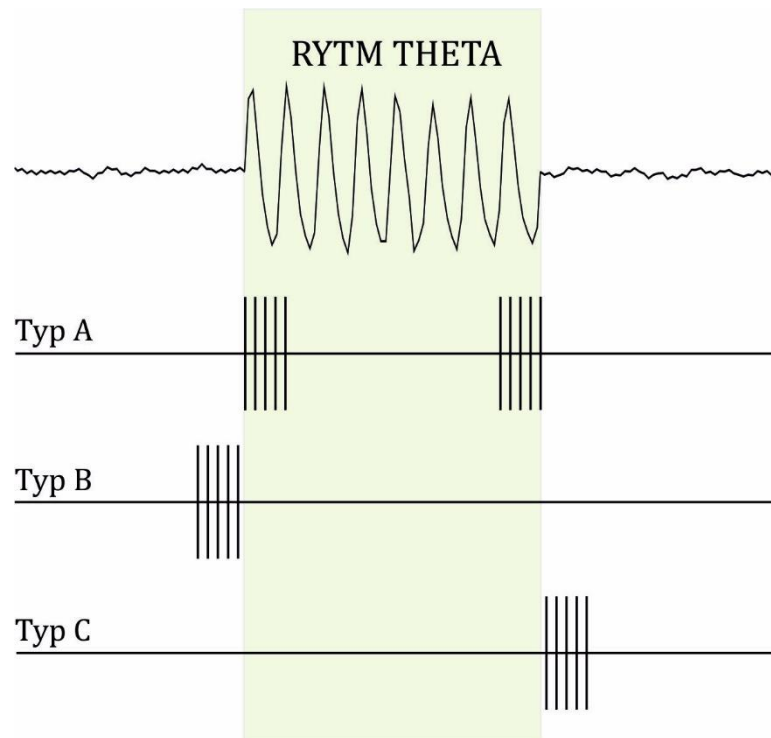


Ryc. 2 Klasyfikacja neuronów związanych z rytmem theta, szczegóły w tekście (wg Bocian i Kowalczyk, 2012).

Warto wspomnieć, iż dzięki eksperymentom prowadzonym w kolejnych latach, obecność neuronów związanych z rytmem theta generowanym w formacji hipokampa wykazano również w innych strukturach OUN – np. w korze śródwęchowej (ang. entorhinal cortex; EC; Dickson i wsp., 1995), obszarze przyśrodkowej przegrody (Bland i wsp., 1990) czy obszarze tylnego podwzgórza (Kirk i wsp., 1996).

Omawiana klasyfikacja została dalej poszerzona o tzw. neurony bramkujące w 2006 roku. Aktywność tych komórek związana jest *stricte* ze specyficznym momentem przejścia sieci neuronalnej formacji hipokampa ze stanu desynchronizacji do aktywności oscylacyjnej w paśmie theta (Ryc. 3; Konopacki i wsp., 2006; Kowalczyk i wsp., 2013b).



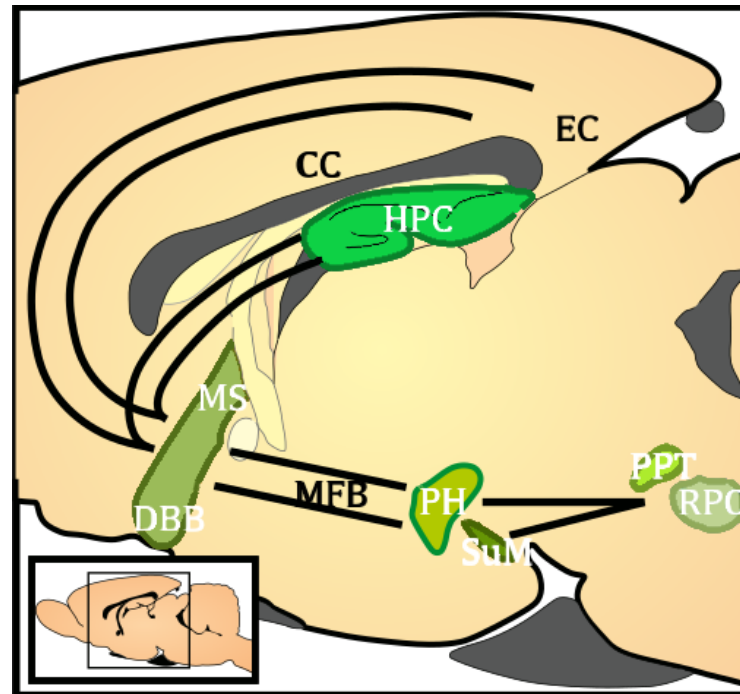


Ryc. 3 Klasyfikacja neuronów bramkujących: A – wyładowujące zarówno na początku i końcu epizodu rytmu; B – zwiastujące pojawienie się epizodu; C – informujące o zakończeniu epizodu (wg Kowalczyk i wsp., 2013a).

### 1.3. Wstępujący układ synchronizujący

Jak wspomniano wcześniej, główną strukturą OUN zaangażowaną w generowanie aktywności oscylacyjnej theta jest formacja hipokampa (Bland, 1986; Konopacki i wsp., 1987b; Kowalczyk i wsp., 2013a; Kramis i wsp., 1975; Pignatelli i wsp., 2012). Połowa aktywność bioelektryczna generowana w HPC związana jest z aktywacją wielu struktur położonych na różnych piętrach ośrodkowego układu nerwowego (Ryc. 4). Wpływają one na generowanie rytmu theta w strukturach układu limbicznego i określono je łącznie jako wstępujący układ (system) synchronizujący (Oddie i wsp., 1994; Vertes i Kocsis, 1997). System ten rozpoczyna się w jądrze boczno-grzbietowym nakrywki (ang. laterodorsal tegmental nucleus) i jądrze konarowo-mostowym nakrywki (ang. pedunculo-pontine tegmental nucleus; PPT) śródmózgowia (Datta i Siwek, 1997; Pignatelli i wsp., 2012). Jądra te generują

toniczną impulsację, przekazywaną następnie do jądra niepewnego (ang. nucleus incertus) i przedniego jądra siatkowatego mostu (ang. oral pontine reticular nucleus; RPO; Woodnorth i wsp., 2003). Komórki RPO wysyłają unerwienie do jąder tylnego podwzgórza (ang. posterior hypothalamic nuclei; PH) i jądra nadsuteczkowego (ang. supramammillary nucleus; SuM; Kirk, 1998), które łącznie określa się jako obszar tylnego podwzgórza (ang. posterior hypothalamic area; PHa; Kowalczyk i wsp., 2014). Z kolei komórki jądra niepewnego unerwiają obszary zlokalizowane w formacji hipokampa, korze przedruchowej, przedczołowej oraz grzbietowym jądrze szwu (ang. dorsal raphe nucleus; Kiss i wsp., 2002; Kocsis i Vertes, 1992; Pignatelli i wsp., 2012). Szlaki neuronalne z jąder tylnego podwzgórza biegną przez pęczek przyśrodkowy przodomózgowia (ang. medial forebrain bundle; MFB) do kolejnego elementu systemu wstępującego, którym są:



Ryc. 4 Neuroarchitektoniczny przebieg wstępującego układu synchronizującego. Oznaczenia: PPT – jądro konarowo-mostowe nakrywki, RPO – przednie jądro siatkowate mostu, SuM – jądro nadsuteczkowe, PH – jądra tylnego podwzgórza, MFB – przyśrodkowy pęczek przodomózgowia, MS – obszar przyśrodkowej przegrody, DBB – pęczek pasma przekątnego Broki, HPC – formacja hipokampa, CC – kora zakrętu obręczy, EC – kora śródwęchowa (wg Caban, 2017).

obszar przyśrodkowej przegrody (ang. medial septum; MS) i poprzeczny pęczek pasma przekątnego Broki (ang. vertical limb of the diagonal band of Broca; vDBB), tworzące łącznie kluczową grupę struktur – MS/vDBB (Bland i wsp., 2007, 1996; Bland i Colom, 1993; Borhegyi i wsp., 1998; Borhegyi i Freund, 1998; Kiss i wsp., 2000; Kocsis, 2006; Yoder i Pang, 2005). MS/vDBB przekazują impulsację biegnącą z pnia mózgu i struktur międzymózgowia do formacji hipokampa, kory śródwęchowej i innych obszarów kory limbicznej (Bland i Oddie, 1998; Leranth i wsp., 1999). Najistotniejszą funkcją kompleksu MS/vDBB jest przekształcanie tonicznej impulsacji docierającej z niższych pięter OUN w rytmiczny wzorzec przekazywany dalej do struktur limbicznych, gdzie w efekcie generowana jest polowa aktywność theta (Bland i wsp., 1999).

#### **1.4. Obszar tylnego podwzgórza a rytm theta**

Jak wspomniano wcześniej, obszar tylnego podwzgórza stanowi istotny element wstępującego układu synchronizującego aktywność HPC. Jądra tego obszaru zaangażowane są nie tylko w kontrolę aktywności oscylacyjnej struktur limbicznych, ale pełnią również wiele innych istotnych funkcji w OUN. Wiele badań wskazało na uczestnictwo PHa w procesach pamięciowych (Pan i McNaughton, 2004), celowej aktywności ruchowej (Woodnorth i McNaughton, 2005), kontroli ruchów związanych ze stanami motywacyjnymi i emocjonalnymi (Sławińska i Kasicki, 1995), odpowiedzi emocjonalnej organizmu (Vertes i wsp., 1995) czy kontroli czynności ruchowych i poziomu wzbudzenia OUN (Parker i Sinnamon, 1983; Sieb, 1990; Sinnamon, 1990). Co więcej, wykazano, że SuM bierze udział w konsolidacji pamięci podczas unikania bodźców bólowych (Shahidi i wsp., 2004) i jest integralną częścią sieci przekształcających informacje podczas zachowań

celowych, co prowadzi do integracji emocjonalnych i kognitywnych aspektów tych informacji (Pan i McNaughton, 2004).

Z punktu widzenia niniejszego opracowania, najistotniejszą funkcją jąder wchodzących w skład PHa jest jednak kontrola i modulacja aktywności bioelektrycznej HPC, poprzez przekazywanie informacji biegnących z pnia mózgu do MS/vDBB i dalej do formacji hipokampa we wstępującym układzie synchronizującym (Gray i McNaughton, 2003; Vertes i Martin, 1988). Analiza połączeń neuronalnych biegnących z PH (Vertes i wsp., 1995) i SuM (Vertes, 1992), wykazała, że projekcje zarówno z jąder tylnego podwzgórza, jak i z jądra nadsuteczki, przebiegając przez pęczek przyśrodkowy kresomózgowia, docierają do HPC oraz do innych obszarów podkorowych i korowych. Wykazano, że unerwienie z SuM dociera do warstwy komórek ziarnistych w zakręcie zębatym (ang. dentate gyrus), warstwy wschodowej (ang. stratum oriens) oraz warstwy piramidowej (ang. stratum pyramidale) pola CA1 hipokampa właściwego (Maglóczy i wsp., 1994). Jednakże pomiędzy obszarem tylnego podwzgórza a formacją hipokampa obecne są nie tylko połączenia wstępujące, ale też zstępujące z układu septohipokampalnego do jądra nadsuteczki oraz jąder tylnego podwzgórza (Kirk, 1998). Połączenia te najprawdopodobniej pełnią funkcje modulujące częstotliwość wyładowań neuronów PHa podczas generowania rytmu theta w HPC. Wydaje się, iż układ zstępujący HPC→PHa może brać udział w hamowaniu rytmu theta, gdy aktywność EEG w formacji hipokampa ulega desynchronizacji (Kirk, 1998).

Aby dokładnie określić rolę PHa w genezie hipokampalnego rytmu, przeprowadzono doświadczenia opierające się na różnorodnych technikach

eksperymentalnych. Pierwsza grupa to badania opierające się na blokowaniu aktywności PHa w wyniku fizycznych lub chemicznych lezji tego obszaru. Po ich dokonaniu obserwowano wpływ uszkodzeń/blokad na aktywność bioelektryczną HPC. Druga grupa to badania związane z drażnieniem elektrycznym obszaru tylnego podwzgórza i obserwacją jego efektów na generowanie rytmu theta w formacji hipokampa. Trzecia grupa badań to rejestracja aktywności pojedynczych komórek obszaru tylnego podwzgórza i powiązań ich wzorców wyładowań z obserwowanym jednocześnie rytmem theta w HPC.

### **1.5. Wpływ hamowania aktywności PHa na hipokampalny rytm theta**

Wpływ inhibicji obszaru tylnego podwzgórza na hipokampalny rytm theta po raz pierwszy badany był w 1974 roku przez Robinsona i Wishawa. Poddawali oni analizie następstwa lezji obszaru tylnego podwzgórza wywierane na właściwości oscylacyjne formacji hipokampa oraz efekty behawioralne. Autorzy wywnioskowali na podstawie przeprowadzonych badań, iż nawet rozległe uszkodzenia PHa nie wpływają znacząco na zdolność tworzenia rytmu theta w HPC (Robinson i Whishaw, 1974). W kolejnych eksperymentach, w 1987 roku, analiza wykazała zupełnie inne wyniki (Trojnar i wsp., 1987). Badania prowadzone były na swobodnie poruszających się szczurach i dowiedziono w nich, że lezje obszarów boczno i tylnego podwzgórza powodują wzrost generowania wysokoamplitudowej aktywności zdesynchronizowanej (ang. large irregular activity; LIA) oraz spadek rytmu theta w obszarze w HPC. Wskazało to na inhibicyjny wpływ lezji ww. obszarów na zdolność formacji hipokampa do tworzenia rytmu. Odmienne

wyniki przedstawionych eksperymentów mogły być rezultatem braku odpowiedniej precyzji metodologicznej we wczesnych badaniach.

W 1991 roku potwierdzono wpływ uszkodzeń rejonu podwzgórza w generowaniu hipokampalnej aktywności EEG. Gdy lezjom poddawano przyśrodkowy obszar podwzgórza, zdolność do generowania aktywności theta w szczurzym HPC zanikała. Przy niekompletnych uszkodzeniach obszaru tylnego podwzgórza, zdolność ta była zachowana. Autorzy wywnioskowali, iż obszary odpowiedzialne za modulację rytmu theta w formacji hipokampa znajdują się w obrębie całego podwzgórza (Glin i wsp., 1991). W kolejnych badaniach prowadzonych na szczurach poddanych narkozie uretanowej, Ian Kirk i Neil McNaughton dowiedli, iż częstotliwość oraz amplituda oscylacji theta w HPC, wywołanych poprzez stymulację elektryczną RPO, zostają obniżone po iniekcji prokainy (będącej lokalnym anestetykiem) do PHa (Kirk i McNaughton, 1993). Na podstawie swoich wyników autorzy zasugerowali, że częstotliwość oscylacji theta w HPC kodowana jest w SuM, co potwierdzili w następnych eksperymentach (McNaughton i wsp., 1995), w których ponadto dowiedli, iż analogiczna inhibicja SuM u szczurów swobodnie poruszających się nie wpływała znacząco na rytm theta w HPC. Wywnioskowano, iż w kontroli częstotliwości oscylacji theta wywołanych przez elektryczną stymulację RPO u swobodnie poruszających się szczurów musi uczestniczyć więcej jąder niż tylko jądro nadsuteczkwate (McNaughton i wsp., 1995).

W kolejnych badaniach, Thinschmidt i wsp. poddawali szczury anestetyzowane uretanem inaktywacjom SuM (m.in. przez iniekcje prokainy) i sprawdzali ich wpływ na generowanie hipokampalnego rytmu theta indukowanego elektryczną stymulacją RPO (Thinschmidt i wsp., 1995). Autorzy dowiedli, iż rytm theta w HPC

wywoływany przez drażnienie elektryczne struktur pnia mózgu charakteryzował się znacząco niższą amplitudą i częstotliwością w przypadku podania prokainy do PHa. Co istotne, osłabienie to trwało około 20 minut i pokrywało się z okresem anestetycznego wpływu prokainy w jądrze nadsuteczkwatym. W eksperymentach potwierdzono, że i amplituda, i częstotliwość hipokampalnego rytmu theta indukowanego stymulacją elektryczną RPO u anestetyzowanych szczurów modulowane są przez połączenia biegnące z jądra nadsuteczkwatego do formacji hipokampa.

Pod koniec XX i na początku XXI wieku, grupa nowozelandzkich naukowców (Pan, McNaughton i Woodnorth) prowadziła kolejne badania na swobodnie poruszających się szczurach dotyczące funkcji tylnego podwzgórza w modulowaniu częstotliwości i amplitudy rytmu theta rejestrowanego w HPC. Jedne z doświadczeń polegały na podaniu chlordiazepoksydu (CDP) obwodowo lub miejscowo do SuM. CDP jest agonistą benzodiazepinowym, wzmacniającym działanie receptorów GABAergicznym, a jego podanie wywierało widoczny wpływ na parametry hipokampalnego rytmu theta (Pan i McNaughton, 1997). Autorzy dowiedli, iż obwodowe iniekcje chlordiazepoksydu zmniejszały częstotliwość rytmu theta w HPC. CDP podany bezpośrednio do SuM również prowadził do spadku częstotliwości hipokampalnego rytmu, lecz w mniejszym stopniu. Głównym wnioskiem było to, że w modelu szczurów swobodnie poruszających się inne struktury, poza jądrem nadsuteczkwatym, muszą brać udział w kodowaniu częstotliwości aktywności theta w HPC, badacze nie sprecyzowali jednak, o które rejony OUN może chodzić. Wyniki kolejnych doświadczeń udowodniły, iż leżące przyśrodkowego obszaru jądra nadsuteczkwatego mają różny wpływ

na częstotliwość rytmu theta w zależności od wzorca behawioralnego prezentowanego przez zwierzę. Badacze zaproponowali, że ten obszar SuM odpowiedzialny jest za modulowanie hipokampalnego rytmu theta manifestowanego jedynie podczas niektórych typów aktywności (Pan i Mcnaughton, 2002). Teoria ta poparła i dopełniła poprzednie wyniki doświadczalne dowodzące, iż u zwierząt anestetyzowanych, w kontroli częstotliwości rytmu theta w HPC jądro nadsuteczkowate odgrywa fundamentalną rolę, lecz jego udział w tej modulacji jest znacząco mniejszy u zwierząt swobodnie poruszających się.

Zaprezentowane powyżej dane wskazują, iż we wstępującym układzie synchronizującym funkcje różnych jąder PHa są odmienne, w zależności od modelu badawczego. U szczurów anestetyzowanych zarówno amplituda, jak i częstotliwość rytmu theta obecnego w HPC kontrolowana jest na poziomie SuM. Z kolei u szczurów swobodnie poruszających się, częstotliwość hipokampalnego theta podlega wpływom zarówno SuM, jak i PH. Zapewne różnice te wynikają z faktu, iż badane jądra w obszarze tylnego podwzgórza modulują odmienne rodzaje rytmu theta u szczurów anestetyzowanych (typ 2 rytmu theta o podłożu cholinergicznym) i tych swobodnie poruszających się (typ 1 rytmu o podłożu niecholinergicznym). Obserwowane różnice mogą mieć swoje źródło w różnym podłożu neurochemicznym zarówno pierwszego, jak i drugiego typu rytmu theta w HPC, a dokładniej, w zaangażowaniu odmiennych obwodów oraz szlaków neuronalnych związanych z wytwarzaniem i modulacją obu typów aktywności rytmicznej theta.



## 1.6. Wpływ drażnienia elektrycznego PHa na hipokampalny rytm theta

Pierwsze badania nad wpływem elektrycznej stymulacji PHa na rytm theta obecny w HPC przeprowadzono już w latach 60., a modelem badawczym były koty poddawane narkozie eterem dietylowym (Kawamura i Domino, 1968). Eksperymenty wykazały, iż elektryczne drażnienie obszaru tylnego podwzgórza powodowało generowanie rytmu theta w HPC, jednocześnie nie ingerując w aktywność elektroencefalograficzną rejestrowaną w korze nowej. Wywnioskowano, iż PHa nie tylko jest kluczowym miejscem przekazywania sygnałów biegnących z tworów siatkowatych do formacji hipokampa, ale również sam jest źródłem szlaków neuronalnych biegnących do HPC (Kawamura i Domino, 1968). Analiza porównawcza zestawiająca te rezultaty z wynikami poprzednich badań nad MS/vDBB wykazała, iż obszar przyśrodkowej przegrody może spełniać swoją rolę jako rozrusznik hipokampalnej aktywności rytmicznej jedynie przy jednoczesnej impulsacji biegnącej z obszaru tylnego podwzgórza i tworów siatkowatych do MS/vDBB (Kawamura i wsp., 1961).

W innych doświadczeniach, badano wpływ drażnienia elektrycznego grzbietowo-przyśrodkowego PHa u swobodnie poruszających się szczurów. Wykazano, iż taka stymulacja prowadziła do generowania hipokampalnego rytmu theta i wywoływała u zwierząt aktywność ruchową, jak na przykład skakanie, bieganie oraz ruchy głowy (Bland i Vanderwolf, 1972). Zauważono bezpośrednie przełożenie siły stymulacji PHa na częstotliwość generowanego rytmu – wzrost siły drażnienia powodował proporcjonalny wzrost częstotliwości rytmu. Zwiększanie drażnienia przekładało się też na nasilanie szybkości biegu lub siły skoku. Zdaniem autorów wstępujący

system synchronizujący (m.in. PHa) pełni ważną funkcję nie tylko w powstawaniu rytmicznych oscylacji w HPC, ale również odgrywa istotną rolę w zarządzaniu ruchami dowolnymi.

Kolejne badania dotyczące stymulacji obszarów podwzgórza (tutaj: bocznych i przyśrodkowych) u swobodnie poruszających się zwierząt wykazały, że elektryczne pobudzanie bocznych obszarów PHa skutkowało desynchronizacją aktywności hipokampalnej, a stymulacja obszarów przyśrodkowych powodowała generowanie rytmu theta w HPC (Coleman i Lindsley, 1977). Zgodnie z opinią autorów, dwie odmienne ścieżki neuronalne przechodzące przez PHa formują obwody ze zwrotnymi połączeniami z HPC, dzięki czemu modulują jego aktywność EEG i regulują zachowania przejawiane przez szczura.

Określenie roli PHa i MS/vDBB we wstępującym systemie synchronizującym aktywność hipokampalną było istotnym celem kolejnych eksperymentów. W badaniach tych podawano prokainę do obszaru przyśrodkowej przegrody oraz atropinę obwodowo i badano wpływ tych iniekcji na aktywność theta w HPC i EC (Dickson i wsp., 1994). Dodatkowo, w badaniach tych prowadzono elektryczne drażnienie tylnego podwzgórza, co skutkowało generowaniem rytmu theta w obu tych strukturach limbicznych. Rytm obserwowany zarówno w formacji hipokampa, jak i w korze śródwęchowej blokowany był przez oba typy iniekcji wykonywanych w tych eksperymentach. Zdaniem autorów oscylacje theta w HPC i EC modulowane są przez połączenia cholinergiczne muskarynowe biegnące z tylnego podwzgórza przez MS/vDBB u szczurów poddanych narkozie uretanowej. Przedstawiono również ścisłą zależność pomiędzy siłą drażnienia jąder tylnego podwzgórza a mocą i częstotliwością rytmu theta rejestrowanego w korze śródwęchowej. Autorzy

wywnioskowali, iż komórki zlokalizowane w obszarze tylnego podwzgórza modułują rytm theta w HPC i EC (zarówno częstotliwość, jak i moc). W kolejnych eksperymentach, ci sami badacze wykazali, iż elektryczne drażnienie obszaru tylnego podwzgórza znacząco wpływa na wzrost częstotliwości potencjałów czynnościowych generowanych przez neurony theta-on zlokalizowane w EC podczas rytmu i jednocześnie zmniejsza wyładowania neuronów theta-off w tym obszarze w trakcie jednoczesnej LIA w formacji hipokampa (Dickson i wsp., 1995). Podanie prokainy do MS powodowało z kolei blokowanie rytmu theta rejestrowanego w HPC i EC, wywoływanego przez drażnienie PHa. Autorzy wykazali, iż aktywność wstępującego układu synchronizującego prowadzi do generowania rytmu zarówno w formacji hipokampa, jak i w korze śródwęchowej.

Kolejną serią badawczą prowadzącą do zdeterminowania udziału obszaru tylnego podwzgórza w generowaniu rytmu theta w HPC były eksperymenty Oddiego i wsp. (Oddie i wsp., 1994). Badacze poparli wcześniejsze wyniki Blanda (Bland, 1986), jednocześnie potwierdzając, iż elektryczne drażnienie PH prowadzi do generowania rytmu theta w HPC i wykazali bezpośrednią zależność między siłą bodźca elektrycznego a wzrostem częstotliwości tego rytmu. W doświadczeniach udowodniono, iż krótkotrwałe blokowanie obszaru tylnego podwzgórza za pomocą lokalnego podania prokainy nie wpływało na częstotliwość rytmu theta generowanego iniekcjami CCH do MS/vDBB, natomiast znacząco obniżało jego amplitudę. Jednakże, gdy analizowano hipokampalny rytm theta występujący spontanicznie lub wywoływany stymulacją czuciową (ang. tail-pinch) czy elektrycznym drażnieniem RPO, iniekcje prokainy do PHa całkowicie go blokowały. Dodatkowo, podanie karbacholu do PHa powodowało trwałe

generowanie hipokampalnego rytmu theta. Postawiono tezę, iż obszar tylnego podwzgórza jest kluczowym elementem wstępującego systemu synchronizującego aktywność rytmiczną w HPC i jego główną funkcją jest swojego rodzaju „tłumaczenie” intensywności impulsacji biegnącej z RPO, na specyficzny wzorzec impulsacji o danej częstotliwości, przekazywany dalej do MS/vDBB i finalnie do HPC (Oddie i wsp., 1994).

Reasumując, opisane doświadczenia, w których badano wpływ drażnienia elektrycznego PHa na generowanie hipokampalnego rytmu theta, wskazują, iż obszar tylnego podwzgórza jest kluczowym elementem wstępującego układu synchronizującego hipokampalną aktywność rytmiczną. Wykazano, iż elektryczne drażnienie obszaru tylnego podwzgórza prowadzi do generowania rytmu theta, a parametry tego drażnienia modulują parametry rytmu obserwowanego zarówno w HPC, jak i w EC. Ponadto, postawiono tezę, że PHa pełni istotną funkcję modulacyjną w zakresie siły pobudzenia dostarczanego z RPO do MS/vDBB i w następstwie, do formacji hipokampa.

### **1.7. Komórki PHa związane z hipokampalnym rytmem theta**

Kolejną grupę doświadczeń, określających interakcje pomiędzy aktywnością PHa a hipokampalnymi oscylacjami theta, stanowią badania aktywności pojedynczych neuronów obszaru tylnego podwzgórza i ich korelacji z aktywnością połową obserwowaną równocześnie w HPC. W pierwszych eksperymentach tego typu, prowadzonych na szczurach w narkozie uretanowej, wykazano, iż komórki zlokalizowane w jądrze nadsuteczki wyładowywały rytmicznie oraz zgodnie w fazie z falami theta obserwowanymi w tym samym czasie w HPC (Kirk i McNaughton, 1991). Co ciekawe, blokowanie obszaru przyśrodkowej przegrody

poprzez lokalne podanie prokainy hamowało hipokampalny rytm theta, jednocześnie nie mając wpływu na rytmiczny wzorzec aktywności neuronalnej w SuM. Autorzy postawili tezę, iż to właśnie ten obszar jest najprawdopodobniej odpowiedzialny za kodowanie częstotliwości rytmu theta w HPC, a informacja biegnie z SuM do formacji hipokampa przez MS/vDBB. W kolejnych badaniach analizowano aktywność neuronów zlokalizowanych w jądrze nadsuteczkwatym, ciałach suteczkwatych i sąsiadujących obszarach w międzymózgowiu, równoległe rejestrując aktywność polową w formacji hipokampa (Kocsis i Vertes, 1994). Dowiedziono obecności w analizowanych obszarach komórek o wzorcu aktywności zsynchronizowanym z hipokampalnym rytmem theta, a grupa ta stanowiła 17% wszystkich zbadanych neuronów. Wyniki te potwierdziły powiązanie jądra nadsuteczkwatego oraz ciał suteczkwatych z przekazywaniem rytmicznej impulsacji do różnych struktur w układzie limbicznym, w którym dochodzi do generowania aktywności oscylacyjnej theta.

Dalsze badania pozwoliły wykazać obecność w PHa trzech grup neuronów związanych z rytmem: theta-on tonicznych, theta-off tonicznych i theta-on fazowych (Bland i wsp., 1995). Wszystkie komórki theta-zależne zarejestrowane w SuM należały do typu theta-on fazowych, a wszystkie zarejestrowane w PH do typu theta-on tonicznych. Komórki zlokalizowane pomiędzy tymi jądrami zostały sklasyfikowane jako neurony typu theta-off tonicznego. Wyniki te zostały potwierdzone eksperymentalnie rok później: w jądrach tylnego podwzgórza zaobserwowano obecność neuronów theta-on tonicznych, a w jądrze nadsuteczkwatym neuronów theta-on fazowych (Kirk i wsp., 1996). Co więcej, udowodniono stały wzorzec rytmiczny neuronów obecnych w PHa, związanych

z rytmem theta w HPC, nawet po iniekcji prokainy do obszaru przyśrodkowej przegrody. Podczas elektrycznego drażnienia pnia mózgu, doprzegrodowe podanie prokainy powodowało wzrost częstotliwości wyładowań tylnopodwzgórzowych komórek theta-zależnych. Zgodnie z opinią autorów, częstotliwość impulsacji komórek theta-on fazowych w SuM i theta-on tonicznych w PH zależna jest od sygnału biegnącego z RPO, nie jest jednak zdeterminowana przez parametry septohipokampalnego rytmu theta. Zasugerowano też, że rolą SuM we wstępującym układzie synchronizującym jest „tłumaczenie” tonicznej impulsacji dochodzącej z pnia mózgu na rytmiczny wzorzec wyładowań, a funkcją PH jest dostarczanie tonicznego pobudzenia do układu septohipokampalnego. Kolektywna aktywność jądra nadsuteczkwatego i jąder tylnego podwzgórza skutkuje powstawaniem aktywności rytmicznej w układzie septohipokampalnym (Kirk i McNaughton, 1991). Kolejne badania wykazały niezależność wzorca aktywności komórkowej neuronów theta-zależnych w PHa od uszkodzeń połączeń docierających do obszaru tylnego podwzgórza z układu septohipokampalnego. Autorzy podsumowali, iż neurony w PH i SuM wyładowują niezależnie od impulsacji docierającej z obszaru przyśrodkowej przegrody i/lub HPC, jednak ich aktywność może być przez tę impulsację modulowana (Kirk, 1998, 1997).

Celem dalszych badań na szczurach w narkozie uretanowej było zaklasyfikowanie funkcjonalne komórek w jądrze nadsuteczkwatym i ciałach suteczkwatych oraz obserwacja zależności ich aktywności podczas jednoczesnego rytmu theta w formacji hipokampa generowanego po drażnieniu elektrycznym obszaru przyśrodkowej przegrody (Kocsis i Vertes, 1997). Dowiedziono, że komórki PHa o rytmicznym wzorcu aktywności stanowią zróżnicowaną grupę neuronów zależną

od rytmu theta w HPC. Wyróżniono cztery typy komórek pod kątem tego, czy i w jakiej fazie hipokampalnego rytmu theta wyładowywały. Aktywność dwóch pierwszych grup neuronów zależna była bezpośrednio od fazy oscylacji theta – potencjały czynnościowe generowane były albo w dodatnim, albo w ujemnym szczycie fali jednocześnie zapisywanego rytmu theta w HPC. Aktywność dwóch kolejnych grup neuronów również była powiązana z hipokampalną aktywnością polową, lecz ich wyładowania rejestrowano albo na wstępującym, albo na zstępującym ramieniu fali rejestrowanego polowo rytmu theta w formacji hipokampa. Badacze zasugerowali, iż ta heterogeniczność komórek w obszarze tylnego podwzgórza wynikać może ze specyfiki połączeń pobudzających i hamujących biegnących do PHa z niższych pięter wstępującego układu synchronizującego oraz połączeń zwrotnych z HPC. Zwrotne połączenia docierające do obszaru tylnego podwzgórza z układu septohipokampalnego mogą, według autorów, znacząco modulować aktywność neuronalną SuM i PH. Potwierdziły to wyniki kolejnych doświadczeń (Kocsis, 2006; Kocsis i Kaminski, 2006), w których wykazano, że podczas hipokampalnego rytmu theta indukowanego sensorycznie, aktywność komórek zlokalizowanych w jądrze nadsuteczkwatym zawiera informacje „przewidujące” przyszłe zmiany rytmicznych potencjałów polowych w HPC. Jednakże podczas spontanicznej aktywności theta w HPC, wyładowania neuronów theta-zależnych w SuM kontrolowane są przez połączenia zstępujące docierające z kory limbicznej. Zasugerowano bezpośredni związek między typem szczyrzej aktywności motorycznej a rolą pełnioną przez komórki jądra nadsuteczkwatego w powstawaniu rytmu theta w układzie septohipokampalnym.

Konkludując, wyniki analiz aktywności komórkowej neuronów PHa związanych z hipokampalnym rytmem theta ponownie dowodzą kluczowej roli, jaką obszar tylnego podwzgórza pełni w postawaniu tego rodzaju oscylacji w HPC. Wykazano niezależność wzorców wyładowań komórek theta-zależnych PHa związanych z rytmem theta w HPC od zwrotnej, zstępującej impulsacji docierającej do PHa z układu septo-hipokampalnego. Przedstawione powyżej dane wskazują, że najbardziej prawdopodobnym elementem wstępującego układu synchronizującego kontrolującym częstotliwość hipokampalnego rytmu theta jest jądro nadsuteczkwate, natomiast jądra tylnego podwzgórza odpowiedzialne są zapewne za przekazywanie impulsacji tonicznej z pnia mózgu do systemu septohipokampalnego, w którym generowane są oscylacje theta.

### **1.8. PHa jako niezależny generator rytmu theta**

Opisane powyżej badania podkreślają istotność funkcjonalną PHa w genezie rytmu theta rejestrowanego w strukturach układu limbicznego. Warto jednak wspomnieć, że już w latach 70. XX wieku postawiono tezę, że obszar tylnego podwzgórza może nie tylko modulować hipokampalny rytm theta, ale też samodzielnie generować rytmiczne oscylacje lokalnie (Komisaruk, 1970). W badaniach na szczurach o farmakologicznie zahamowanej aktywności ruchowej, wykazano obecność zarówno epizodów rytmu theta, jak i współwyładowujących podczas ich obecności neuronów nie tylko w HPC, ale i w ciałach suteczkowatych. Udowodniono ścisłą zależność między rytmem theta występującym w tylnym i brzuszonym obszarze podwzgórza z jednoczesnym rytmem obserwowanym w HPC. W innych badaniach zarejestrowano też aktywność theta w PHa u zwierząt swobodnie poruszających się (Sławińska i Kasicki, 1995). Zauważono wtedy korelację pomiędzy rytmem



rejestrowanym w obszarze tylnego podwzgórza a zachowaniem zwierzęcia. Epizody theta nigdy nie pojawiały się, gdy zwierzę było w bezruchu, natomiast synchronizacja rozpoczynała się na początku aktywności motorycznej. Występowanie lokalnej aktywności theta w PHa zostało potwierdzone również w badaniach analizujących aktywność oscylacyjną w tym obszarze po stymulacji sensorycznej u szczurów znieczulonych uretanem (Kocsis i Vertes, 1997). Równoległe zapisywano aktywność polową EEG w formacji hipokampa. Wskazano na powiązania aktywności theta obserwowanej w HPC z rytmem jednocześnie rejestrowanym w PHa. Zaproponowano tezę, iż rytm theta generowany lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza może być konsekwencją impulsacji zstępującej z układu septohipokampalnego do PHa.

Pierwsze dogłębne analizy lokalnego rytmu theta w PHa wykonali Kowalczyk i wsp. (2014), którzy przeprowadzili je na szczurach znieczulonych uretanem oraz w warunkach *in vitro*, na skrawkach mózgowych. W obydwu modelach badawczych udowodniono, że obszar tylnego podwzgórza może generować lokalny rytm theta o podłożu cholinergicznym, muskarynowym. Doświadczenia na szczurach w narkozie wykazały, iż można rejestrować oscylacje theta jednocześnie z PHa i HPC, lecz obydwie wzorce aktywności rytmicznej powstają od siebie niezależnie. Co istotne, rytm rejestrowany równocześnie w obydwu tych strukturach charakteryzował się odmienną częstotliwością i przebiegiem czasowym epizodów. Badania na odnerwionych skrawkach PHa poparły powyższe wyniki, potwierdzając niezależność lokalnego rytmu theta generowanego w obszarze tylnego podwzgórza od obecności połączeń docierających z pnia mózgu i układu septohipokampalnego (Kowalczyk i wsp., 2014).

Przedmiotem kolejnych doświadczeń była analiza wzorców wyładowań komórkowych w PHa oraz współwystępującej lokalnie rytmicznej aktywności polowej (Bocian i wsp., 2016b; Kowalczyk i wsp., 2013b). W badaniach tych wykazano obecność trzech znanych wcześniej typów neuronów zależnych od lokalnego rytmu theta: komórek theta-on fazowych, theta-on tonicznych oraz komórek theta-off, zarówno *in vivo* u znieczulonych uretanem szczurów, jak i w modelu *in vitro* w odnerwionych preparatach PHa. Po raz pierwszy wykazano wtedy obecność neuronów theta-zależnych związanych z lokalnym rytmem theta generowanym w PHa. Co więcej, dowiedziono, iż charakterystyka wyładowań tych komórek pozwala na klasyfikowanie ich wedle wcześniej opisanych kryteriów dla komórek theta-zależnych (Colom i Bland, 1987). Najistotniejszą nowością była nieopisana wcześniej grupa neuronów PHa, które odznaczały się stałym wzorcem aktywności rytmicznej o stabilnej częstotliwości – tzw. komórki chronometryczne (ang. timing cells). Zgodnie z opinią autorów, neurony te tworzą ważny element wstępującego układu synchronizującego i prawdopodobnie biorą udział w przetwarzaniu impulsacji tonicznej docierającej z RPO na rytmiczne wzorce wyładowań przekazywane dalej z obszaru tylnego podwzgórza do układu septohipokampalnego (Bocian i wsp., 2016b; Kowalczyk i wsp., 2013b). Co ciekawe, w kolejnych badaniach wykazano, iż populacja neuronów związanych z lokalnym rytmem theta w PHa, podobnie jak ma to miejsce w przypadku takich komórek w HPC, charakteryzuje się specyficznym wzorcem rozwoju postnatalnego (Caban i wsp., 2018). Populacja rejestrowanych neuronów chronometrycznych oraz komórek theta-on systematycznie rosła od 8 aż do 24 dnia po porodzie, kiedy to uzyskiwała wartości specyficzne dla osobników dorosłych.

### 1.8.1. Niecholinergiczne podłoże rytmu theta w PHa

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, rytm theta może być obserwowany w obszarze tylnego podwzgórza spontanicznie (*in vivo*) lub w wyniku zastosowania drażnienia cholinergicznego (*in vivo, in vitro*). Co ważne, amplituda tej aktywności w PHa jest kilkukrotnie niższa (ok. 7-8-krotnie) od amplitudy rytmu rejestrowanego w formacji hipokampa, a epizody aktywności theta w PHa są nieregularne i często zanikają. Wynika to najprawdopodobniej z nieregularnego rozmieszczenia neuronów oraz z braku laminarnej struktury obecnej w HPC (Konopacki i wsp., 2006; Kowalczyk i wsp., 2014, 2009; Kowalczyk i Konopacki, 2002). W jądrze nadsuteczki i jądrach tylnego podwzgórza obserwuje się znacznie mniej neuronów zależnych od lokalnego rytmu theta, zatem w konsekwencji zmniejsza się szansa na rejestrację stabilnego wzorca aktywności EEG w PHa.

Dane eksperymentalne wskazują na złożone tło stojące za genezą aktywności polowej w częstotliwości theta w PHa, szczególnie biorąc pod uwagę rolę tego obszaru nie tylko jako modulatora rytmu w HPC, ale też jako niezależnego generatora rytmu theta (Kowalczyk i wsp., 2014). Odkrycie zdolności obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnych oscylacji theta pociągnęło za sobą szereg pytań dotyczących mechanizmów leżących u podłoża tej aktywności. Jak wspomniano wcześniej, cholinergiczna natura rytmu theta typu 2 w HPC była szeroko eksplorowana. Jednakże istnieją również dane potwierdzające współistnienie niecholinergicznego charakteru tego rodzaju aktywności w HPC. Przykładowo, podanie MK-801 (antagonisty receptora glutaminianergicznego NMDA; kwasu N-metylo-D-asparaginowego) zmniejszało zarówno częstotliwość, jak i moc hipokampalnego rytmu theta (Pitkänen i wsp., 1995). Inne badania

wykazały, że dohipokampalne iniekcje NMDA, u szczurów w narkozie uretanowej, powodowały generowanie dobrze zsynchronizowanego rytmu theta (Bland i wsp., 2007). Wyniki te wydają się szczególnie interesujące w świetle dowiedzionego gęstego rozmieszczenia receptorów glutaminianergiczných w obszarze tylnego podwzgórza (Ma i Leung, 2007; Sergeeva i wsp., 2004). Wstępne doświadczenia prowadzone w Katedrze Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego pokazały, iż pobudzenie glutaminianergiczne obszaru PHa może prowadzić do generowania lokalnego rytmu theta, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

W kontekście badań i wyników opisywanych w niniejszym opracowaniu, interesującym zagadnieniem jest również udział receptorów kortykosteroidowych w modulowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. W jednym z wcześniejszych badań podjęto próbę blokowania synaps elektrycznych poprzez podanie karbenoksolonu (CBX) i wykazano, iż działanie to nie znosi cholinergicznego rytmu theta rejestrowanego w obszarze tylnego podwzgórza, ani w preparatach *in vitro*, ani u zwierząt anestetyzowanych (Bocian i wsp., 2016a). Przeciwnie, po podaniu CBX zaobserwowano wzrost amplitudy obserwowanego rytmu theta. Wywnioskowano, iż międzyneuronalne połączenia poprzez synapsy elektryczne nie mają udziału w generowaniu lokalnej aktywności theta w rejonie tylnego podwzgórza, jednak wciąż niejasne było zwiększanie się amplitudy rytmu theta obserwowanego w PHa po podaniu karbenoksolonu. Wcześniejsze badania wskazują na to, iż ten bloker synaps elektrycznych jest równocześnie agonistą receptorów mineralokortykosteroidowych (Jellinck i wsp., 1993). Zaproponowano więc, że rejestrowana modulacja tylnopodwzgórzowego rytmu związana była właśnie z tym drugim torem działania CBX. Z uwagi na to, w kolejnej fazie

doświadczeń w badaniach wykorzystano antagonistę receptorów mineralokortykosteroidowych – spironolakton (SPL). Perfuzja skrawków PHa roztworem SPL oraz iniekcje SPL do obszaru tylnego podwzgórza u szczurów poddanych narkozie uretanowej skutkowały hamowaniem wzrostu amplitudy rytmu theta wywołanym przez karbenoksolon. Wyniki te pozwoliły autorom wysunąć tezę, iż receptory mineralokortykosteroidowe prawdopodobnie biorą udział w modulowaniu lokalnej aktywności theta w obszarze tylnego podwzgórza (Bocian i wsp., 2016a).

## **2. CELE**

Biorąc pod uwagę fakt, iż podłoże neuronalne oraz natura neurochemiczna aktywności oscylacyjnej theta rejestrowanej lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza pozostają wciąż w dużej mierze niepoznane, głównymi celami niniejszej pracy było określenie udziału różnych typów receptorów glutaminianergicznych w powstawaniu rytmu w PHa, zbadanie aktywności neuronów powiązanych z rytmem wywołanym pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych i wreszcie określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na tego typu aktywność EEG generowaną w obszarze PHa.

Cele szczegółowe niniejszej rozprawy doktorskiej:

**1. Określenie zdolności preparatów *in vitro* obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych.**

1.1. Wpływ perfuzji preparatów PHa roztworem kwasu kainowego na zdolność do generowania rytmu theta.

1.2. Wpływ perfuzji preparatów PHa roztworem NMDA na zdolność do generowania rytmu theta.

1.3. Wpływ perfuzji preparatów PHa roztworem AMPA na zdolność do generowania rytmu theta.

**2. Określenie charakterystyki wyładowań pojedynczych neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta.**

2.1. Aktywność pojedynczych neuronów PHa wywołana perfuzją preparatów roztworem KA.

2.2. Aktywność pojedynczych neuronów PHa wywołana perfuzją preparatów roztworem NMDA.

3. Określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na rytm theta wywołany pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych w preparatach PHa.



## **3. MATERIAŁY I METODY**

Doświadczenia, które opisano w niniejszej pracy, zostały przeprowadzone w zgodzie z obowiązującymi przepisami prawa dotyczącymi wykonywanych procedur i były kontrolowane przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr pozwolenia 52/ŁB25/2017).

Badania przeprowadzono na 450 skrawkach mózgowych pobranych od 200 szczurów, samców szczepu Wistar (100-150 g), z hodowli prowadzonej przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Warunki hodowlane utrzymywane były na stałym poziomie, zwierzęta miały ciągły dostęp do pożywienia oraz wody pitnej w wymuszonym cyklu dobowym (12h w warunkach sztucznego oświetlenia, 12h w ciemności).

### **3.1. Procedury przedeksperymentalne**

#### **3.1.1. Przygotowanie sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego**

Pierwszą procedurą związaną z eksperymentami *in vitro* było przygotowanie sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (ang. artificial cerebrospinal fluid; ACSF). Był on zawsze świeżo przygotowywany przed każdym eksperymentem na bazie wody dejonizowanej (EasyPure RF, USA). Właściwy skład ACSF został opracowany w celu zapewnienia odpowiedniego środowiska dla preparatów mózgowych i jest to: 121 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub> oraz 10 mM glukozy (Sigma Chemical Co., USA). Dzięki ciągłej perfuzji sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego karbogenem (mieszaniną gazów o składzie 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>), możliwe było utrzymywanie odpowiedniego odczynu pH (ok. 7,4) i poziomu natlenowania.

### 3.1.2. Przygotowanie odczynników chemicznych w celu wywołania, modulacji lub blokowania aktywności rytmicznej w skrawkach mózgowych

Przed każdym doświadczeniem przygotowywane były odpowiednie związki chemiczne stosowane później w celu wywołania, modulowania lub blokowania aktywności rytmicznej theta rejestrowanej ze skrawków PHa. Konkretnie związki rozpuszczano w ACSF, a następnie perfundowano nimi skrawki w komorze inkubacyjno-rejestracyjnej podczas eksperymentu (tempo przepływu ACSF przez komorę to ok. 1,5 ml na minutę). Lista odczynników wykorzystywanych przy badaniach do tej pracy doktorskiej opisana jest wraz ze stężeniami w tabeli poniżej (Tabela 1).

*Tabela 1 Wykaz związków farmaceutycznych wykorzystywanych podczas eksperymentów wraz z ich działaniem oraz stężeniami.*

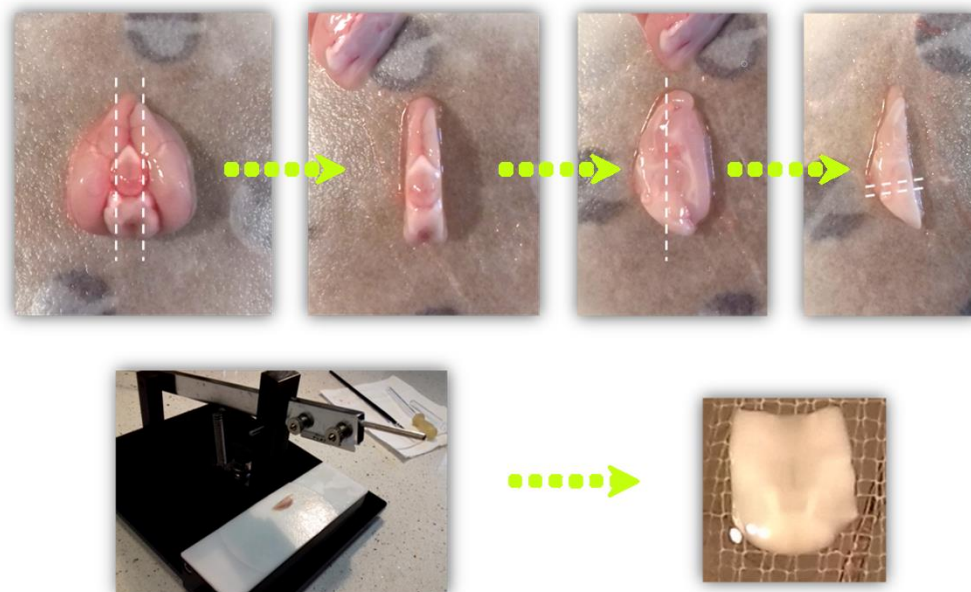
L.p.	Nazwa odczynnika	Działanie	Stężenie
1.	<b>Kwas kainowy (KA)</b>	Selektywny agonista jonotropowych receptorów glutaminianergicznych oraz częściowy agonista receptorów AMPA	2 $\mu\text{M}$
2.	<b>Kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA)</b>	Agonista receptorów glutaminianergicznych typu NMDA	100 $\mu\text{M}$
3.	<b>Kwas <math>\alpha</math>-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (AMPA)</b>	Agonista receptorów glutaminianergicznych typu AMPA	100 $\mu\text{M}$
4.	<b>6,7-dinitrochinosalino-2,3-dion (DNQX)</b>	Antagonista receptorów glutaminianergicznych nie-NMDA	50 $\mu\text{M}$

5.	<b>Kwas 2-Amino-5-fosfonopentanowy (D-AP5)</b>	Selektywny antagonist receptorów glutaminianergiczných typu NMDA	100 $\mu$ M
6.	<b>Kortykosteron (CORT)</b>	Agonista receptorów kortykosteroidowych	2 $\mu$ M
7.	<b>Spironolakton (SPL)</b>	Antagonista receptorów mineralokortykosteroidowych	2 $\mu$ M

Dawki poszczególnych leków zostały wypracowane w przeprowadzonych wcześniej badaniach wstępnych.

### 3.2. Przygotowanie preparatów obszaru tylnego podwzgórza

Zwierzęta poddawano anestezji wziewnej przy użyciu izofluranu (Aerrane, Baxter, Polska), aż do zatrzymania akcji oddechowej. Następnie szczury dekapitowano i wypreparowywano mózg, który umieszczany był w natlenowanym (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) i schłodzonym (3 – 5°C) sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym. Z mózgu preparowano skrawki PHa poprzez odcięcie bocznych części obu półkul oraz górnej części mózgu. Pozostały bloczek tkanki krojono na skrawki o grubości ok. 500  $\mu$ m w płaszczyźnie czołowej, przy użyciu gilotyny tkankowej (Stoelting, Wood Dale, USA; Ryc. 5).



*Ryc. 5. Procedura przygotowania preparatów PHa, szczegóły w tekście.*

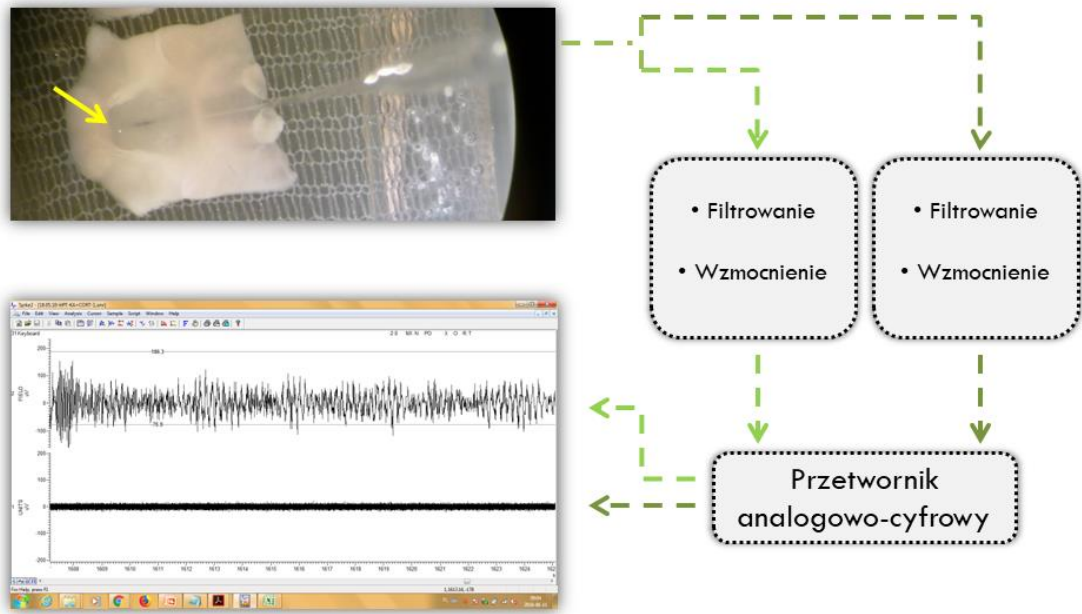
W ciągu 6-7 minut z każdego mózgu pozyskiwane były 2 lub 3 skrawki zawierające obszar tylnego podwzgórza, a dokładniej: tylko jądro nadsuteczkowate, zarówno jądro nadsuteczkowate, jak i jądra tylnego podwzgórza lub tylko jądra tylnego podwzgórza. Skrawki PHa były następnie preinkubowane w natlenowywanym ACSF w temperaturze około 20°C przez co najmniej godzinę, w celu regeneracji tkanki. Po tym czasie, skrawki były przenoszone do komory rejestracyjnej typu „gas-liquid interface”, w której znajdowały się na powierzchni nylonowej siatki, będąc jednocześnie perfundowanymi natlenowanym i ogrzanym (do około 35°C) płynem mózgowo-rdzeniowym (przepływ ACSF przez komorę w tempie około 1,5 ml na minutę). Taka inkubacja trwała 30 minut, a następnie miała miejsce właściwa część eksperymentalna, w której rejestrowano aktywność EEG w preparatach PHa.

### 3.3. Rejestracja aktywności EEG w preparatach PHa

W warunkach *in vitro*, aktywność EEG preparatów PHa rejestrowana była przy użyciu szklanej elektrody rejestrującej (3 – 5 M $\Omega$ ) wypełnionej 2.0 M roztworem chlorku sodu. Pomiar oporności uzyskiwany był dzięki miernikowi Omega-Tip-Z (World Precision Instruments; USA). Elektrody zostały wytworzone z kapilar szklanych typu Kwik-Fill o długości 10 cm i wewnętrznej średnicy 0,84 mm (World Precision Instruments, USA) przy użyciu pionowej wyciągarki elektrod (Narishige PE-2; Scientific Instruments Lab; Japonia). Elektroda rejestrująca była odpowiednio pozycjonowana w preparatach PHa na głębokości co najmniej 50  $\mu$ M przy pomocy mikromanipulatora jednoosiowego (IVM-1000, Scientifica, Wielka Brytania). Pierwsze ok. 10 minut rejestrowanego sygnału służyło zawsze jako zapis kontrolny (CTRL). Następnie skrawki perfundowano związkami farmaceutycznymi rozpuszczonymi w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym.

#### 3.3.1. Wzmacnianie, filtrowanie i cyfryzacja sygnału EEG

Sygnał z pojedynczej elektrody rozdzielany był na dwie ścieżki za pomocą złącz wysokoopornościowych (Grass HI Z Probe; Grass-AstroMed, USA; Ryc. 6), a następnie każda z nich była poddawana odmiennemu filtrowaniu i wzmacnieniu. Dzięki temu, można było rejestrować zarówno LFP, jak i aktywność pojedynczych neuronów jednocześnie, z tego samego miejsca preparatu.



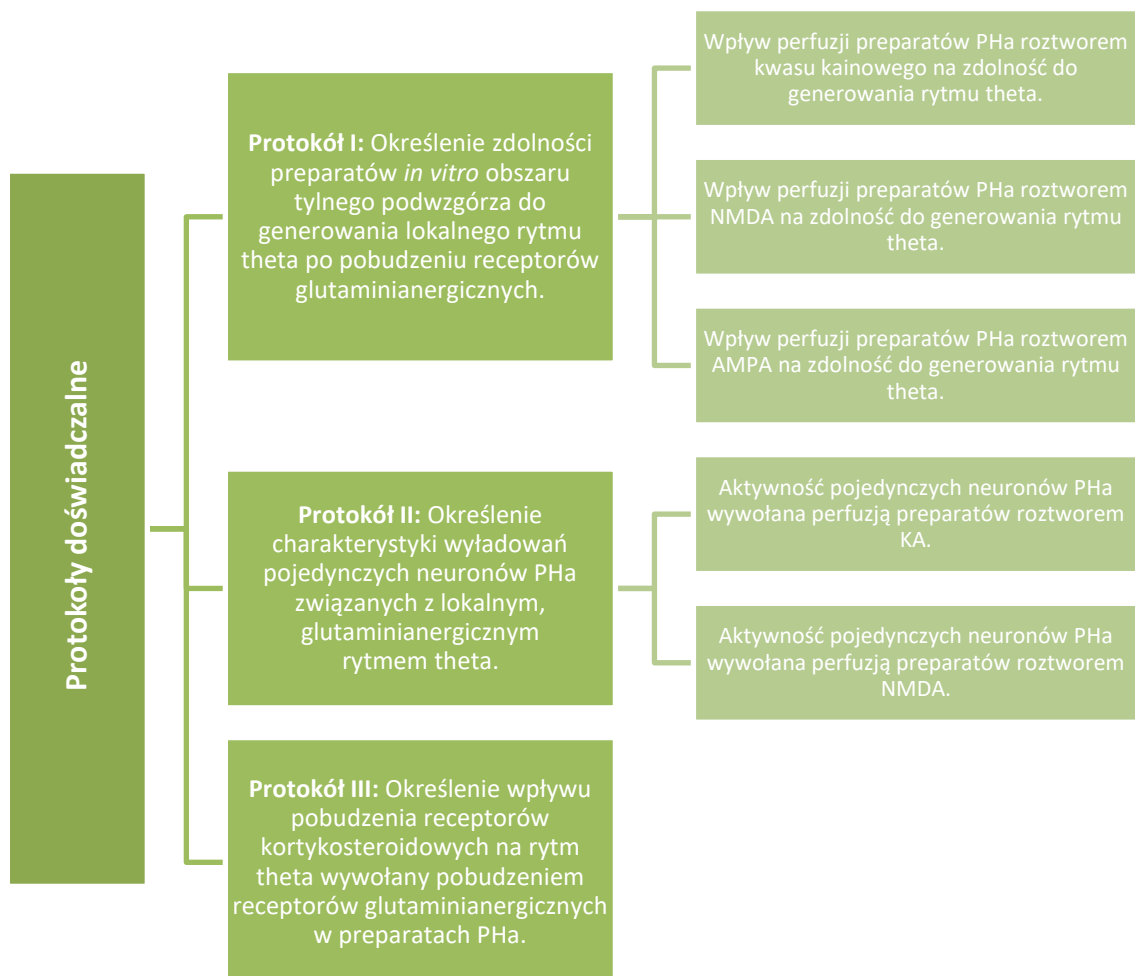
Ryc. 6 Procedura rejestrowania aktywności EEG w PHa, szczegóły w tekście.

W celu rejestracji aktywności polowej (ang. field potentials) sygnał bioelektryczny był wzmacniany (wzmocnienie 1000-krotne, model p-511, Grass-Astromed, USA) oraz filtrowany (filtr dolnoprzepustowy 1 Hz, filtr górnoprzepustowy 0,3 kHz). Z kolei w celu rejestracji aktywności pojedynczych neuronów (ang. unit potentials) sygnał bioelektryczny był wzmacniany 2000-krotnie oraz filtrowany (filtr dolnoprzepustowy 3 Hz, filtr górnoprzepustowy 300 kHz). Następnie, wzmacnione i przefiltrowane sygnały były cyfryzowane (częstotliwość próbkowania: 100 Hz dla potencjałów polowych i 4,17 kHz dla potencjałów czynnościowych pojedynczych neuronów) z wykorzystaniem przetwornika analogowo-cyfrowego Power 1401 (Cambridge Electronic Design, UK). Dane zapisywano na dysku twardym komputera w celu późniejszej analizy off-line (Spike 2.7, Cambridge Electronic Design, UK). Układ podtrzymujący żywotność skrawków oraz aparatura rejestracyjna znajdowały się na stole antywibracyjnym (Standa Opto-Mechanical Products, Litwa) i w klatce Faradaya, która minimalizowała szum elektromagnetyczny, dzięki czemu

artefakty ograniczone były do minimum. W celu ograniczenia zakłóceń elektromagnetycznych, wzmacniacze i filtry umieszczone były poza klatką Faradaya, a każde z urządzeń było uziemione.

### 3.4. Protokoły doświadczalne

Aby osiągnąć cele wyznaczone w niniejszej rozprawie doktorskiej, opracowano trzy protokoły doświadczalne. Miały one za zadanie dostarczyć wyniki pozwalające poznać i scharakteryzować udział receptorów glutaminianergicznych oraz kortykosteroidowych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza, a każdy z nich korespondował z kolejnym celem obranym w niniejszej pracy doktorskiej.





### **3.4.1. Protokół I: wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznych w obszarze tylnego podwzgórza na zdolność do generowania rytmu theta**

Pierwszą fazą badań było określenie wpływu pobudzenia różnego typu receptorów glutaminianergicznych na zdolności preparatów PHa *in vitro* do generowania lokalnego rytmu theta po takiej aktywacji. Doświadczenia przeprowadzono w 3 grupach eksperymentalnych:

#### **Grupa 1**

Do tego cyklu doświadczalnego wykorzystano 45 skrawków PHa pochodzących od 20 szczurów. Skrawki perfundowano roztworem KA (do realizacji **celu 1.1**) w stężeniu 2  $\mu\text{M}$ . W przypadku preparatów pobranych od 5 szczurów, po podaniu KA i zarejestrowaniu rytmu theta, skrawki perfundowano roztworem KA (stężenie 2  $\mu\text{M}$ ) i DNQX (stężenie 50  $\mu\text{M}$ ) w celu określenia, czy rejestrowana aktywność oscylacyjna związana była z pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych typu kainowego.

#### **Grupa 2**

Do tego cyklu doświadczalnego wykorzystano 50 skrawków PHa pochodzących od 20 szczurów. Skrawki perfundowano roztworem NMDA (do realizacji **celu 1.2**) w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . W przypadku preparatów pobranych od 5 szczurów, po podaniu NMDA i zarejestrowaniu rytmu theta, skrawki perfundowano roztworem NMDA (stężenie 100  $\mu\text{M}$ ) i D-AP5 (stężenie 100  $\mu\text{M}$ ) w celu określenia, czy rejestrowana aktywność oscylacyjna związana była z pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych typu NMDA.

### Grupa 3

Do tego cyklu doświadczalnego wykorzystano 40 skrawków PHa pochodzących od 20 szczurów. Skrawki perfundowano roztworem AMPA (do realizacji **celu 1.3**) w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . Jako że w tym cyklu eksperymentalnym nie zarejestrowano rytmu po AMPA, nie przeprowadzono blokowania rytmu.

#### 3.4.2. Protokół II: lokalny, glutaminianergiczny rytm theta w PHa a aktywność pojedynczych neuronów i ich charakterystyka

W celu określenia charakterystyki aktywności neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta, preparaty perfundowano roztworem kwasu kainowego (realizacja **celu 2.1**) albo roztworem NMDA (realizacja **celu 2.2**).

W tym cyklu doświadczeń wykorzystano technikę rejestracji zewnątrzkomórkowej aktywności pojedynczych neuronów obszaru tylnego podwzgórza oraz towarzyszącej im aktywności polowej. We wszystkich eksperymentach rejestracji dokonywano z PH oraz SuM. Wzorce wyładowań komórkowych następnie analizowano i kategoryzowano do jednej z trzech grup:

1. neurony związane z rytmem theta,
2. neurony niezależne od rytmu theta (ang. non-related; NR),
3. neurony chronometryczne.

Podziału neuronów PHa na typy dokonywano w oparciu o powiązanie ich wzorców aktywności z jednoczesnym, lokalnym rytmem theta (lub jego brakiem) zgodnie z szeroko akceptowaną klasyfikacją komórek związanych z rytmem theta

opracowaną przez Coloma i Blanda (1987). Neurony klasyfikowano jako neurony związane z rytmem theta, jeśli generowały potencjały czynnościowe podczas rejestrowanego równocześnie rytmu w PHa. Neurony wyładowujące w sposób losowy, zarówno podczas epizodów rytmu, jak i w czasie interwałów nierytmicznych, klasyfikowano jako neurony niezależne od rytmu theta (NR). Z kolei do grupy neuronów chronometrycznych klasyfikowano te komórki PHa, które generowały potencjały czynnościowe ze stałą częstotliwością i których rytmiczny wzorzec aktywności nie zmieniał się przez co najmniej kilka minut oraz nie był on powiązany z jednoczesnymi epizodami rytmu theta. Doświadczenia przeprowadzono w 2 grupach eksperymentalnych:

### **Grupa 1**

Do tego cyklu doświadczalnego wykorzystano 95 skrawków PHa pochodzących od 40 szczurów. Skrawki perfundowano roztworem kwasu kainowego (do realizacji **celu 2.1**) w stężeniu 2  $\mu$ M.

### **Grupa 2**

Do tego cyklu doświadczalnego wykorzystano 135 skrawków PHa pochodzących od 60 szczurów. Skrawki perfundowano roztworem NMDA (do realizacji **celu 2.2**) w stężeniu 100  $\mu$ M.

### **3.4.3. Protokół III: wpływ pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na lokalny, glutaminianergiczny rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza**

Trzeci protokół dotyczył analizy wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na rytm theta wywołany pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych w preparatach PHa. Do tego cyklu doświadczalnego wykorzystano 40 skrawków PHa pochodzących od 20 szczurów. Skrawki perfundowano roztworem KA (do realizacji **celu 3**) w stężeniu 2  $\mu\text{M}$ . W przypadku zarejestrowania powtarzalnych epizodów rytmu theta, skrawki perfundowano roztworem KA (stężenie 2  $\mu\text{M}$ ) i CORT (stężenie 2  $\mu\text{M}$ ) w celu modulowania wywołanego rytmu. W preparatach pobranych z 5 szczurów, w celu określenia, czy efekt obserwowany po podaniu kortykosteronu związany był z aktywacją receptorów mineralokortykosteroidowych, podawano spironolakton (stężenie 2  $\mu\text{M}$ ).

### **3.5. Analiza parametrów rejestrowanego rytmu theta**

Badanie charakterystyki i parametrów rytmu theta rejestrowanego ze skrawków PHa prowadzono w oparciu o ilościową analizę podstawowych wskaźników określających oscylacje, a mianowicie: amplitudy (AMPL), częstotliwości (FQ) i mocy dominującego pasma częstotliwości (PWR) epizodów. Amplitudę zapisu badano automatycznie przy użyciu oprogramowania Spike 2.7. Istotnymi parametrami służącymi do dalszej analizy były częstotliwość oraz moc dominującego pasma częstotliwości oscylacji, obliczane przez oprogramowanie komputerowe Spike 2.7 przy użyciu algorytmu transformaty Fouriera (ang. Fast

Fourier Transform; FFT). Częstotliwość, amplituda oraz moc mierzone były na 2-sekundowych fragmentach zapisu rytmu.

Poziom rytmiczności wyładowań każdego z neuronów związanych z rytmem theta oraz neuronów chronometrycznych oceniany był na podstawie analizy autokorelacji. Podział komórek na neurony związane i niezwiązane z rytmem theta zależał od wzorców wyładowań przejawianych podczas epizodów theta oraz LIA. Neurony wyładowujące w sposób nieregularny przez cały czas kategoryzowane były jako neurony niezwiązane z rytmem. Z kolei powiązanie wzorców wyładowań ze współwystępującymi epizodami rytmu theta badane było za pomocą analizy korelacji krzyżowej. Jeśli w histogramie autokorelacji lub korelacji krzyżowej obserwowane były regularne, powtarzające się szczyty, oznaczało to wysoki poziom korelacji badanych zapisów; z kolei jeśli histogram był wypłaszczony, to takiej korelacji nie zaobserwowano. Obie te analizy prowadzone były przy użyciu oprogramowania Spike 2.7.

Wartości trzech mierzonych parametrów rejestrowanego rytmu theta (amplitudy, częstotliwości i mocy dominującego pasma częstotliwości) analizowano ilościowo, a uzyskane dane liczbowe poddawano analizie statystycznej (Statistica 13; TIBCO Software, USA), podczas której obliczano średnie statystyczne ( $\bar{x}$ ), błędy standardowe (SE), a dodatkowo, w celu porównania wartości parametrów rytmu theta rejestrowanego w skrawkach PHa, przeprowadzono analizę wariancji (test Kruskala-Wallisa oraz test U Manna-Whitneya).

## **4. WYNIKI**

Przeprowadzono trzy cykle doświadczalne mające na celu scharakteryzowanie udziału receptorów glutaminianergicznych i kortykosteroidowych w generowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza w warunkach *in vitro*.

W tabeli 2 zapisano liczbę zwierząt i preparatów PHa wykorzystanych do przeprowadzenia badań, liczbę pobranych preparatów oraz liczbę udanych doświadczeń (czyli doświadczeń w których zarejestrowano aktywność oscylacyjną theta (dla celu 1.1, 1.2, 1.3 i 3) lub aktywność theta i towarzyszącą jej aktywność pojedynczych neuronów PHa (dla celu 1.2 i 2.2)).

*Tabela 2 Liczba udanych doświadczeń przeprowadzonych w ramach realizacji celów niniejszej pracy doktorskiej.*

Związek chemiczny	Rodzaj eksperymentu	Liczba szczurów	Liczba preparatów	Udane doświadczenia
KA	Wywoływanie rytmu (cel 1.1)	20 (w tym 5 DNQX)	45	39
	Analiza aktywności komórkowej (cel 2.1)	40	95	28
NMDA	Wywoływanie rytmu (cel 1.2)	20 (w tym 5 D-AP5)	50	17
	Analiza aktywności komórkowej (cel 2.2)	60	135	36
AMPA	Wywoływanie rytmu (cel 1.3)	20	40	0
KA+CORT	Modulacja rytmu (cel 3)	20 (w tym 5 SPL)	40	34

Skrawków wykorzystanych do badań NMDA było zauważalnie więcej niż w przypadku KA. Było to spowodowane znacznie niższym prawdopodobieństwem wywołania rytmu, co widać przy porównaniu udanych doświadczeń.

#### **4.1. Określenie zdolności preparatów obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznym**

W pierwszym cyklu eksperymentalnym analizowano zdolność skrawków obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznym. Celem pierwszej serii doświadczalnej (cel 1.1.) było określenie wpływu pobudzenia receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem kwasu kainowego na generowanie lokalnego rytmu theta, celem drugiej serii (cel 1.2.) było określenie wpływu pobudzenia receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem NMDA, a celem trzeciej (cel 1.3.) było określenie wpływu pobudzenia receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem AMPA.

##### **4.1.1. Wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję roztworem kwasu kainowego**

W pierwszej serii pierwszego cyklu eksperymentalnego skrawki PHa perfundowano 2  $\mu$ M roztworem kwasu kainowego. Wykazano, że aktywacja receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję skrawków PHa roztworem KA prowadzi do generowania dobrze zsynchronizowanych epizodów rytmu theta, które pojawiały się natychmiast po tym, jak roztwór docierał do komory inkubacyjnej (Ryc. 7, panel górny i środkowy). Rytm zarejestrowano w 39 z 45



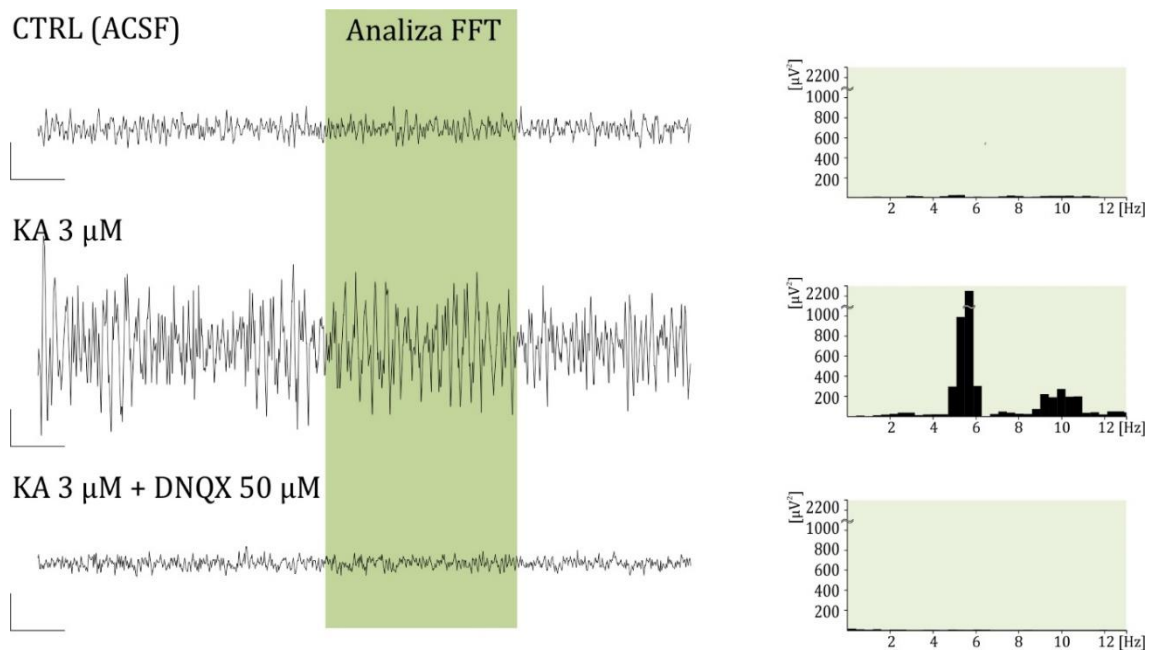
przebadanych preparatów (87% udanych doświadczeń). Oscylacje obecne były przez co najmniej 30 minut rejestracji, w epizodach trwających przeciętnie od 3 do 6 sekund. Najdłuższe i najczęściej pojawiające się epizody obserwowano przez pierwsze 15-20 minut doświadczenia. Tak jak wspomniano wcześniej, ilościowej analizie poddawano trzy parametry rytmu theta: amplitudę, częstotliwość oraz moc dominującego pasma częstotliwości (Tabela 3). Średnia częstotliwość ( $\pm$ SE) rytmu theta wywołanego perfuzją preparatów PHa roztworem KA wynosiła 5.46 ( $\pm$ 0.07) Hz, średnia amplituda to 179.50 ( $\pm$ 9.32)  $\mu$ V, a średnia moc dominującego pasma częstotliwości to 290.51 ( $\pm$ 25.72)  $\mu$ V<sup>2</sup>.

*Tabela 3 Parametry rytmu theta zarejestrowanego z obszaru tylnego podwzgórza w wyniku podawania 2  $\mu$ M KA oraz w wyniku podawania 100  $\mu$ M NMDA. Tabela przedstawia średnie wartości częstotliwości, amplitud i mocy dominującego pasma częstotliwości.*

	KA			NMDA		
	FQ [Hz]	AMPL [ $\mu$ V]	PWR [ $\mu$ V <sup>2</sup> ]	FQ [Hz]	AMPL [ $\mu$ V]	PWR [ $\mu$ V <sup>2</sup> ]
<b>Średnia (<math>\bar{x}</math>)</b>	5,46	179,50	290,51	5,20	193,00	470,76
<b>Błąd standardowy (SE)</b>	0,07	9,32	25,72	0,06	5,81	24,04
<b>Prawdopodobieństwo wywołania rytmu</b>	87%			34%		

W pięciu doświadczeniach, po zarejestrowaniu stabilnych, powtarzalnych epizodów rytmu, w celu określenia, czy wywołany został przez pobudzenie receptorów glutaminianergicznym typu KA, podawano roztwór 2  $\mu$ M KA + 50  $\mu$ M DNQX (6,7-dinitrochinosalino-2,3-dionu), który jest kompetencyjnym antagonistą receptorów KA. We wszystkich pięciu eksperymentach, rytm theta w PHa został

zniesiony w wyniku perfuzji preparatów roztworem zawierającym DNQX (Ryc. 7, dolny panel).



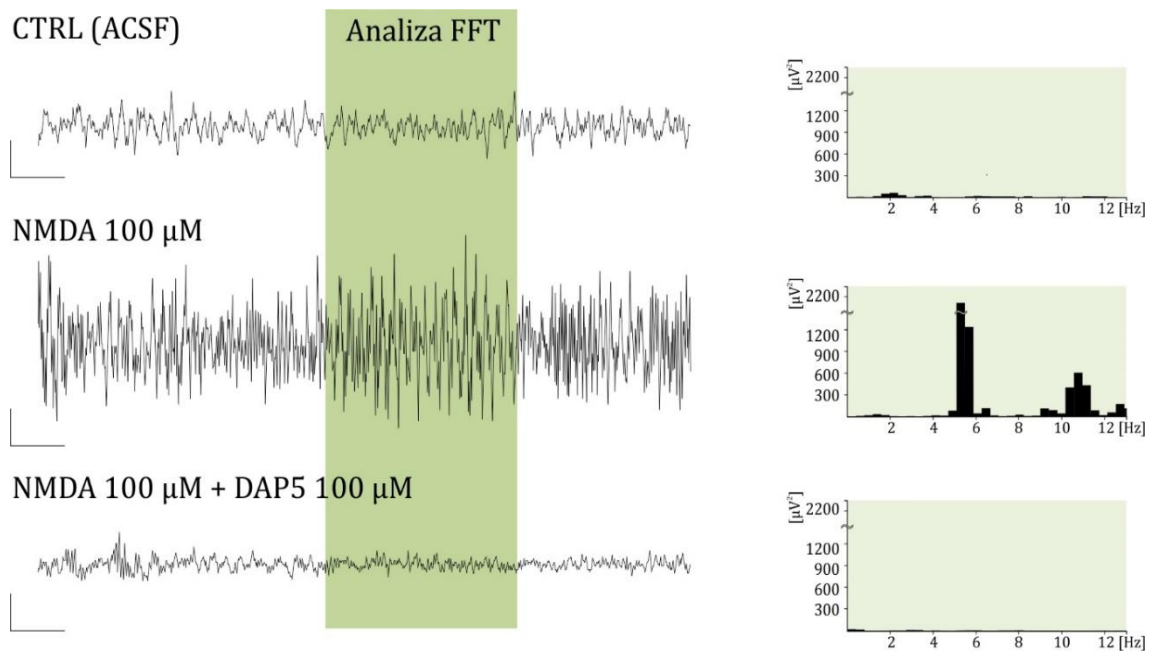
Ryc. 7 Zapisy aktywności polowej rejestrowanej w preparatach obszaru tylnego podwzgórza. Górny panel – kontrola (CTRL); środkowy panel – zapis EEG po podaniu 2  $\mu\text{M}$  kwasu kainowego; dolny panel – zapis  $\mu\text{EEG}$  po podaniu 2  $\mu\text{M}$  KA + 50  $\mu\text{M}$  DNQX. Po prawej stronie znajdują się histogramy mocy dominującego pasma częstotliwości uzyskane w oparciu o analizę FFT. Zielone pole zaznaczone w zapisie oznacza fragment aktywności EEG poddanej analizie FFT. Kalibracja osi: 1 s, 100  $\mu\text{V}$ .

#### 4.1.2. Wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję roztworem NMDA

W drugiej serii pierwszego cyklu badawczego skrawki PHa perfundowano 100  $\mu$ M roztworem NMDA. Dowiedziono, że aktywacja receptorów glutaminianergicznych poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem NMDA prowadzi do generowania silnie zsynchronizowanych epizodów rytmu theta, które pojawiały się również zaraz po tym, gdy roztwór docierał do skrawków (Ryc. 8, panel górny i środkowy). Rytm zarejestrowano w 17 z 50 preparatów (34% udanych doświadczeń). Oscylacje obecne były przez minimum 30 minut rejestracji w epizodach trwających średnio od 3 do 6 sekund. Epizody o największej długości i pojawiające się najczęściej rejestrowano przez pierwsze 15-20 minut doświadczenia. Również i w tym przypadku, ilościowej analizie poddawano trzy parametry rytmu theta: amplitudę, częstotliwość oraz moc dominującego pasma częstotliwości (Tabela 3). Średnia częstotliwość ( $\pm$ SE) rytmu theta wywołanego perfuzją preparatów PHa roztworem NMDA wynosiła 5.20 ( $\pm$ 0.06) Hz, średnia amplituda to 193.00 ( $\pm$ 5.81)  $\mu$ V, a średnia moc dominującego pasma częstotliwości to 470.76 ( $\pm$ 24.04)  $\mu$ V<sup>2</sup>. Prawdopodobieństwo zarejestrowania rytmu theta w preparatach perfundowanych roztworem NMDA było znacząco niższe w porównaniu do perfuzji kwasem kainowym (34% vs. 87% udanych doświadczeń).

W pięciu badaniach, po zarejestrowaniu stabilnych, powtarzalnych epizodów rytmu, w celu określenia, czy wywołany on został przez pobudzenie receptorów glutaminianergicznych typu NMDA, podawano roztwór 100  $\mu$ M NMDA + 100  $\mu$ M D-AP5, który jest kompetencyjnym antagonistą receptorów NMDA. We wszystkich

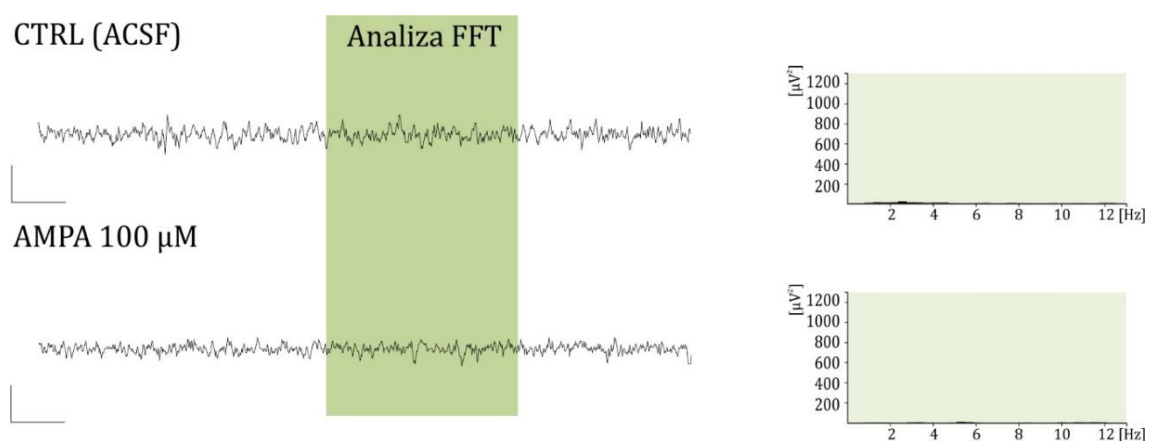
pięciu eksperymentach, rytm theta w PHa został zniesiony w wyniku perfuzji preparatów roztworem zawierającym D-AP5 (Ryc. 8, panel dolny).



Ryc. 8 Zapisy aktywności polowej rejestrowanej w preparatach obszaru tylnego podwzgórza. Górny panel – kontrola (CTRL); środkowy panel – zapis EEG po podaniu 100 μM NMDA; dolny panel – zapis μEEG po podaniu 100 μM NMDA + 100 μM D-AP5. Po prawej stronie znajdują się histogramy mocy dominującego pasma częstotliwości uzyskane w oparciu o analizę FFT. Zielone pole zaznaczone w zapisie oznacza fragment aktywności EEG poddanej analizie FFT. Kalibracja osi: 1 s, 100 μV.

### 4.1.3. Wpływ pobudzenia receptorów glutaminianergiczných poprzez perfuzję roztworem AMPA

W trzeciej serii pierwszego cyklu doświadczalnego skrawki PHa perfundowano 100  $\mu\text{M}$  roztworem AMPA. W żadnym z preparatów nie zarejestrowano rytmu theta w wyniku zastosowanej procedury. Dowiedziono, że aktywacja receptorów glutaminianergiczných poprzez perfuzję skrawków PHa roztworem AMPA nie prowadzi do generowania rytmu theta (Ryc. 9).

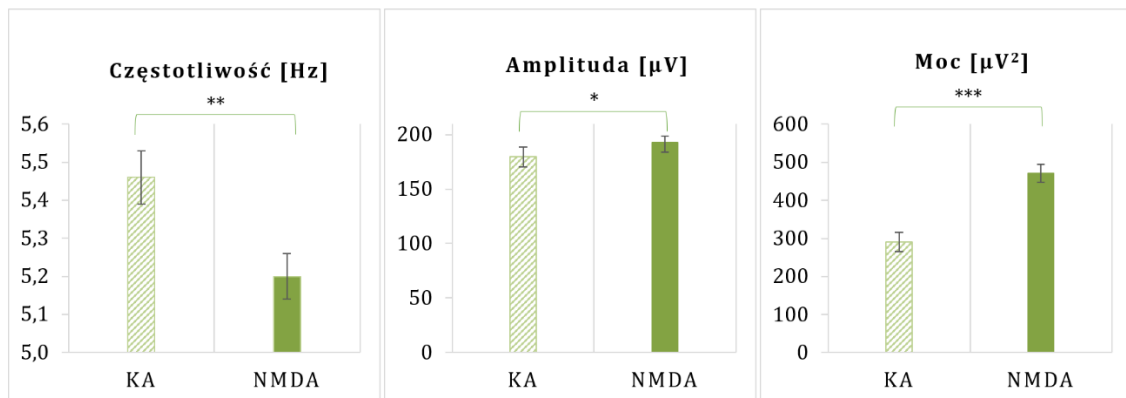


Ryc. 9 Zapisy aktywności polowej rejestrowanej w preparatach obszaru tylnego podwzgórza. Górny panel – kontrola (CTRL); dolny panel – zapis EEG po podaniu 100  $\mu\text{M}$  AMPA. Po prawej stronie znajdują histogramy mocy dominującego pasma częstotliwości uzyskane w oparciu o analizę FFT. Zielone pole zaznaczone w zapisie oznacza fragment aktywności EEG poddanej analizie FFT. Kalibracja osi: 1 s, 100  $\mu\text{V}$ .

### 4.1.4. Porównanie parametrów rytmu theta wywołanego pobudzeniem receptorów glutaminianergiczných poprzez perfuzję kwasem kainowym i NMDA

W celu podsumowania wpływu glutaminianergicznego pobudzenia różnego typu receptorów, porównano wartości podstawowych parametrów rytmu theta rejestrowanego pomiędzy grupami doświadczalnymi, w których zastosowano perfuzję kwasem kainowym vs. NMDA. Przeprowadzona analiza pozwoliła wykazać,

że średnia częstotliwość rytmu theta wywołanego perfuzją roztworem NMDA była istotnie niższa ( $5,20 \pm 0,06$  Hz, test U Manna-Whitneya,  $z=3.10$ ,  $p < 0.01$ ) w porównaniu do częstotliwości rytmu wywołanego perfuzją roztworem KA ( $5,46 \pm 0,07$  Hz). Natomiast podczas perfuzji roztworem NMDA zarówno amplituda ( $193,00 \pm 5,81$   $\mu$ V, test U Manna-Whitneya,  $z=-2.39$ ,  $p < 0.05$ ), jak i moc dominującego pasma częstotliwości ( $470,76 \pm 24,04$   $\mu$ V<sup>2</sup>, test U Manna-Whitneya,  $z=-5.56$ ,  $p < 0.001$ ) były istotnie wyższe w porównaniu do amplitudy ( $179,50 \pm 9,32$   $\mu$ V) i mocy ( $290,51 \pm 25,72$   $\mu$ V<sup>2</sup>) podczas perfuzji roztworem KA (Ryc. 10). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż prawdopodobieństwo wywołania rytmu po perfuzji preparatów PHa roztworem zawierającym KA było ponad dwukrotnie wyższe niż po NMDA (87% vs. 34%).



Ryc. 10 Porównanie wartości średnich ( $\pm$ SE) częstotliwości (panel lewy), amplitudy (panel środkowy) i mocy dominującego pasma częstotliwości (panel prawy) rytmu rejestrowanego po perfuzji roztworem KA oraz po perfuzji preparatów roztworem NMDA (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; test U Manna-Whitneya). Szczegóły w tekście.

#### 4.2. Określenie charakterystyki wyładowań pojedynczych neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta

W drugim cyklu badawczym analizowano charakterystykę i wzorce wyładowań neuronalnych w skrawkach obszaru tylnego podwzgórza po aktywacji receptorów glutaminianergicznym. Celem pierwszej serii doświadczalnej cyklu drugiego (cel 2.1.) było zbadanie aktywności pojedynczych neuronów wywołanej pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem KA, a celem drugiej serii (2.2.) było zbadanie aktywności pojedynczych neuronów wywołanej pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem NMDA. W tabeli 4 podana została liczba oraz klasyfikacja neuronów zarejestrowanych w obu seriach doświadczalnych po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznym w preparatach obszaru tylnego podwzgórza.

Tabela 4 Liczba i klasyfikacja neuronów zarejestrowanych po perfuzji preparatów PHa roztworami KA i NMDA.

Klasyfikacja komórek	KA (2 $\mu$ M)	NMDA (100 $\mu$ M)
Neurony NR	17	26
Neurony chronometryczne	8	10
Neurony theta-on fazowe	3	-
Łącznie	28	36
Liczba preparatów	40	60

#### **4.2.1. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym KA**

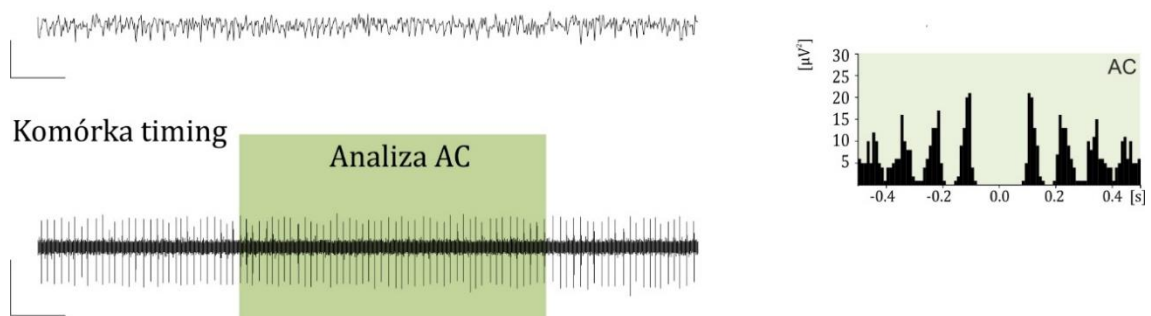
W pierwszej serii drugiego cyklu badawczego zastosowano perfuzję skrawków PHa 2  $\mu$ M roztworem KA i rejestrowano aktywność pojedynczych neuronów. Trzy neurony sklasyfikowano jako neurony theta-on fazowe, podczas gdy aktywność pozostałych 25 neuronów scharakteryzowano jako niezależne od rytmu theta rejestrowanego równocześnie w PHa, a 8 z nich skategoryzowano jako neurony chronometryczne. Zarejestrowano łącznie 28 neuronów w doświadczeniach prowadzonych na 40 preparatach, co daje skuteczność na poziomie 70%. Nie zaobserwowano różnic w prawdopodobieństwie zarejestrowania aktywnych neuronów między SuM a PH.



4.2.1.1. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA – neurony chronometryczne

Spośród 28 zarejestrowanych neuronów, osiem (28.57%) zaklasyfikowano do grupy neuronów chronometrycznych. Typowy wzorzec wyładowań takich neuronów pokazano na rycinie Ryc. 11. Histogram autokorelacji pokazuje bardzo silną rytmiczność wyładowań tej komórki. Każda z komórek chronometrycznych wyładowywała niezależnie od obecności lokalnego rytmu theta w zapisie polowym w obszarze tylnego podwzgórza. Aktywność takich neuronów pozostawała niezmienna przez dłuższe okresy (10-20 min.).

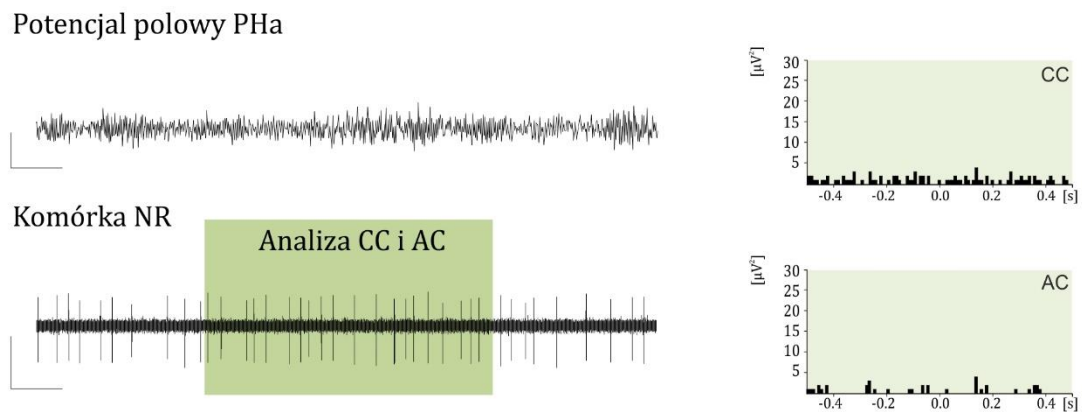
Potencjał polowy PHa



Ryc. 11 Zapis potencjału polowego i aktywności pojedynczej komórki chronometrycznej zarejestrowanych w preparacie PHa po perfuzji roztworem KA (2  $\mu$ M). Histogram autokorelacji (AC) pokazuje wysoki poziom rytmiczności wyładowań neuronu. Kalibracja osi: 1 s, 100  $\mu$ V.

4.2.1.2. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA – neurony niezależne od rytmu theta

Siedemnaście spośród 28 zarejestrowanych neuronów (60.71%) skategoryzowano jako neurony niezależne od rytmu theta (NR). Neurony te wyładowywały w sposób nieregularny i niepowiązany ze współistniejącą aktywnością polową. Przykładowa charakterystyka wyładowań takich neuronów pokazana jest na rycinie 12. Histogram autokorelacji pokazuje brak rytmiczności wyładowań tej komórki. Z kolei histogram korelacji krzyżowej ilustruje brak powiązania wyładowań neuronu NR z aktywnością polową w PHa.

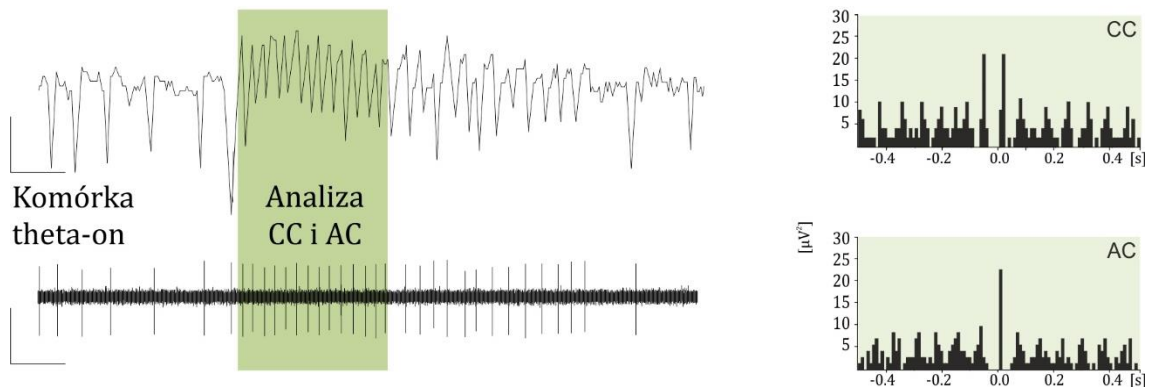


Ryc. 12 Zapis potencjału polowego i aktywności pojedynczej komórki niezwiązanej z rytmem theta zarejestrowanych w preparacie PHa po perfuzji roztworem KA ( $2 \mu\text{M}$ ). Histogram korelacji wzajemnej (CC) pokazuje brak powiązania aktywności komórkowej z potencjałem polowym, a histogram autokorelacji (AC) pokazuje niski poziom rytmiczności wyładowań neuronu. Kalibracja osi: 1 s, 100  $\mu\text{V}$ .

4.2.1.3. Aktywność neuronów theta-zależnych wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych KA – neurony theta-on fazowe

Trzy spośród 28 zarejestrowanych neuronów (10.71%) przyporządkowano do grupy neuronów theta-on fazowych. Przykładowy wzorzec wyładowań takich komórek pokazany jest na rycinie 13. Neuron ten wyładowuje rytmicznie wraz z pojawieniem się oscylacji theta, a przestaje wyładowywać, gdy rytm theta przestaje być obserwowany. Histogram autokorelacji (AC) pokazuje wysoką rytmiczność tych wyładowań, a histogram korelacji krzyżowej (CC) wskazuje na jasną zależność pomiędzy pojedynczymi wyładowaniami a fazą jednocześnie występującego rytmu theta.

Potencjał połowy PHa



Ryc. 13 Zapis potencjału połowego i aktywności pojedynczej komórki związanej z rytmem theta (neuron theta-on) zarejestrowanych w preparacie PHa po perfuzji roztworem KA ( $2 \mu\text{M}$ ). Histogram korelacji wzajemnej (CC) pokazuje wysokie powiązanie aktywności komórkowej z potencjałem połowym, a histogram autokorelacji (AC) pokazuje wysoki poziom rytmiczności wyładowań neuronu.

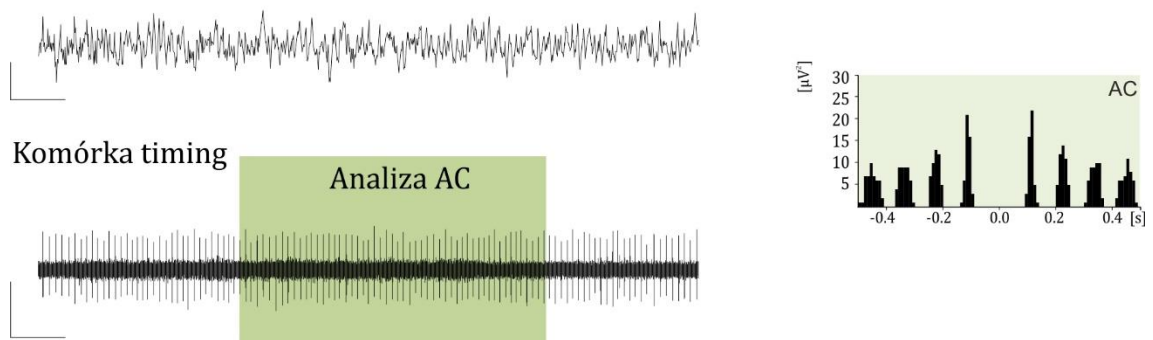
#### **4.2.2. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznym NMDA**

W drugiej serii drugiego cyklu badawczego związanego z analizą aktywności pojedynczych neuronów zastosowano perfuzję skrawków PHa 100  $\mu$ M roztworem NMDA, a następnie rejestrowano aktywność pojedynczych neuronów i towarzyszącą im aktywność polową w skrawkach tylnego podwzgórza. Nie zarejestrowano aktywności neuronów zależnych od rytmu theta - aktywność wszystkich 36 neuronów scharakteryzowano jako niezależne od jednoczesnego rytmu theta w PHa, a 10 z nich skategoryzowano jako neurony chronometryczne. Nie zaobserwowano różnic w prawdopodobieństwie zarejestrowania aktywnych neuronów między SuM a PH. Jednak, w porównaniu z neuronami zarejestrowanymi po perfuzji skrawków PHa roztworem KA, prawdopodobieństwo rejestracji neuronów po NMDA było niższe, gdyż zarejestrowano 36 neuronów w eksperymentach prowadzonych na 60 skrawkach. Daje to skuteczność na poziomie 60%.

4.2.2.1. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych NMDA – neurony chronometryczne

Spośród 36 zarejestrowanych neuronów 10 (27.78%) zaklasyfikowano do grupy neuronów chronometrycznych. Typowy wzorzec wyładowań takich neuronów pokazano na rycinie 14. Histogram autokorelacji (AC) pokazuje bardzo silną rytmiczność wyładowań tego neuronu. Każda z komórek chronometrycznych wyładowywała niezależnie od obecności lokalnego rytmu theta na potencjale polowym w PHa. Aktywność takich neuronów pozostawała niezmienna przez dłuższy czas (10-20 min.).

Potencjał polowy PHa

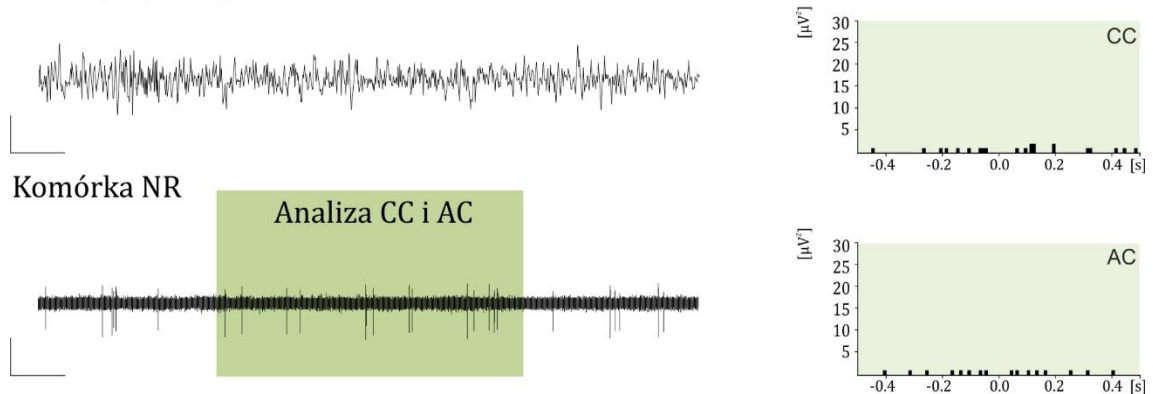


Ryc. 14 Zapis potencjału polowego i aktywności pojedynczej komórki chronometrycznej zarejestrowanych w preparacie PHa po perfuzji roztworem NMDA ( $100 \mu M$ ). Histogram autokorelacji (AC) pokazuje wysoki poziom rytmiczności wyładowań neuronu. Kalibracja osi: 1 s,  $100 \mu V$ .

4.2.2.2. Aktywność neuronów wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych NMDA – neurony niezależne od rytmu theta

Spośród 36 zarejestrowanych neuronów 26 (72.22%) skategoryzowano jako neurony niezależne od rytmu theta (NR). Przykładowy wzorzec wyładowań takich neuronów pokazany jest na rycinie 15. Histogram autokorelacji (AC) ilustruje brak rytmiczności wyładowań tej komórki. Z kolei histogram korelacji krzyżowej (CC) pokazuje brak powiązania wyładowań neuronu NR z aktywnością polową w PHa.

Potencjał polowy PHa

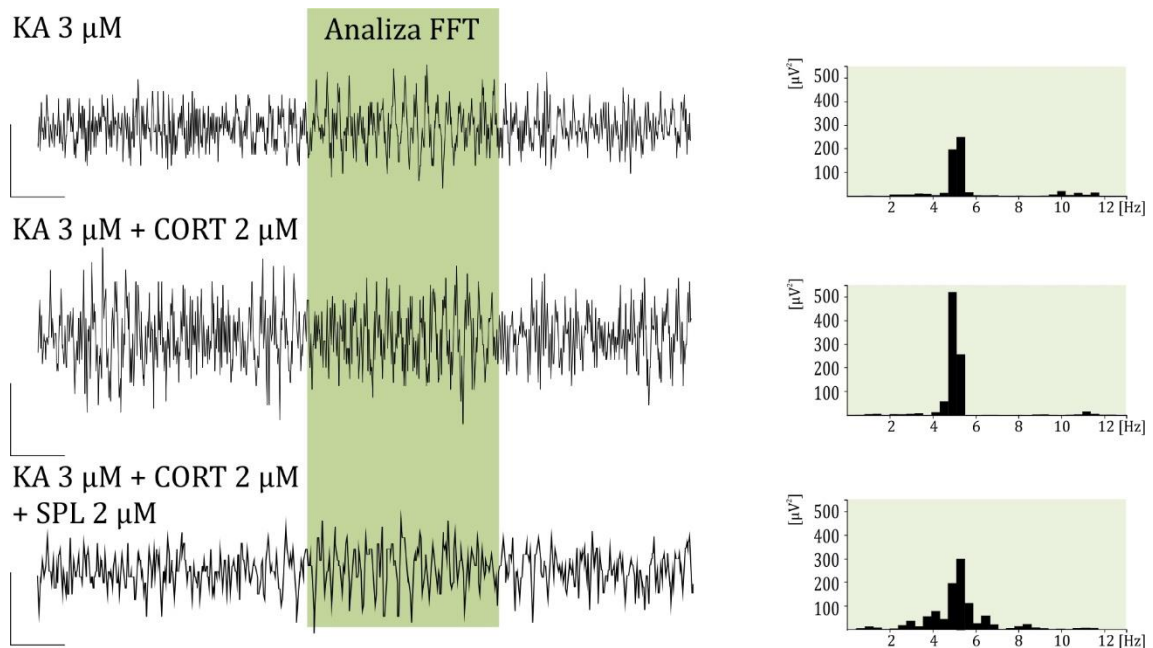


Ryc. 15 Zapis potencjału polowego i aktywności pojedynczej komórki niezwiązanej z rytmem theta zarejestrowanych w preparacie PHa po perfuzji roztworem NMDA ( $100 \mu\text{M}$ ). Histogram korelacji wzajemnej (CC) pokazuje brak powiązania aktywności komórkowej z potencjałem polowym, a histogram autokorelacji (AC) pokazuje niski poziom rytmiczności wyładowań neuronu. Kalibracja osi: 1 s,  $100 \mu\text{V}$ .

### **4.3. Określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na rytm theta wywołany pobudzeniem receptorów glutaminianergicznymi w preparatach PHa**

W trzecim cyklu badawczym analizowano wpływ aktywacji receptorów kortykosteroidowych na lokalny, glutaminianergiczny rytm theta obecny w skrawkach obszaru tylnego podwzgórza. Zastosowano kwas kainowy na podstawie pierwszego cyklu doświadczalnego, z którego wynikało, iż prawdopodobieństwo rytmu po perfuzji skrawków PHa roztworem KA jest znacznie wyższe niż po NMDA. W tym celu, początkowo zastosowano perfuzję preparatów PHa 2  $\mu$ M roztworem KA, a po zarejestrowaniu dobrze zsynchronizowanych epizodów rytmu theta, skrawki perfundowano roztworem 2  $\mu$ M kwasu kainowego + 2  $\mu$ M kortykosteronu (Ryc. 16). Zaobserwowano wyraźne wzmocnienie parametrów rejestrowanego w skrawkach PHa rytmu theta.

Na podstawie wcześniejszych badań (Bocian i wsp., 2016a), podejrzewano, iż w efekt modulujący mogą być zaangażowane receptory mineralokortykosteroidowe, stąd sprawdzono, czy efekt wywierany przez kortykosteron związany był z pobudzeniem właśnie receptorów mineralokortykosteroidowych. W pięciu badaniach, gdy wywoływany rytm theta był powtarzalny, a modulacja związana z podaniem kortykosteronu widoczna, podawano roztwór 2  $\mu$ M KA + 2  $\mu$ M CORT + 2  $\mu$ M SPL (który jest antagonistą receptorów MR). We wszystkich pięciu eksperymentach perfuzja preparatów roztworem zawierającym spironolakton powodowała inhibicję pobudzającego działania kortykosteronu i powrót parametrów rejestrowanego rytmu do wartości zbliżonych do tych, które obserwowane były po podaniu jedynie kwasu kainowego.



Ryc. 16 Zapisy aktywności polowej w preparatach obszaru tylnego podwzgórza. Górny panel – zapis rytmu theta po podaniu KA (2  $\mu\text{M}$ ); środkowy panel – zapis rytmu theta po podaniu KA (2  $\mu\text{M}$ ) + CORT (2  $\mu\text{M}$ ); dolny panel – zapis rytmu theta po podaniu KA (2  $\mu\text{M}$ ) + CORT (2  $\mu\text{M}$ ) + SPL (2  $\mu\text{M}$ ). Po prawej stronie znajdują się histogramy mocy dominującego pasma częstotliwości uzyskane w oparciu o analizę FFT. Zielone pole oznacza aktywność EEG poddaną analizie FFT. Kalibracja osi: 1 s, 100  $\mu\text{V}$ .

Tak jak w poprzednim cyklu, ilościowej analizie poddawano trzy parametry rytmu theta rejestrowane podczas doświadczeń: amplitudę, częstotliwość oraz moc dominującego pasma częstotliwości (wyniki przedstawiono w tabeli 5). Średnia częstotliwość ( $\pm\text{SE}$ ) obserwowanego rytmu theta wywołanego perfuzją preparatów roztworem KA w tym cyklu badawczym to 5.44 ( $\pm 0.07$ ) Hz, średnia amplituda to 142.72 ( $\pm 5.45$ )  $\mu\text{V}$ , a średnia moc dominującego pasma częstotliwości to 224.62 ( $\pm 18.71$ )  $\mu\text{V}^2$ . Z kolei średnia częstotliwość ( $\pm\text{SE}$ ) obserwowanego rytmu theta wywołanego perfuzją preparatów roztworem KA + CORT w tym cyklu badawczym to 5.47 ( $\pm 0.08$ ) Hz, średnia amplituda to 206.00 ( $\pm 10.41$ )  $\mu\text{V}$ , a średnia moc dominującego pasma częstotliwości to 580.20 ( $\pm 63.96$ )  $\mu\text{V}^2$ . Natomiast średnia częstotliwość ( $\pm\text{SE}$ ) obserwowanego rytmu theta wywołanego perfuzją preparatów roztworem KA + CORT + SPL w tym cyklu badawczym to 5.45 ( $\pm 0.19$ ) Hz, średnia



amplituda to 128.57 ( $\pm 9.13$ )  $\mu\text{V}$ , a średnia moc dominującego pasma częstotliwości to 195.00 ( $\pm 19.80$ )  $\mu\text{V}^2$ .

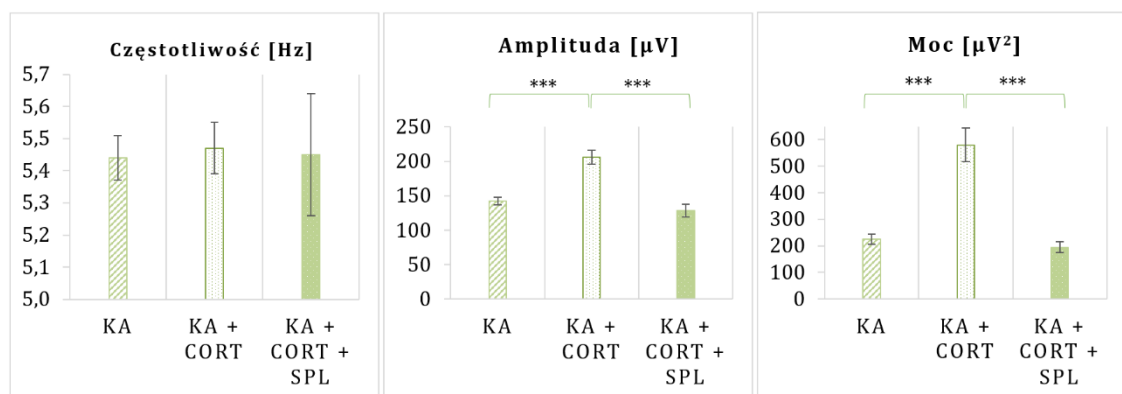
*Tabela 5 Porównanie podstawowych parametrów (amplitudy (AMPL), częstotliwości (FQ) i mocy częstotliwości dominującej (PWR)) rytmu theta zarejestrowanego z obszaru tylnego podwzgórza w wyniku perfuzji skrawków roztworem kwasu kainowego, mieszaniną roztworów KA + CORT oraz mieszaniną roztworów KA + CORT + SPL.*

Średnia $\pm$ błąd standardowy ( $\bar{x} \pm SE$ )			
	FQ [Hz]	AMPL [ $\mu\text{V}$ ]	PWR [ $\mu\text{V}^2$ ]
KA (2 $\mu\text{M}$ )	5,44 $\pm$ 0,07	142,72 $\pm$ 5,45	224,62 $\pm$ 18,71
KA (2 $\mu\text{M}$ ) + CORT (2 $\mu\text{M}$ )	5,47 $\pm$ 0,08	206,00 $\pm$ 10,41	580,20 $\pm$ 63,96
KA (2 $\mu\text{M}$ ) + CORT (2 $\mu\text{M}$ ) + SPL (2 $\mu\text{M}$ )	5,45 $\pm$ 0,19	128,57 $\pm$ 9,13	195,00 $\pm$ 19,80

W celu podsumowania wpływu kortykosteroidowej modulacji glutaminianergicznego rytmu w PHa, porównano wartości podstawowych parametrów rytmu theta rejestrowanego pomiędzy grupami doświadczalnymi, w których zastosowano perfuzję kwasem kainowym vs. perfuzję roztworem KA + CORT (Ryc. 17). Przeprowadzona analiza pozwoliła wykazać, że wartości średnie zarówno amplitudy (206,00 $\pm$ 10,41  $\mu\text{V}$ , test U Manna-Whitneya,  $z=-5.05$ ,  **$p<0.001$** ), jak i mocy dominującego pasma częstotliwości (580,20 $\pm$ 63,96  $\mu\text{V}^2$ , test U Manna-Whitneya,  $z=-5.73$ ,  **$p<0.001$** ) były istotnie wyższe w eksperymentach, w których podawano mieszaninę kwasu kainowego i kortykosteronu, w porównaniu do amplitudy (142,72 $\pm$ 5,45  $\mu\text{V}$ ) i mocy (224,62 $\pm$ 18,71  $\mu\text{V}^2$ ) eksperymentów rejestrowanych po perfuzji preparatów jedynie roztworem kwasu kainowego. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między

częstotliwością epizodów badaną w obydwu grupach. W kolejnej analizie, porównano wartości parametrów statystycznych pomiędzy grupami eksperymentalnymi, w których zastosowano perfuzję mieszaniną KA + CORT vs. perfuzję mieszaniną KA + CORT + SPL (Ryc. 17). Wykazano, że zarówno amplituda ( $128,57 \pm 9,13 \mu\text{V}$ , test U Manna-Whitneya,  $z=4.22$ ,  $p < 0.001$ ), jak i moc dominującego pasma częstotliwości ( $195,00 \pm 19,80 \mu\text{V}^2$ , test U Manna-Whitneya,  $z=4.39$ ,  $p < 0.001$ ) są istotnie niższe w eksperymentach, w których podawano mieszaninę KA + CORT + SPL. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między częstotliwością epizodów badaną w obydwu grupach.

W celu sprawdzenia, czy blokowanie receptorów MR znosi pobudzający efekt kortykosteronu, wywierany na glutaminianergiczny rytm theta w PHa, porównano wartości parametrów statystycznych pomiędzy grupami doświadczalnymi po KA vs. po KA + CORT + SPL (Ryc. 17). Nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy obiema grupami w zakresie średnich wartości częstotliwości, amplitudy oraz mocy rejestrowanego rytmu theta.



Ryc. 17 Porównanie wartości średnich ( $\pm\text{SE}$ ) częstotliwości (panel lewy), amplitudy (panel środkowy) i mocy dominującego pasma częstotliwości (panel prawy) rytmu theta rejestrowanego po perfuzji preparatów roztworem KA, po perfuzji mieszaniną KA + CORT oraz po perfuzji roztworem KA + CORT + SPL (\*\* $p < 0,001$ ; test U Manna-Whitneya). Szczegóły w tekście.

## **5. DYSKUSJA**

W niniejszej rozprawie doktorskiej zrealizowano 3 główne cele, dzięki czemu scharakteryzowano udział wybranych receptorów glutaminianergicznych i kortykosteroidowych w generowaniu oraz modulowaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza w modelu *in vitro*.

**Pierwszym celem** było określenie zdolności skrawków obszaru tylnego podwzgórza do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych. Wykazano, iż pobudzenie tych receptorów poprzez perfuzję preparatów PHa roztworem kwasu kainowego oraz roztworem NMDA może wywoływać rytm theta zarówno w jądrze nadsuteczki, jak i w jądrach tylnego podwzgórza. Natomiast skrawki PHa perfundowane roztworem AMPA nie wykazywały zdolności do rytmogenezy.

**Drugim celem** było zbadanie charakterystyki wyładowań pojedynczych neuronów PHa oraz ich związku z lokalnym rytmem theta wywołanym aktywacją receptorów glutaminianergicznych. Spośród wszystkich zarejestrowanych komórek, przeważającą część (zarówno przy zastosowaniu roztworu KA, jak i NMDA) stanowiły neurony niezależne od współwystępującego w PHa rytmu theta. Kolejną, liczną grupą komórek były neurony chronometryczne – wzorzec ich wyładowań nie jest związany z lokalnym rytmem, lecz na podstawie wcześniejszych badań (Bocian i wsp., 2016b) można przypuszczać, iż są one zaangażowane w genезę rytmu w HPC. Najmniejszą grupę stanowiły natomiast neurony zależne od rytmu theta – trzy takie komórki zarejestrowano jedynie po aktywacji kainowej. Zaklasyfikowano je jako neurony theta-on fazowe, zgodnie z wcześniejszymi klasyfikacjami komórek theta-zależnych (Bocian i wsp., 2016b; Colom i Bland, 1987).

**Trzecim celem** było określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na lokalny rytm theta o podłożu glutaminianergicznym obecny w preparatach *in vitro* obszaru tylnego podwzgórza. Dowiedziono, iż rytm ten jest modulowany przez kortykosteron w taki sposób, iż zarówno moc, jak i amplituda epizodów zwiększają się. Wyniki uzyskane w niniejszym opracowaniu pozwalają wysunąć tezę, iż pobudzenie receptorów mineralokortykosteroidowych moduluje lokalny, glutaminianergiczny rytm theta w PHa, istotnie zwiększając jego amplitudę i moc dominującego pasma częstotliwości.

### **5.1. Glutaminianergiczne podłoże rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza**

Jak wspomniano we wstępie, dzięki szerokim badaniom elektrofizjologicznym, w formacji hipokampa wyróżniono dwa odmienne typy rytmu theta pod względem ich charakterystyki neurochemicznej i powiązań behawioralnych. Rytm theta typu 1 (7-12 Hz) występuje podczas aktywności ruchowej zwierzęcia i ma podłoże niecholinergiczne (przypuszczalnie przede wszystkim serotoninericzne; Gutiérrez-Guzmán i wsp., 2017; Vanderwolf i Baker, 1986). Ten typ rytmu rejestrowany jest u zwierząt swobodnie poruszających się, a ekspozycja na związki anestetyczne prowadzi do jego hamowania (Vanderwolf, 1969). Rytm theta typu 2 (4-7 Hz) powiązany jest ze stanem bezruchu zwierzęcia. Ma on charakter cholinergiczny – podanie agonistów receptorów cholinergicznych (acetylocholino, karbacholu) skutkuje pojawieniem się rytmu, a podanie antagonistów (siarczan atropiny) prowadzi do jego blokowania (Bland, 1986). Co więcej, generowanie rytmu theta typu 2 niezależne jest od ekspozycji zwierzęcia na anestetyki,

dzięki czemu można go rejestrować w eksperymentach z ich użyciem (Bland, 1986; Gołebiewski i wsp., 1996; Kowalczyk i wsp., 2013a; Leung, 1998; Vanderwolf, 1969). Warto dodać, iż już w 1988 roku postulowano, iż rytm theta w zakresie częstotliwości typu 2 może być generowany w formacji hipokampa również po zastosowaniu pobudzenia o charakterze niecholinergicznym. Wykazano, że blokowanie receptora NMDA poprzez dokomorowe podanie kwasu 2-aminofosfonowalerianowego (ang. 2-aminophosphonovaleric acid) osłabia rytm theta w HPC u swobodnie poruszających się szczurów (Leung i Desborough, 1988). Podczas doświadczeń innej grupy badawczej, podanie d-cykloseryny (częściowego agonisty receptora NMDA) zwiększało moc rytmu theta rejestrowanego w zakrębie zębatym formacji hipokampa, a podanie MK-801, antagonisty receptora NMDA, zmniejszało moc i częstotliwość hipokampalnego rytmu (Pitkänen i wsp., 1995). Kolejne eksperymenty pozwoliły udowodnić, iż podawanie NMDA bezpośrednio do formacji hipokampa (zarówno *in vitro*, jak i u szczurów anestetyzowanych uretanem) skutkowało generowaniem dobrze zsynchronizowanych epizodów rytmu theta (Bland i wsp., 2007; Bonansco i Buño, 2003; Kazmierska i Konopacki, 2013). Co ważne, rytm wywołany w ten sposób znoszony był przez dohipokampalne iniekcje D-AP5, lecz nie miało na niego wpływu podanie siarczanu atropiny (Bland i wsp., 2007). W dalszych badaniach wykazano również, że aktywacja kolejnego typu receptorów glutaminianergicznym (kainowym) może prowadzić do generowania/modulacji rytmu theta w obecnego HPC. Podanie antagonisty receptora KA2 do formacji hipokampa u swobodnie poruszających się szczurów modulowało hipokampalny rytm, prowadząc do znacznego obniżenia częstotliwości rejestrowanej aktywności oscylacyjnej (Huxter i wsp., 2007). Przedstawione powyżej wyniki wyraźnie wskazują na to, że rytm theta w obrębie

formacji hipokampa może być generowany w wyniku pobudzenia układu glutaminianergicznego. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, iż wpływ aktywacji receptorów glutaminianergiczných na zdolność obszaru tylnego podwzgórza do generowania rytmu theta nie był dotąd przedmiotem analiz eksperymentalnych.

Wśród receptorów glutaminianergiczných można wyróżnić receptory metabotropowe oraz, między innymi, trzy typy receptorów jonotropowych bramkowanych ligandem (KA, NMDA i AMPA), których aktywacja zawsze prowadzi do pobudzającej odpowiedzi postsynaptycznej (Frerking i Ohliger-Frerking, 2002; Purves i wsp., 2001). Co istotne, badania na modelu *in vitro* potwierdziły występowanie licznych receptorów glutaminianergiczných sporadycznie rozmieszczonych w szczurzym podwzgórzu, w tym ok. 1/3 to receptory NMDA, ok. 1/3 to receptory nie-NMDA (KA/AMPA), a ok. 1/3 to receptory metabotropowe (Meeker i wsp., 1994). Doświadczenia prowadzone za pomocą techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych oraz hybrydyzacji „northern” wykazały, iż więcej podjednostek receptorów glutaminianergiczných znajduje się w HPC w porównaniu do podwzgórza, ale niektóre z nich (np. GluR5, podjednostka receptora KA) ulegają większej ekspresji w podwzgórzu (van den Pol i wsp., 1994). W innych eksperymentach udowodniono, iż w obszarze tylnego podwzgórza, a dokładniej w jądrze nadsuteczki, znajdują się wszystkie oznaczane podjednostki receptorów KA, NMDA i AMPA, jednakże w największej liczbie i gęstości typ KA2 (Eyigor i wsp., 2001).

Podłoże cholinergiczne rytmu theta generowanego lokalnie w obszarze tylnego podwzgórza zostało eksperymentalnie potwierdzone (Bocian i wsp., 2016b; Caban i wsp., 2018; Kowalczyk i wsp., 2014). Badania prowadzone zarówno na modelu

znieczulonych uretanem szczurów, jak i w odnerwionych preparatach PHa *in vitro* wykazały, iż sieci neuronalne PHa po pobudzeniu karbacholem zdolne były do generowania rytmu theta niezależnego od hipokampalnej aktywności theta, który hamowany był przez podanie siarczanu atropiny (Kowalczyk i wsp., 2014). W późniejszych doświadczeniach analizowano też wzorce aktywności pojedynczych komórek obszaru tylnego podwzgórza po aktywacji cholinergicznej i udowodniono obecność kilku typów neuronów, których aktywność była skorelowana z generowanym lokalnie rytmem theta w tej strukturze: komórek theta-on, theta-off, komórek bramkujących oraz komórek chronometrycznych (Bocian i wsp., 2016b).

Przedstawione powyżej dane wskazują, iż aktywacja układu cholinergicznego w obrębie PHa prowadzi do powstawania rytmu theta oraz towarzyszącej mu aktywności neuronalnej. Nie ma jednak żadnych danych literaturowych, wskazujących na udział w tych procesach układu glutaminianergicznego. Przekaznictwo glutaminianergiczne zaangażowane jest w większość homeostatycznych i autonomicznych funkcji podwzgórzowych takich jak: metabolizm (Royo i wsp., 2022), odpowiedź stresowa organizmu (Bartanusz i wsp., 1995; Kuzmiski i wsp., 2010), regulacja ciśnienia krwi (Busnardo i wsp., 2012; Royo i wsp., 2022), czy generowanie rytmów okołodobowych (Meijer i wsp., 1993; Michel i wsp., 2002; Mizoro i wsp., 2010). Ze względu na udział aktywacji receptorów glutaminianergicznych w tak istotnych funkcjach realizowanych na poziomie podwzgórza, ich udowodnioną obecność w tylnym obszarze tej struktury oraz brak danych literaturowych w zakresie potencjalnego glutaminianergicznego tła



lokalnego rytmu w PHa, rozpoczęto badania, których wyniki opisane zostały w obecnej rozprawie doktorskiej.

W opisywanych doświadczeniach, po raz pierwszy eksperymentalnie wykazano, że perfuzja odnerwionych preparatów PHa roztworami KA lub NMDA skutkuje generowaniem epizodów dobrze zsynchronizowanego rytmu theta zarówno w jądrze nadsuteczki, jak i w jądrach tylnego podwzgórza. Co ciekawe, pobudzenie receptorów AMPA nie powoduje genezy oscylacji. W kontekście podstawowych parametrów rejestrowanych w PHa aktywności, rytm obserwowany po podaniu roztworu NMDA charakteryzował się istotnie wyższą amplitudą oraz mocą w porównaniu do rytmu wywołanego perfuzją preparatów roztworem KA, należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż prawdopodobieństwo wywołania lokalnego rytmu theta w PHa było ponad dwukrotnie wyższe w przypadku perfuzji skrawków roztworem kwasu kainowego. Ta ogromna różnica (34% vs. 87%) wynikała prawdopodobnie z tego, iż w obszarze tylnego podwzgórza u szczurów to właśnie receptory KA stanowią najliczniejszą populację receptorów glutaminianergicznych (Eyigor i wsp., 2001). Wyniki omawianych doświadczeń dotyczących obecności neuronów związanych z lokalnym rytmem theta (komórek theta-on fazowych) aktywowanych poprzez pobudzenie receptorów KA i NMDA pozwalają dodatkowo wyjaśnić obserwowaną różnicę. Wyniki te zostaną omówione w kolejnych podrozdziałach pracy. Nie jest jednak znany mechanizm wyjaśniający wyższe parametry rytmu obserwowanego po perfuzji skrawków PHa roztworem NMDA, mimo znacznie niższego prawdopodobieństwa wywołania aktywności oscylacyjnej. Kolejną istotną obserwacją poczynioną podczas obecnych badań był fakt, iż perfuzja preparatów PHa roztworem AMPA jest całkowicie nieefektywna w wywoływaniu

lokalnych oscylacji w paśmie theta. Jak wspomiano wcześniej, receptory te są obecne w neuronach obszaru tylnego podwzgórza (Eyigor i wsp., 2001), jednak ich pobudzenie w omawianych doświadczeniach nie powodowało widocznych zmian w rejestrowanym zapisie EEG. Co ciekawe, badania związane z wywoływaniem aktywności oscylacyjnej w wyniku zastosowania stymulacji glutaminianergicznej w formacji hipokampa przyniosły podobne wyniki (Bonansco i wsp., 2002). Podanie roztworu NMDA do odnerwionych preparatów hipokampalnych skutkowało generowaniem rytmicznych oscylacji w paśmie theta, jednak zastosowanie AMPA, podobnie jak w obecnych badaniach prowadzonych na skrawkach PHa, było całkowicie nieskuteczne w generowaniu rytmu (Bonansco i wsp., 2002). Może to wskazywać na bardziej ogólny brak zaangażowania tego typu receptorów glutaminianergicznych w genezę zjawisk oscylacyjnych rejestrowanych w sieciach neuronalnych OUN.

Obecne badania pokazują, iż lokalna aktywność oscylacyjna w paśmie theta o podłożu glutaminianergicznym (niezależnie od tego, czy po aktywacji kainowej, czy NMDA) w PHa ma niewielką amplitudę w porównaniu do amplitudy rytmu theta obserwowanego w HPC, której wartości mogą sięgać kilku tysięcy  $\mu\text{V}$  (Bland, 1986; Kowalczyk i wsp., 2013a). Najprawdopodobniej nie wynika to z odmiennego podłoża neurochemicznego rytmu rejestrowanego w obecnych badaniach, gdyż tylnopodwzgórzowy rytm theta wywołany pobudzeniem cholinergicznym charakteryzował się porównywalnie niskimi parametrami amplitudy oraz mocy dominującego pasma częstotliwości (Kowalczyk i wsp., 2014). Jednym z wyjaśnień może być to, iż obszar tylnego podwzgórza, w przeciwieństwie do formacji hipokampa, nie ma budowy warstwowej. Struktura laminarna, tak jak w przypadku

HPC, gdzie występują warstwy blisko leżących obok siebie neuronów, sprzyja synchronizacji aktywności tych neuronów, a w następstwie, generowaniu wzorców o charakterze oscylacyjnym o stosunkowo wysokiej amplitudzie (O'Keefe, 2007). Kolejnym faktem, który prawdopodobnie przyczynia się do takiego efektu jest to, iż w HPC znajduje się więcej komórek theta-on fazowych, w porównaniu do obszaru tylnego podwzgórza (Bocian i wsp., 2016b). Neurony zaangażowane w generowanie rytmu theta w PHa są rozmieszczone w tej strukturze w sposób znacznie mniej uporządkowany niż ma to miejsce w formacji hipokampa, przez co trudniejsza jest synchronizacja aktywności tych komórek, a jeśli już do niej dochodzi, to rejestrowane sygnały polowe mają mniejszą amplitudę, gdyż w ich powstawanie zaangażowana jest mniejsza liczba neuronów. Zdaniem autorki obydwie interpretacje równoległe mogą wyjaśniać i przyczyniać się do demonstrowanej charakterystyki rytmu w obszarze tylnego podwzgórza.

Warto zauważyć, iż we wcześniejszych badaniach prowadzonych na szczurach swobodnie poruszających się dowiedziono, iż podanie glutaminianu do obszaru tylnego podwzgórza może wpływać zarówno na długość, jak i przebieg czasowy indukowanych napadów padaczkowych (Arzhang i wsp., 2017). Co ciekawe, istnieją badania wskazujące, iż aktywność oscylacyjna w paśmie theta, wywołana pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych, może wpływać hamująco na generowanie aktywności epileptycznej w HPC (Arabadzisz i wsp., 2005; Chauvière i wsp., 2009; Colom i wsp., 2006; Dugladze i wsp., 2007; Shuman i wsp., 2017). Zdolność do generowania rytmu theta w HPC została określona jako jeden z czynników zapobiegających epileptogenezie i ogólnej aktywności napadowej (Nanobashvili i wsp., 2020). W obecnych badaniach wykazano, iż obszar tylnego

podwzgórza, ściśle połączony z formacją hipokampa i wpływający na jej rytmogenezę, jest zdolny do generowania aktywności rytmicznej theta o podłożu glutaminianergicznym. Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej dane, można rozważać prawdopodobne przeciwnapadowe funkcje jąder zlokalizowanych w tylnym podwzgórzu, jednak wymaga to dalszych badań.

## **5.2. Aktywność pojedynczych neuronów PHa związanych z lokalnym, glutaminianergicznym rytmem theta**

Generowanie rytmu theta w strukturach OUN jest nierozzerwalnie związane z obecnością neuronów theta-zależnych (Bland i Colom, 1993). Szczególnie istotną w tym kontekście grupą są neurony theta-on fazowe, charakteryzujące się spontanicznymi wahaniami potencjału błonowego (ang. membrane potential oscillations; MPOs), które wydają się być konieczne do pojawienia się rytmu theta w danej strukturze układu nerwowego. Bland i wsp. postulowali, iż amplituda rytmu theta generowanego lokalnie jest ściśle zależna właśnie od liczby komórek theta-on fazowych generujących wahania potencjału błonowego w danym czasie (Bland i wsp., 2002). Jak dowodzą wcześniejsze badania, neurony theta-zależne zlokalizowane są w strukturach wszystkich pięter wstępującego układu synchronizującego (Bland i wsp., 1999; Colom i wsp., 1988; Dickson i wsp., 1994; Hanada i wsp., 1999; Konopacki i wsp., 2006), włączając w to obszar tylnego podwzgórza (Bland i wsp., 1995; Kirk i wsp., 1996; Kocsis i Vertes, 1997, 1994). Należy pamiętać, iż kluczowym wspólnym elementem wymienionych badań była korelacja wzorców wyładowań tych komórek z rytmem theta rejestrowanym równocześnie w formacji hipokampa. Neurony związane z hipokampalnym rytmem theta, zlokalizowane na niższych piętrach wstępującego układu synchronizującego

mogą pełnić różne funkcje: aktywność komórek theta-on fazowych powiązано z generowaniem rytmu w HPC, aktywność komórek theta-off z przejściem z okresów oscylacji do desynchronizacji, z kolei aktywność komórek bramkujących została powiązана z „włączaniem” i „wyłączaniem” epizodów rytmu theta. Co istotne, w ciągu ostatnich kilku lat doświadczalnie udowodniono, iż obszar tylnego podwzgórza jest nie tylko modulatorem hipokampalnego rytmu theta, ale też niezależnym generatorem lokalnego rytmu w tym paśmie częstotliwości (Bocian i wsp., 2016b; Kowalczyk i wsp., 2014).

Po raz pierwszy badanie aktywności pojedynczych neuronów PHa powiązanych z rytmem theta o podłożu cholinergicznym w obszarze tylnego podwzgórza zostało przeprowadzone na początku XXI w. W badaniach tych wykazano, iż u szczurów anestetyzowanych uretanem, spośród wszystkich neuronów obecnych w PHa, najwięcej było komórek tonicznych theta-on i theta-off. Zarejestrowano też pojedyncze komórki chronometryczne oraz neurony bramkujące (Bocian i wsp., 2016b). W tej samej pracy opisane zostały również dane uzyskane w preparatach PHa *in vitro*. W odnerwionych preparatach tylnego podwzgórza przeważającą grupę aktywowanych cholinergicznie neuronów stanowiły neurony chronometryczne, a drugim najliczniejszym rodzajem były komórki theta-on fazowe (26,5% wszystkich zaobserwowanych komórek). Zarejestrowano też kilka neuronów tonicznych theta-on i theta-off, ale stanowiły one zdecydowanie najmniej powszechną klasę. Warto też dodać, że oprócz neuronów theta-zależnych oraz neuronów chronometrycznych, zarejestrowano też aktywność komórek niezwiązanych z lokalnym rytmem theta w PHa i w badaniach *in vivo* stanowiły one ok. 67%, a w badaniach *in vitro* ok. 35% całej populacji (Bocian i wsp., 2016b).

W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dowiedziono, że rytm theta może być generowany w PHa nie tylko w wyniku aktywacji cholinergiczej, ale również po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych (perfuzja preparatów roztworem KA lub NMDA). W związku z powyższym, powstało pytanie, czy podobnie jak w przypadku tylnopodwzgórzowego rytmu theta o podłożu cholinergicznym, aktywności rytmicznej wywołanej w PHa pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych towarzyszą również wyładowania specyficznej grupy neuronów powiązanych z lokalnym rytmem theta.

Wyniki zaprezentowane w niniejszym opracowaniu pokazują, że główną podgrupą zarejestrowanych komórek są **neurony niezwiązane z lokalnym rytmem theta**. W 95 preparatach perfundowanych roztworem kwasu kainowego zarejestrowano 28 neuronów, w tym 17 neuronów niezależnych od rytmu theta, a w 135 preparatach perfundowanych roztworem NMDA zarejestrowano 36 neuronów, w tym 26 neuronów NR. Neurony niezależne od rytmu theta stanowiły odpowiednio 60% ogólnej liczby w preparatach perfundowanych KA i 72% w preparatach perfundowanych NMDA. Najprawdopodobniej komórki te nie są częścią neuronalnych obwodów PHa zaangażowanych w genezę lokalnego rytmu theta, ale mogą uczestniczyć w innych funkcjach sprawowanych przez obszar tylnego podwzgórza jako element wstępującego układu synchronizującego. Jądra wchodzące w skład obszaru tylnego podwzgórza wysyłają projekcje nie tylko bezpośrednio do HPC, ale też np. do wzgórza, obszaru przyśrodkowej przegrody, czy kory śródwęchowej, czyli do struktur, które jednocześnie unerwiają formację hipokampa (Kocsis i Vertes, 1994; Vertes, 1992; Vertes i wsp., 1995). Zatem

możliwym wytłumaczeniem funkcji, przynajmniej części komórek zaklasyfikowanych w obecnych badaniach jako „niezwiązane z rytmem”, może być przekazywanie impulsacji do ww. struktur i, być może, pośrednie modulowanie hipokampalnego rytmu theta poprzez aktywację wyższych pięter wstępującego układu synchronizującego.

Kolejną liczną grupą komórek zarejestrowanych w obecnych badaniach po aktywacji glutaminianergicznej preparatów PHa były **neurony chronometryczne**. Komórki te charakteryzowały się bardzo regularnym, stałym w czasie wzorcem wyładowań o niezmiennej częstotliwości od 3 do 6 Hz. W doświadczeniach z perfuzją skrawków roztworem kwasu kainowego stanowiły one 28,6%, a w eksperymentach z NMDA 27,8%, co stanowi bardzo zbliżony odsetek. Funkcja tych neuronów nie jest w pełni jasna, jednak na podstawie badań nad rytmogenezą theta w HPC oraz rolą obszaru tylnego podwzgórza w generowaniu hipokampalnego rytmu theta (Bland i Oddie, 1998; Bocian i wsp., 2016b; Caban i wsp., 2018; Kowalczyk i wsp., 2014; Pignatelli i wsp., 2012; Szymańska i Kowalczyk, 2021) można przypuszczać, iż w obrębie jąder obszaru tylnego podwzgórza obecne są dwie podgrupy neuronów, których aktywność powiązana jest z rytmem generowanym lokalnie na różnych piętrach wstępującego układu synchronizującego. Pierwsza pula neuronów obszaru tylnego podwzgórza może być zaangażowana w powstawanie i modulowanie hipokampalnych oscylacji theta, a kolejna populacja komórek może być powiązana z genezą lokalnego rytmu theta. Pierwsza grupa, do której prawdopodobnie należą neurony chronometryczne, jest częścią wstępującego układu synchronizującego aktywność formacji hipokampa i ich potencjalną funkcją może być przekształcanie tonicznej

impulsacji biegnącej z najniższych pięter układu na rytmiczny wzorzec wyładowań sprzyjający rytmogenezie theta w formacji hipokampa (Bocian i wsp., 2016b). W opisanych doświadczeniach rolę tonicznego pobudzenia oddziałującego na odnerwione preparaty PHa pełniła perfuzja skrawków roztworami agonistów receptorów glutaminianergicznych. Tę tezę wydają się popierać wcześniejsze badania nad podobną populacją neuronów obecną w innej strukturze wstępującego systemu synchronizującego – w obszarze przyśrodkowej przegrody (Vinogradova i wsp., 1980). Komórki obecne w MS nazwano jednostkami rozruszniko-podobnymi (ang. pacemaker-like units) i odznaczały się równomiernym, rytmicznym wzorcem wyładowań, podobnym do wzorca aktywności neuronów chronometrycznych. Wszystkie komórki chronometryczne zarejestrowane w badaniach do niniejszej pracy doktorskiej również charakteryzowały się bardzo regularnym wzorcem wyładowań oraz jednoczesnym brakiem korelacji z lokalnym tylnopodwzgórzowym rytmem theta, czy nawet z jego obecnością. To pozwala postawić tezę, że neurony te mogą być powiązane z hipokampalnym rytmem theta, szczególnie, że częstotliwość ich wyładowań pokrywa się z częstotliwością hipokampalnego rytmu theta typu II (Bocian i wsp., 2016b; Kramis i wsp., 1975). Ponadto, w obecnych badaniach po raz pierwszy zarejestrowano aktywność neuronów chronometrycznych w PHa będącą wynikiem pobudzenia receptorów glutaminianergicznych, co może wskazywać na udział tego układu neuroprzebieżnikowego w genezie i modulacji rytmu theta nie tylko na poziomie HPC (Huxter i wsp., 2007), ale również na poziomie tylnego podwzgórza.

Spośród wszystkich 64 neuronów zarejestrowanych w obszarze tylnego podwzgórza, których aktywność wywołana była perfuzją preparatów roztworem



kwasu kainowego, jedynie trzy komórki zaklasyfikowano jako **neurony theta-on**. Wszystkie trzy należały do grupy neuronów fazowych. Co ciekawe, w preparatach PHa perfundowanych roztworem NMDA nie zarejestrowano aktywności żadnego neuronu theta-on. Pełne wyjaśnienie tego faktu jest trudne, ale prawdopodobnie może być to związane z mniejszym zagęszczeniem receptorów NMDA w tylnym podwzgórzu w porównaniu do receptorów KA (Eyigor i wsp., 2001). Ponadto, brak neuronów theta-on może wyjaśniać, dlaczego w obecnych badaniach znacznie trudniej było zarejestrować lokalny rytm theta w tej strukturze po perfuzji skrawków PHa roztworem NMDA.

Podczas doświadczeń prowadzonych do tej pracy nie zarejestrowano również aktywności żadnych neuronów theta-off. Podobnie w żadnej z wcześniejszych analiz aktywności neuronów związanych z rytmem theta prowadzonych w warunkach *in vitro*, niezależnie, czy dotyczyły HPC (Konopacki i wsp., 2006), czy PHa (Bocian i wsp., 2016b; Caban i wsp., 2018), nie zarejestrowano tego typu neuronów. Może to wskazywać na fakt, iż takie komórki znacznie łatwiej jest zaobserwować w nienaruszonym mózgowiu, natomiast ich aktywność jest najprawdopodobniej nieobecna w odnerwionych preparatach mózgowych. Co ciekawe, we wcześniejszych badaniach wykazano, iż w odnerwionych preparatach mózgowych *in vitro* obserwowany jest niższy poziom inhibicji, w porównaniu do badań prowadzonych na modelach doświadczalnych *in vivo*, co wynika ze zmniejszonej liczby aktywnych interneuronów hamujących (Colom i wsp., 1991; Klueva i wsp., 2008; Vutskits i wsp., 2006). Może wyjaśniać to, dlaczego podczas badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy nie zarejestrowano neuronów theta-off, które towarzyszą zdesynchronizowanym epizodom LIA.

Podsumowując, badania przeprowadzone podczas realizacji drugiego celu niniejszej pracy potwierdziły, iż klasyfikacja neuronów zależnych od rytmu theta wprowadzona przez Coloma i Blanda (1987), a potem rozszerzana przez kolejne grupy badawcze (Bland i wsp., 1995; Bocian i wsp., 2016b; Konopacki i wsp., 2006) również ma swoje zastosowanie w przypadku klasyfikowania neuronów obszaru tylnego podwzgórza, wzbudzonych aktywacją receptorów glutaminianergicznych w warunkach pozaustrojowych. W porównaniu do neuronów obserwowanych w formacji hipokampa po aktywacji cholinergicznej w warunkach *in vitro* (Konopacki i wsp., 2006), rozkład neuronów w PHa w obecnych badaniach jest odmienny. W HPC neurony zależne od rytmu theta stanowiły sumarycznie ponad 85% wszystkich zarejestrowanych komórek, z czego neurony theta-on fazowe stanowiły aż 68,2%. Z kolei w doświadczeniach omawianych w niniejszej pracy doktorskiej neurony theta-on fazowe stanowiły jedynie niespełna 11%. Potwierdza to tezę, iż większa liczba i gęstość neuronów theta-on fazowych powiązana jest ze znacznie większym prawdopodobieństwem rejestracji rytmu theta w danej strukturze oraz z wyższymi jego parametrami (Bland i wsp., 2002; Bocian i wsp., 2016b; Kowalczyk i wsp., 2014).

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż analiza aktywności pojedynczych neuronów PHa w powiązaniu z lokalnym rytmem theta była prowadzona we wcześniejszych pracach, jednakże dotyczyły one aktywności oscylacyjnej i neuronalnej wywołanej drażnieniem cholinergicznym (Bocian i wsp., 2016b). W badaniach tych wykazano, iż neurony theta-zależne po perfuzji preparatów PHa roztworem CCH stanowiły 21% wszystkich zarejestrowanych neuronów, w tym neurony theta-on fazowe 17%, co wynosi wciąż sporo więcej niż 11% w przypadku aktywacji receptorów

glutaminianergicznych. Z kolei odnośnie do komórek chronometrycznych, po podaniu karbacholu stanowiły one 43% zarejestrowanych neuronów, a po podaniu agonistów glutaminianergicznych w niniejszych badaniach stanowiły one jedynie 28%. Aktualnie uzyskane wyniki pokazują znacznie mniejsze prawdopodobieństwo zarejestrowania aktywności neuronów PHa powiązanych z rytmem theta lub komórek chronometrycznych aktywowanych pobudzeniem układu glutaminianergicznego. Wskazuje to na większy udział transmisji cholinergiczej (w porównaniu z glutaminianergiczną) w powstawaniu lokalnych oscylacji theta w obwodach neuronalnych jąder tylnego podwzgórza i jądra nadsuteczki.

### **5.3. Modulacja glutaminianergicznego rytmu theta w PHa poprzez pobudzenie receptorów kortykosteroidowych**

Zważywszy na fakt, iż rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza został odkryty niedawno, większość jego potencjalnych funkcji i powiązań fizjologicznych nie została jeszcze zbadana. Kilka lat temu wykazano doświadczalnie, iż pobudzenie receptorów kortykosteroidowych może wpływać na genezę rytmu theta wywołanego aktywacją cholinergiczną w PHa (Bocian i wsp., 2016a). W związku z tym faktem, w ostatnim cyklu badawczym, przeprowadzonym w ramach niniejszego opracowania, badano wpływ aktywacji lokalnych receptorów kortykosteroidowych na indukowany glutaminianergicznie rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza w warunkach pozaustrojowych.

Kortykosteroidy są istotną grupą hormonów steroidowych, a ich synteza u ssaków ma miejsce w korze nadnerczy. Kontrolują one metabolizm substratów

energetycznych organizmu – białek, węglowodanów, tłuszczów i można je podzielić na dwie klasy: mineralokortykosteroidy i glukokortykosteroidy (Eberwine, 1999; Oakley i Cidlowski, 2013). Mineralokortykosteroidem występującym fizjologicznie jest aldosteron, który odpowiada głównie za równowagę wodno-elektrolitową poprzez kontrolę komórkowego transportu jonowego w nerkach. Z kolei głównym przedstawicielem fizjologicznym glukokortykosteroidów u ssaków jest kortyzol, lecz w przypadku gryzoni jest to kortykosteron. Wśród receptorów kortykosteroidowych wyróżnia się dwa podstawowe typy – receptory glukokortykosteroidowe (GR) oraz mineralokortykosteroidowe (MR). Receptory glukokortykosteroidowe obecne są w większości obszarów OUN (w szczególności w jądrze przykomorowym; ang. paraventricular nucleus; PVN), podczas gdy receptory mineralokortykosteroidowe zlokalizowane są głównie w korze przedczołowej, formacji hipokampa i ciałach migdałowatych (Koning i wsp., 2019). Warto zwrócić uwagę na to, że struktury te zaangażowane są w mechanizmy zarządzające procesami pamięciowymi, emocjonalnymi i uczenia się (Eckersdorf i wsp., 1996; Hasselmo i wsp., 2002; Nishida i wsp., 2009; Winson, 1978).

Receptory błonowe GR i MR zaangażowane są w wiele funkcji dotyczących odpowiedzi stresowej przy aktywacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA; Koning i wsp., 2019; Prager i wsp., 2010). Przykładami takich czynności są: kontrola nastroju, lęku i reaktywności behawioralno-poznawczej, które pełnią kluczową rolę w adaptacji do nagłego bądź chronicznego stresu. Warto wspomnieć, iż obie klasy receptorów kortykosteroidowych mogą czasem pełnić przeciwstawne role, jak przykładowo w polu CA1 formacji hipokampa, w którym aktywacja MR prowadzi do pobudzenia

neuronów piramidowych, a aktywacja GR wywołuje ich hamowanie (Joëls, 2006). Jednakże zazwyczaj receptory te oddziałują komplementarnie: MR aktywowane są podczas pierwszych faz ostrego stresu, biorąc udział w szacowaniu zagrożenia i odzyskiwaniu pamięci, z kolei GR, aktywowane później, wspierają funkcje adaptacyjne, regeneracyjne oraz konsolidację pamięci (de Kloet, 1995; de Kloet i wsp., 2005; Koning i wsp., 2019). Współdziałając, są silnie zaangażowane w kaskadę zmian na tle metabolicznym, immunologicznym i emocjonalnym, powiązanych z odpowiedzią stresową (Murphy i wsp., 1998), a zakres czasowy takiej odpowiedzi waha się między godzinami a tygodniami, czy nawet latami (Meijer i wsp., 2019). Gdy doświadczamy bodźców stresowych, komórki PVN w podwzgórzu wydzielają hormon uwalniający hormon kortykotropowy (ang. corticotropin-releasing hormone; CRH), CRH z kolei oddziałuje na przedni płat przysadki, dzięki czemu uwalniana jest tam do krwiobiegu adrenokortykotropina (ang. adrenocorticotrophic hormone; ACTH). Następnie ACTH transportowana jest do kory nadnerczy, gdzie przyczynia się do uwalniania kortykosteronu (u gryzoni) lub kortyzolu (u ludzi). Kortyzol (lub kortykosteron) wywołuje w organizmie szereg zmian ułatwiających organizmowi adaptację do stresu lub walkę z nim. Gdy poziom kortyzolu we krwi jest odpowiednio wysoki, aktywacja ujemnej pętli zwrotnej, dzięki aktywacji ośrodków w podwzgórzu i HPC, umożliwia wyciszenie odpowiedzi stresowej (de Kloet, 1995; de Kloet i wsp., 2005; Murphy i wsp., 1998; Sapolsky i wsp., 2000). Z kolei zbyt wysoki poziom kortykosteroidów, występujący w przypadku chronicznych zaburzeń działania osi HPA, może prowadzić do powstawania takich procesów chorobowych jak psychoza, depresja czy zaburzenia snu (López i wsp., 1998; Wang i wsp., 2015; Wolkowitz i wsp., 1997). Z powyższego powodu należy zawsze brać pod uwagę potencjalne problemy

neuropsychiatryczne przy planowanej kuracji kortykosteroidami (Wolkowitz i wsp., 1997), która często stosowana jest przy leczeniu chorób zapalnych, autoimmunologicznych czy przy nowotworach hematologicznych (Oakley i Cidlowski, 2013).

Jak wspomniano powyżej, wcześniejsze badania wskazują na możliwość modulowania aktywności oscylacyjnej obecnej w PHa przez aktywację receptorów kortykosteroidowych. Modulacja rytmu theta o podłożu cholinergicznym poprzez aktywację receptorów kortykosteroidowych (Bocian i wsp., 2016a) może wskazywać na potencjalne funkcje tego wzorca EEG generowanego lokalnie w PHa. Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej dane, przeprowadzono badania do ostatniego cyklu doświadczalnego. Celem tego cyklu było określenie wpływu pobudzenia receptorów kortykosteroidowych na lokalny rytm theta wywołany pobudzeniem receptorów glutaminianergicznych w preparatach PHa. Podczas eksperymentów wykonanych do ostatniej części niniejszego opracowania, wykorzystano skrawki obszaru tylnego podwzgórza poddawane perfuzji roztworem kwasu kainowego. KA wybrano, zważywszy na znacznie wyższy (w porównaniu do NMDA) procent prawdopodobieństwa wywołania rytmu w preparatach. Po skutecznym doprowadzeniu do generowania lokalnego rytmu theta, skrawki perfundowano roztworem zawierającym kwas kainowy oraz kortykosteron. Wykazano, iż zarówno amplituda, jak i moc rytmu theta generowanego w PHa, po jednoczesnej aktywacji receptorów glutaminianergicznych i kortykosteroidowych, były istotnie wyższe. Już wcześniejsze badania wskazywały na to, że modulujący wpływ kortykosteroidów na tylnopodwzgórzowy, cholinergiczny rytm theta, może być

związany z aktywacją receptorów mineralokortykosteroidowych (Bocian i wsp., 2016a). W związku z powyższym, w obecnej pracy, po zaobserwowaniu wzmacniającego efektu kortykosteronu na wywołany glutaminianergicznie rytm theta w preparatach PHa zastosowano antagonistę MR – spironolakton. Wykazano, iż zarówno amplituda, jak i moc rytmu obserwowanego po podaniu mieszaniny zawierającej SPL były istotnie niższe niż w przypadku perfuzji preparatów roztworem zawierającym KA i CORT, co więcej, parametry rejestrowanego rytmu theta powracały do poziomów zbliżonych do tych, obserwowanych po zastosowaniu kwasu kainowego. Uzyskane dane wskazują, że rytmiczna aktywność oscylacyjna theta rejestrowana w obszarze tylnego podwzgórza w wyniku pobudzenia glutaminianergicznego może być pozytywnie modulowana po aktywacji receptorów mineralokortykosteroidowych. Co ciekawe, wzmacniający wpływ aktywacji MR na czynność formacji hipokampa, głównej struktury OUN związanej z generowaniem oscylacji theta został wykazany również we wcześniejszych badaniach. Doświadczalnie zaobserwowano znaczny wzrost intensywności hipokampalnego LTP po aktywacji receptorów mineralokortykosteroidowych, z kolei pobudzenie receptorów GR zmniejszało plastyczność w HPC (Pavlides i McEwen, 1999). Wyniki te zostały poparte w badaniach prowadzonych na swobodnie poruszających się myszach ze zinaaktywowanymi receptorami mineralokortykosteroidowymi w przodomózgowie. Zaobserwowano spadek w zdolności do uczenia się oraz obniżoną czynność w zakresie pamięci roboczej (Berger i wsp., 2006).

W świetle wyników badań nad udziałem receptorów mineralokortykosteroidowych w modulacji rytmu theta o podłożu glutaminianergicznym w obszarze tylnego

podwzgorza, istotnym aspektem wartym rozważenia jest potencjalne znaczenie fizjologiczne i funkcjonalne zaobserwowanego zjawiska. Wiele badań wykazało silne powiązanie między aktywacją receptorów kortykosteroidowych a licznymi czynnościami ośrodkowego układu nerwowego (Berger i wsp., 2006; de Kloet i wsp., 2005; Pavlides i McEwen, 1999; Zhou i wsp., 2010). Receptory MR i GR są również zaangażowane w procesy zapamiętywania na tle emocjonalnym, co zostało przedstawione w doświadczeniach z warunkowaniem strachu (Zhou i wsp., 2010). W eksperymentach na szczurach po zabiegu usunięcia nadnerczy, a w konsekwencji, przy znacznie obniżonej obecności kortykosteronu w osoczu krwi, komórki ziarniste w zakręcie zębatym formacji hipokampa niemal całkowicie zanikały już kilka miesięcy po operacji. Podawanie kortykosteronu w małym stężeniu przeciwdziało tej atrofii właśnie poprzez aktywację MR, a, w kontraście, jego wyższe dawki (aktywujące GR) wpływały na ten obszar destrukcyjnie (Sloviter i wsp., 1989). Doświadczalnie wykazano kluczowy efekt, jaki kortyzol u ludzi (czy kortykosteron u gryzoni) wywiera na zarówno metaboliczną, jak i czynnościową adaptację do sytuacji stresogennych (de Kloet, 1995). Co więcej, choć najistotniejszą rolą kortykosteroidów w organizmie jest uczestnictwo w odpowiedzi stresowej (de Kloet, 1995; de Kloet i wsp., 2005; Ferguson i Sapolsky, 2007; Murphy i wsp., 1998; Sapolsky i wsp., 2000), badania wykazały również, że receptory kortykosteroidowe MR i GR mogą być zaangażowane w podłoże takich chorób jak zaburzenia afektywne i schizofrenia (Cherian i wsp., 2019; Streit i wsp., 2016), PTSD (Zaba i wsp., 2015), choroba Alzheimera (Brureau i wsp., 2013), czy zaburzenia snu (Wang i wsp., 2015). Mimo iż badania prowadzone w ramach niniejszej pracy nie mają bezpośredniego przełożenia na funkcje kognitywne czy etiologię zaburzeń OUN, to zaobserwowany modulujący wpływ pobudzenia



receptorów mineralokortykosteroidowych na lokalny rytm theta obserwowany w PHa może wskazywać na potencjalne zaangażowanie tego wzorca aktywności EEG generowanego w jadrach tylnego podwzgórza w opisywanych zjawiskach. Uzyskane wyniki mogą stanowić zatem początek kolejnych badań nad fizjologicznym znaczeniem rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. Zważywszy na fakt, iż powstawanie zaburzeń psychiatrycznych i depresyjnych zostało doświadczalnie powiązane ze wzmożonym stresem i towarzyszącą mu nadmierną aktywacją osi HPA (Cherian i wsp., 2019) oraz na to, że niniejsze doświadczenia wykazały udział receptorów mineralokortykosteroidowych w modulacji glutaminianergicznego rytmu theta w PHa, można wysunąć tezę, iż powyżej opisana modulacja może być zaangażowana w mechanizm powstawania stresu lub chroniczną odpowiedź stresową oraz potencjalnie w mechanizm powstawania takich patofizjologii jak depresja czy zaburzenia psychiatryczne.

## **6. WNIOSKI**

1. Preparaty *in vitro* obszaru tylnego podwzgórza są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych typu KA oraz NMDA.
2. Preparaty *in vitro* obszaru tylnego podwzgórza nie są zdolne do generowania lokalnego rytmu theta po pobudzeniu receptorów glutaminianergicznych AMPA.
3. Większość neuronów wzbudzonych w PHa w wyniku aktywacji glutaminianergicznej wykazuje wzorzec aktywności niezwiązany z lokalnym rytmem theta.
4. Liczna grupa neuronów rejestrowanych w obszarze tylnego podwzgórza po pobudzeniu glutaminianergicznym zaklasyfikowana została jako neurony chronometryczne – zaangażowane prawdopodobnie w generowanie aktywności rytmicznej theta w formacji hipokampa.
5. Pobudzenie receptorów mineralokortykosteroidowych w preparatach PHa powoduje wzmocnienie podstawowych parametrów (amplituda, moc dominującego pasma częstotliwości) lokalnego rytmu theta o podłożu glutaminianergicznym.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Anderson, K.L., Rajagovindan, R., Ghacibeh, G.A., Meador, K.J., Ding, M., 2010. Theta Oscillations Mediate Interaction between Prefrontal Cortex and Medial Temporal Lobe in Human Memory. *Cereb. Cortex* 20, 1604–1612. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp223>
- Arabadzisz, D., Antal, K., Parpan, F., Emri, Z., Fritschy, J.-M., 2005. Epileptogenesis and chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy are associated with distinct EEG patterns and selective neurochemical alterations in the contralateral hippocampus. *Exp. Neurol.* 194, 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.01.029>
- Arzhang, A., Elahdadi Salmani, M., Lashkarbolouki, T., Goudarzi, I., 2017. Posterior hypothalamus glutamate infusion decreases pentylenetetrazol-induced seizures of male rats through hippocampal histamine increase. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 158, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.05.004>
- Bartanusz, V., Aubry, J.M., Pagliusi, S., Jezova, D., Baffi, J., Kiss, J.Z., 1995. Stress-induced changes in messenger RNA levels of N-methyl-D-aspartate and AMPA receptor subunits in selected regions of the rat hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience* 66, 247–252. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00084-v](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00084-v)
- Bastiaansen, M., Hagoort, P., 2006. Oscillatory neuronal dynamics during language comprehension, in: Neuper, C., Klimesch, W. (Eds.), *Progress in Brain Research, Event-Related Dynamics of Brain Oscillations*. Elsevier, pp. 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)59012-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)59012-0)
- Berger, S., Wolfer, D.P., Selbach, O., Alter, H., Erdmann, G., Reichardt, H.M., Chepkova, A.N., Welzl, H., Haas, H.L., Lipp, H.-P., Schütz, G., 2006. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 195–200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503878102>
- Bland, B.H., 1986. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26, 1–54. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(86\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0301-0082(86)90019-5)
- Bland, B.H., Colom, L.V., 1993. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.* 41, 157–208. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90007-f](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90007-f)
- Bland, B.H., Colom, L.V., Ford, R.D., 1990. Responses of septal theta-on and theta-off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region. *Brain Res. Bull.* 24, 71–79. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90289-c](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90289-c)
- Bland, B.H., Declerck, S., Jackson, J., Glasgow, S., Oddie, S., 2007. Septohippocampal properties of N-methyl-D-aspartate-induced theta-band oscillation and synchrony. *Synap. N. Y.* N 61, 185–197. <https://doi.org/10.1002/syn.20357>
- Bland, B.H., Jackson, J., Derrie-Gillespie, D., Azad, T., Rickhi, A., Abriam, J., 2006. Amplitude, frequency, and phase analysis of hippocampal theta during

- sensorimotor processing in a jump avoidance task. *Hippocampus* 16, 673–681. <https://doi.org/10.1002/hipo.20210>
- Bland, B.H., Konopacki, J., Dyck, R.H., 2002. Relationship Between Membrane Potential Oscillations and Rhythmic Discharges in Identified Hippocampal Theta-Related Cells. *J. Neurophysiol.* 88, 3046–3066. <https://doi.org/10.1152/jn.00315.2002>
- Bland, B.H., Konopacki, J., Kirk, I.J., Oddie, S.D., Dickson, C.T., 1995. Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethan-anesthetized rat. *J. Neurophysiol.* 74, 322–333. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.1.322>
- Bland, B.H., Oddie, S.D., 2001. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav. Brain Res.* 127, 119–136. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00358-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00358-8)
- Bland, B.H., Oddie, S.D., 1998. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 259–273. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00013-4)
- Bland, B.H., Oddie, S.D., Colom, L.V., 1999. Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 3223–3237. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-08-03223.1999>
- Bland, B.H., Trepel, C., Oddie, S.D., Kirk, I.J., 1996. Intraseptal microinfusion of muscimol: effects on hippocampal formation theta field activity and phasic theta-ON cell discharges. *Exp. Neurol.* 138, 286–297. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0067>
- Bland, B.H., Vanderwolf, C.H., 1972. Diencephalic and hippocampal mechanisms of motor activity in the rat: effects of posterior hypothalamic stimulation on behavior and hippocampal slow wave activity. *Brain Res.* 43, 67–88. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90275-2)
- Bocian, R., Caban, B., Kłos-Wojtczak, P., Konopacki, J., Kowalczyk, T., 2016a. Is electrical coupling involved in the generation of posterior hypothalamic theta rhythm? *Eur. J. Neurosci.* 44, 2324–2333. <https://doi.org/10.1111/ejn.13338>
- Bocian, R., Kłos-Wojtczak, P., Caban, B., Kowalczyk, T., Kaźmierska, P., Konopacki, J., 2016b. Cell discharge correlates of posterior hypothalamic theta rhythm recorded in anesthetized rats and brain slices. *Hippocampus* 26, 1354–1369. <https://doi.org/10.1002/hipo.22612>
- Bocian, R., Kowalczyk, T., 2012. Gap junction involvement in hippocampal theta rhythm generation. *Postępy Hig. Med. Dośw. Adv. Hyg. Exp. Med.* 66, 702–13. <https://doi.org/10.5604/17322693.1014656>

- Bocian, R., Posluszny, A., Kowalczyk, T., Kazmierska, P., Konopacki, J., 2011. Gap junction modulation of hippocampal formation theta and local cell discharges in anesthetized rats. *Eur. J. Neurosci.* 33, 471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07545.x>
- Bódizs, R., Kántor, S., Szabó, G., Szûcs, A., Eröss, L., Halász, P., 2001. Rhythmic hippocampal slow oscillation characterizes REM sleep in humans. *Hippocampus* 11, 747–753. <https://doi.org/10.1002/hipo.1090>
- Bonansco, C., Buño, W., 2003. Cellular mechanisms underlying the rhythmic bursts induced by NMDA microiontophoresis at the apical dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 13, 150–163. <https://doi.org/10.1002/hipo.10067>
- Bonansco, C., González de la Vega, A., González Alegre, P., Borde, M., García-Segura, L.M., Buño, W., 2002. Tetanic stimulation of Schaffer collaterals induces rhythmic bursts via NMDA receptor activation in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 12, 434–446. <https://doi.org/10.1002/hipo.10023>
- Borhegyi, Z., Freund, T.F., 1998. Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain Res. Bull.* 46, 453–459. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(98\)00038-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(98)00038-0)
- Borhegyi, Z., Maglóczky, Z., Acsády, L., Freund, T.F., 1998. The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *Neuroscience* 82, 1053–1065. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00301-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00301-1)
- Brureau, A., Zussy, C., Delair, B., Ogier, C., Ixart, G., Maurice, T., Givalois, L., 2013. Deregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions in an Alzheimer's disease rat model. *Neurobiol. Aging* 34, 1426–1439. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.015>
- Burgess, N., O'Keefe, J., 2011. Models of place and grid cell firing and theta rhythmicity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 734–744. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.07.002>
- Busnardo, C., Crestani, C.C., Resstel, L.B.M., Tavares, R.F., Antunes-Rodrigues, J., Corrêa, F.M.A., 2012. Ionotropic Glutamate Receptors in Hypothalamic Paraventricular and Supraoptic Nuclei Mediate Vasopressin and Oxytocin Release in Unanesthetized Rats. *Endocrinology* 153, 2323–2331. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2079>
- Buzsáki, G., 2006. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195301069.001.0001>
- Buzsáki, G., 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, 325–340. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00586-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00586-x)

- Buzsáki, G., Moser, E.I., 2013. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci.* 16, 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Caban, B., 2017. Rytm theta w obszarze tylnego podwzgórza u szczura: Badania in vitro. Rozprawa doktorska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.
- Caban, B., Staszelis, A., Kazmierska, P., Kowalczyk, T., Konopacki, J., 2018. Postnatal development of the posterior hypothalamic theta rhythm and local cell discharges in rat brain slices. *Dev. Neurobiol.* 78, 1049–1063. <https://doi.org/10.1002/dneu.22628>
- Chauvière, L., Raftafi, N., Thinus-Blanc, C., Bartolomei, F., Esclapez, M., Bernard, C., 2009. Early Deficits in Spatial Memory and Theta Rhythm in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 29, 5402–5410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4699-08.2009>
- Cherian, K., Schatzberg, A.F., Keller, J., 2019. HPA axis in psychotic major depression and schizophrenia spectrum disorders: Cortisol, clinical symptomatology, and cognition. *Schizophr. Res.* 213, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.07.003>
- Coleman, J.R., Lindsley, D.B., 1977. Behavioral and hippocampal electrical changes during operant learning in cats and effects of stimulating two hypothalamic-hippocampal systems. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 42, 309–331. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(77\)90168-7](https://doi.org/10.1016/0013-4694(77)90168-7)
- Colgin, L.L., 2016. Rhythms of the hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 239–249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.21>
- Colom, L.V., 2006. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 96, 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03630.x>
- Colom, L.V., Bland, B.H., 1987. State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.* 422, 277–286. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90934-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90934-6)
- Colom, L.V., Christie, B.R., Bland, B.H., 1988. Cingulate cell discharge patterns related to hippocampal EEG and their modulation by muscarinic and nicotinic agents. *Brain Res.* 460, 329–338. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90377-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90377-0)
- Colom, L.V., García-Hernández, A., Castañeda, M.T., Perez-Cordova, M.G., Garrido-Sanabria, E.R., 2006. Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: potential antiepileptic effects of theta rhythm generation. *J. Neurophysiol.* 95, 3645–3653. <https://doi.org/10.1152/jn.00040.2006>
- Colom, L.V., Nassif-Caudarella, S., Dickson, C.T., Smythe, J.W., Bland, B.H., 1991. In vivo intrahippocampal microinfusion of carbachol and bicuculline induces



- theta-like oscillations in the septally deafferented hippocampus. *Hippocampus* 1, 381–390. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010406>
- Datta, S., Siwek, D.F., 1997. Excitation of the brain stem pedunculo-pontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *J. Neurophysiol.* 77, 2975–2988. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.6.2975>
- de Kloet, E.R., 1995. Steroids, stability and stress. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 416–425. <https://doi.org/10.1006/frne.1995.1015>
- de Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Dickson, C.T., Kirk, I.J., Oddie, S.D., Bland, B.H., 1995. 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* 5, 306–319. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050404>
- Dickson, C.T., Trepel, C., Bland, B.H., 1994. Extrinsic modulation of theta field activity in the entorhinal cortex of the anesthetized rat. *Hippocampus* 4, 37–51. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040106>
- Dugladze, T., Vida, I., Tort, A.B., Gross, A., Otahal, J., Heinemann, U., Kopell, N.J., Gloveli, T., 2007. Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17530–17535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708301104>
- Dunkley, B.T., Sedge, P.A., Doesburg, S.M., Grodecki, R.J., Jetly, R., Shek, P.N., Taylor, M.J., Pang, E.W., 2015. Theta, Mental Flexibility, and Post-Traumatic Stress Disorder: Connecting in the Parietal Cortex. *PLOS ONE* 10, e0123541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123541>
- Eberwine, J., 1999. Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors as Transcription Factors, in: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th Edition. Lippincott-Raven.
- Eckersdorf, B., Golebiewski, H., Konopacki, J., 1996. Kainic acid versus carbachol induced emotional-defensive response in the cat. *Behav. Brain Res.* 77, 201–210. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00223-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00223-5)
- Ekstrom, A.D., Caplan, J.B., Ho, E., Shattuck, K., Fried, I., Kahana, M.J., 2005. Human hippocampal theta activity during virtual navigation. *Hippocampus* 15, 881–889. <https://doi.org/10.1002/hipo.20109>
- Elazar, Z., Adey, W.R., 1967. Electroencephalographic correlates of learning in subcortical and cortical structures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 23, 306–319. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(67\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0013-4694(67)90044-2)

- Eyigor, O., Centers, A., Jennes, L., 2001. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 434, 101–124. <https://doi.org/10.1002/cne.1167>
- Ferguson, D., Sapolsky, R., 2007. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 8046–8052. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1187-07.2007>
- Frerking, M., Ohliger-Frerking, P., 2002. AMPA Receptors and Kainate Receptors Encode Different Features of Afferent Activity. *J. Neurosci.* 22, 7434–7443. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-17-07434.2002>
- Gallego-Jutglà, E., Elgendi, M., Vialatte, F., Solé-Casals, J., Cichocki, A., Latchoumane, C., Jeong, J., Dauwels, J., 2012. Diagnosis of Alzheimer's disease from EEG by means of synchrony measures in optimized frequency bands. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Int. Conf.* 2012, 4266–4270. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2012.6346909>
- Gallego-Jutglà, E., Solé-Casals, J., Vialatte, F.-B., Dauwels, J., Cichocki, A., 2015. A theta-band EEG based index for early diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 43, 1175–1184. <https://doi.org/10.3233/JAD-140468>
- Gärtner, M., Rohde-Liebenau, L., Grimm, S., Bajbouj, M., 2014. Working memory-related frontal theta activity is decreased under acute stress. *Psychoneuroendocrinology* 43, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.02.009>
- Glin, L., Zernicki, B., Gottesmann, C., 1991. Hippocampal and cortical EEG activity in rats with transected hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 27, 637–640. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90039-m](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90039-m)
- Gołebiewski, H., Eckersdorf, B., Konopacki, J., 1996. Cholinergic/GABAergic interaction in the production of EEG theta oscillations in rat hippocampal formation in vitro. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 56, 147–153. <https://doi.org/10.55782/ane-1996-1114>
- Gray, J.A., McNaughton, N., 2003. *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system.* Oxford University Press.
- Green, J.D., Arduini, A.A., 1954. Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.* 17, 533–557. <https://doi.org/10.1152/jn.1954.17.6.533>
- Green, J.D., Maxwell, D.S., Schindler, W.J., Stumpf, C., 1960. Rabbit eeg "theta" rhythm: its anatomical source and relation to activity in single neurons. *J. Neurophysiol.* 23, 403–420. <https://doi.org/10.1152/jn.1960.23.4.403>
- Gutiérrez-Guzmán, B.E., Hernández-Pérez, J.J., Olvera-Cortés, M.E., 2017. Serotonergic modulation of septo-hippocampal and septo-mammillary theta activity during spatial learning, in the rat. *Behav. Brain Res.* 319, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.017>

- Hanada, Y., Hallworth, N.E., Szgatti, T.L., Scarlett, D., Bland, B.H., 1999. Distribution and analysis of hippocampal theta-related cells in the pontine region of the urethane-anesthetized rat. *Hippocampus* 9, 288–302. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:3<288::AID-HIPO8>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:3<288::AID-HIPO8>3.0.CO;2-A)
- Hasselmo, M.E., Bodelón, C., Wyble, B.P., 2002. A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput.* 14, 793–817. <https://doi.org/10.1162/089976602317318965>
- Huerta, P.T., Lisman, J.E., 1996. Synaptic plasticity during the cholinergic theta-frequency oscillation in vitro. *Hippocampus* 6, 58–61. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:1<58::AID-HIPO10>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:1<58::AID-HIPO10>3.0.CO;2-J)
- Huerta, P.T., Lisman, J.E., 1995. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 15, 1053–1063. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90094-2)
- Huxter, J.R., Zinyuk, L.E., Roloff, E. v L., Clarke, V.R.J., Dolman, N.P., More, J.C.A., Jane, D.E., Collingridge, G.L., Muller, R.U., 2007. Inhibition of kainate receptors reduces the frequency of hippocampal theta oscillations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2212–2223. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3954-06.2007>
- Jellinck, P.H., Monder, C., McEwen, B.S., Sakai, R.R., 1993. Differential inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by carbenoxolone in rat brain regions and peripheral tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 209–213. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(93\)90296-9](https://doi.org/10.1016/0960-0760(93)90296-9)
- Joëls, M., 2006. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.03.007>
- Kawamura, H., Domino, E.F., 1968. Hippocampal slow (“arousal”) wave activation in the rostral midbrain transected cat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 25, 471–480. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(68\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(68)90157-0)
- Kawamura, H., Nakamura, Y., Tokizane, T., 1961. Effect of acute brain stem lesions on the electrical activities of the limbic system and neocortex. *Jpn. J. Physiol.* 11, 564–575. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.11.564>
- Kazmierska, P., Konopacki, J., 2013. Development of NMDA-induced theta rhythm in hippocampal formation slices. *Brain Res. Bull.* 98, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.07.010>
- Kirk, I.J., 1998. Frequency Modulation of Hippocampal Theta by the Supramammillary Nucleus, and Other Hypothalamo–Hippocampal Interactions: Mechanisms and Functional Implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 291–302. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00015-8)

- Kirk, I.J., 1997. Supramammillary neural discharge patterns and hippocampal EEG. *Brain Res. Bull.* 42, 23–26. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(96\)00094-9](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(96)00094-9)
- Kirk, I.J., McNaughton, N., 1993. Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. *Hippocampus* 3, 517–525. <https://doi.org/10.1002/hipo.450030411>
- Kirk, I.J., McNaughton, N., 1991. Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport* 2, 723–725. <https://doi.org/10.1097/00001756-199111000-00023>
- Kirk, I.J., Oddie, S.D., Konopacki, J., Bland, B.H., 1996. Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 5547–5554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-17-05547.1996>
- Kiss, J., Csáki, A., Bokor, H., Kocsis, K., Kocsis, B., 2002. Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [(3)H]D-aspartate labelling and immunocytochemistry. *Neuroscience* 111, 671–691. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00037-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00037-4)
- Kiss, J., Csáki, A., Bokor, H., Shanabrough, M., Leranth, C., 2000. The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [3H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* 97, 657–669. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00127-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00127-5)
- Klueva, J., Meis, S., de Lima, A.D., Voigt, T., Munsch, T., 2008. Developmental downregulation of GABAergic drive parallels formation of functional synapses in cultured mouse neocortical networks. *Dev. Neurobiol.* 68, 934–949. <https://doi.org/10.1002/dneu.20632>
- Kocsis, B., 2006. The effect of descending theta rhythmic input from the septohippocampal system on firing in the supramammillary nucleus. *Brain Res.* 1086, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.117>
- Kocsis, B., Kaminski, M., 2006. Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus* 16, 531–540. <https://doi.org/10.1002/hipo.20180>
- Kocsis, B., Vertes, R.P., 1997. Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus* 7, 204–214. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M)

- Kocsis, B., Vertes, R.P., 1994. Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 7040–7052. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-11-07040.1994>
- Kocsis, B., Vertes, R.P., 1992. Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *J. Neurophysiol.* 68, 1463–1467. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.4.1463>
- Komisaruk, B.R., 1970. Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 70, 482–492. <https://doi.org/10.1037/h0028709>
- Koning, A.-S.C.A.M., Buurstede, J.C., van Weert, L.T.C.M., Meijer, O.C., 2019. Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in the Brain: A Transcriptional Perspective. *J. Endocr. Soc.* 3, 1917–1930. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00158>
- Konopacki, J., Bland, B.H., MacIver, M.B., Roth, S.H., 1987a. Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators. *Brain Res.* 436, 217–222. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91664-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91664-7)
- Konopacki, J., Eckersdorf, B., Kowalczyk, T., Gołebiewski, H., 2006. Firing cell repertoire during carbachol-induced theta rhythm in rat hippocampal formation slices. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1811–1818. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04679.x>
- Konopacki, J., Gołebiewski, H., 1993. Theta-like activity in hippocampal formation slices: cholinergic-GABAergic interaction. *Neuroreport* 4, 963–966. <https://doi.org/10.1097/00001756-199307000-00032>
- Konopacki, J., Gołebiewski, H., Eckersdorf, B., 1992. Carbachol-induced rhythmic slow activity (theta) in cat hippocampal formation slices. *Brain Res.* 578, 13–16. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90223-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90223-v)
- Konopacki, J., MacIver, M.B., Bland, B.H., Roth, S.H., 1987b. Carbachol-induced EEG “theta” activity in hippocampal brain slices. *Brain Res.* 405, 196–198. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91009-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91009-2)
- Konopacki, Jan, Maciver, M.B., Bland, B.H., Roth, S.H., 1987. Theta in hippocampal slices: Relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res. Bull.* 18, 25–27. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90029-3)
- Kowalczyk, T., Bocian, R., Caban, B., Konopacki, J., 2014. Atropine-sensitive theta rhythm in the posterior hypothalamic area: in vivo and in vitro studies. *Hippocampus* 24, 7–20. <https://doi.org/10.1002/hipo.22167>
- Kowalczyk, T., Bocian, R., Konopacki, J., 2013a. The generation of theta rhythm in hippocampal formation maintained in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 37, 679–699. <https://doi.org/10.1111/ejn.12091>

- Kowalczyk, T., Gołebiewski, H., Konopacki, J., 2009. Is the dentate gyrus an independent generator of in vitro recorded theta rhythm? *Brain Res. Bull.* 80, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.07.003>
- Kowalczyk, T., Konopacki, J., 2002. Depth amplitude and phase profiles of carbachol-induced theta in hippocampal formation slices. *Brain Res. Bull.* 58, 569–574. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(02\)00827-4](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(02)00827-4)
- Kowalczyk, T., Konopacki, J., Bocian, R., Caban, B., 2013b. Theta-related gating cells in hippocampal formation: in vivo and in vitro study. *Hippocampus* 23, 30–39. <https://doi.org/10.1002/hipo.22050>
- Kramis, R., Vanderwolf, C.H., Bland, B.H., 1975. 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.* 49, 58–85. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(75\)90195-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(75)90195-8)
- Kuzmiski, J.B., Marty, V., Baimoukhametova, D.V., Bains, J.S., 2010. Stress-induced priming of glutamate synapses unmasks associative short-term plasticity. *Nat. Neurosci.* 13, 1257–1264. <https://doi.org/10.1038/nn.2629>
- Lai, M., Horsburgh, K., Bae, S.-E., Carter, R.N., Stenvers, D.J., Fowler, J.H., Yau, J.L., Gomez-Sanchez, C.E., Holmes, M.C., Kenyon, C.J., Seckl, J.R., Macleod, M.R., 2007. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1832–1842. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05427.x>
- Lega, B.C., Jacobs, J., Kahana, M., 2012. Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories. *Hippocampus* 22, 748–761. <https://doi.org/10.1002/hipo.20937>
- Leranth, C., Carpi, D., Buzsaki, G., Kiss, J., 1999. The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience* 88, 701–718. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00245-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00245-0)
- Leung, L.S., 1998. Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 275–290. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00014-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00014-6)
- Leung, L.W., Desborough, K.A., 1988. APV, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks the hippocampal theta rhythm in behaving rats. *Brain Res.* 463, 148–152. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90538-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90538-0)
- López, J.F., Chalmers, D.T., Little, K.Y., Watson, S.J., 1998. Regulation of Serotonin1A, Glucocorticoid, and Mineralocorticoid Receptor in Rat and Human Hippocampus: Implications for the Neurobiology of Depression. *Biol. Psychiatry* 43, 547–573. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(97\)00484-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00484-8)

- Ma, J., Leung, L.S., 2007. The supramammillo-septal-hippocampal pathway mediates sensorimotor gating impairment and hyperlocomotion induced by MK-801 and ketamine in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 961–974. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0667-x>
- Maglóczy, Z., Acsády, L., Freund, T.F., 1994. Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 4, 322–334. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040316>
- McNaughton, N., Logan, B., Panickar, K.S., Kirk, I.J., Pan, W.X., Brown, N.T., Heenan, A., 1995. Contribution of synapses in the medial supramammillary nucleus to the frequency of hippocampal theta rhythm in freely moving rats. *Hippocampus* 5, 534–545. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050605>
- Meeker, R.B., Greenwood, R.S., Hayward, J.N., 1994. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 134, 621–629. <https://doi.org/10.1210/endo.134.2.7905409>
- Meijer, J.H., Albus, H., Weidema, F., Ravesloot, J.-H., 1993. The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Res.* 603, 284–288. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91249-R](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91249-R)
- Meijer, O.C., Buurstedde, J.C., Schaaf, M.J.M., 2019. Corticosteroid Receptors in the Brain: Transcriptional Mechanisms for Specificity and Context-Dependent Effects. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 539–549. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0625-2>
- Michel, S., Itri, J., Colwell, C.S., 2002. Excitatory mechanisms in the suprachiasmatic nucleus: the role of AMPA/KA glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* 88, 817–828. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.2.817>
- Mitchell, D.J., McNaughton, N., Flanagan, D., Kirk, I.J., 2008. Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal “theta.” *Prog. Neurobiol.* 86, 156–185. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.005>
- Mizoro, Y., Yamaguchi, Y., Kitazawa, R., Yamada, H., Matsuo, M., Fustin, J.-M., Doi, M., Okamura, H., 2010. Activation of AMPA receptors in the suprachiasmatic nucleus phase-shifts the mouse circadian clock in vivo and in vitro. *PloS One* 5, e10951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010951>
- Murphy, D., Costall, B., Smythe, J.W., 1998. Regulation of hippocampal theta activity by corticosterone: opposing functions of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Brain Res. Bull.* 45, 631–635. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00462-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00462-0)
- Nanobashvili, Z.I., Bilanishvili, I.G., Barbakadze, M.D., Gaixarashvili, T.Z., Dolidze, S.A., Khujadze, K.E., Nachkebia, L.X., Khizanishvili, N.A., 2020. Interaction between Seizure and Theta Rhythm. *J. Behav. Brain Sci.* 10, 18–28. <https://doi.org/10.4236/jbbs.2020.101002>

- Niedermeyer, E., 1997. Alpha rhythms as physiological and abnormal phenomena. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* 26, 31–49. [https://doi.org/10.1016/s0167-8760\(97\)00754-x](https://doi.org/10.1016/s0167-8760(97)00754-x)
- Nishida, M., Pearsall, J., Buckner, R.L., Walker, M.P., 2009. REM Sleep, Prefrontal Theta, and the Consolidation of Human Emotional Memory. *Cereb. Cortex* 19, 1158–1166. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn155>
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2013. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Oddie, S.D., Bland, B.H., Colom, L.V., Vertes, R.P., 1994. The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus* 4, 454–473. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040408>
- O'Keefe, J., 2007. Hippocampal neurophysiology in the behaving animal, in: *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, New York, NY, US, pp. 475–548.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Clarendon Press.
- Pan, W.-X., McNaughton, N., 2004. The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 74, 127–166. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.003>
- Pan, W.-X., Mcnaughton, N., 2002. The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1797–809. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02267.x>
- Pan, W.X., McNaughton, N., 1997. The medial supramammillary nucleus, spatial learning and the frequency of hippocampal theta activity. *Brain Res.* 764, 101–108. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00431-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00431-9)
- Parker, S.M., Sinnamon, H.M., 1983. Forward locomotion elicited by electrical stimulation in the diencephalon and mesencephalon of the awake rat. *Physiol. Behav.* 31, 581–587.
- Pavlidis, C., McEwen, B.S., 1999. Effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors on long-term potentiation in the CA3 hippocampal field. *Brain Res.* 851, 204–214. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02188-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02188-5)
- Pignatelli, M., Beyeler, A., Leinekugel, X., 2012. Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *J. Physiol. Paris* 106, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.09.007>



- Pitkänen, M., Sirviö, J., Ylinen, A., Koivisto, E., Riekkinen, P., 1995. Effects of NMDA receptor modulation on hippocampal type 2 theta activity in rats. *Gen. Pharmacol.* 26, 1065–1070. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00268-r](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00268-r)
- Prager, E.M., Brielmaier, J., Bergstrom, H.C., McGuire, J., Johnson, L.R., 2010. Localization of Mineralocorticoid Receptors at Mammalian Synapses. *PLoS ONE* 5, e14344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014344>
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001. *Glutamate Receptors*, in: *Neuroscience*. 2nd Edition. Sinauer Associates.
- Robinson, T.E., Whishaw, I.Q., 1974. Effects of posterior hypothalamic lesions on voluntary behavior and hippocampal electroencephalograms in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 768–786. <https://doi.org/10.1037/h0036397>
- Royo, M., Escolano, B.A., Madrigal, M.P., Jurado, S., 2022. AMPA Receptor Function in Hypothalamic Synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* 14, 833449. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.833449>
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Sergeeva, O.A., Amberger, B.T., Vorobjev, V.S., Eriksson, K.S., Haas, H.L., 2004. AMPA receptor properties and coexpression with sodium–calcium exchangers in rat hypothalamic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 19, 957–965. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03208.x>
- Shahidi, S., Motamedi, F., Naghdi, N., 2004. Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. *Brain Res.* 1026, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.030>
- Shuman, T., Amendolara, B., Golshani, P., 2017. Theta Rhythmopathy as a Cause of Cognitive Disability in TLE. *Epilepsy Curr.* 17, 107–111. <https://doi.org/10.5698/1535-7511.17.2.107>
- Sieb, R.A., 1990. A brain mechanism for attention. *Med. Hypotheses* 33, 145–153. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(90\)90164-a](https://doi.org/10.1016/0306-9877(90)90164-a)
- Sinnamon, H.M., 1990. Locomotor stepping elicited by electrical stimulation of the hypothalamus persists after lesion of descending fibers of passage. *Physiol. Behav.* 48, 261–266. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90310-z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90310-z)
- Skrede, K.Kr., Westgaard, R.H., 1971. The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained in vitro. *Brain Res.* 35, 589–593. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90508-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90508-7)

- Sławińska, U., Kasicki, S., 1995. Theta-like rhythm in depth EEG activity of hypothalamic areas during spontaneous or electrically induced locomotion in the rat. *Brain Res.* 678, 117–126. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00174-o](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00174-o)
- Sloviter, R.S., Valiquette, G., Abrams, G.M., Ronk, E.C., Sollas, A.L., Paul, L.A., Neubort, S., 1989. Selective Loss of Hippocampal Granule Cells in the Mature Rat Brain After Adrenalectomy. *Science* 243, 535–538. <https://doi.org/10.1126/science.2911756>
- Smythe, J.W., Colom, L.V., Bland, B.H., 1992. The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 289–308. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80203-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80203-9)
- Streit, F., Memic, A., Hasandedić, L., Rietschel, L., Frank, J., Lang, M., Witt, S.H., Forstner, A.J., Degenhardt, F., Wüst, S., Nöthen, M.M., Kirschbaum, C., Strohmaier, J., Oruc, L., Rietschel, M., 2016. Perceived stress and hair cortisol: Differences in bipolar disorder and schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 69, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.03.010>
- Szymańska, A., Kowalczyk, T., 2021. The role of the posterior hypothalamic area in the generation of theta rhythm. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 75, 406–416. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.9333>
- Thinschmidt, J.S., Kinney, G.G., Kocsis, B., 1995. The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience* 67, 301–312. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00045-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00045-k)
- Trojnar, W., Jurkowlaniec, E., Orzeł-Gryglewska, J., Tokarski, J., 1987. The effect of lateral hypothalamic lesions on spontaneous EEG pattern in rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 47, 27–43.
- van den Pol, A.N., Hermans-Borgmeyer, I., Hofer, M., Ghosh, P., Heinemann, S., 1994. Ionotropic glutamate-receptor gene expression in hypothalamus: localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor RNA with in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* 343, 428–444. <https://doi.org/10.1002/cne.903430307>
- Vanderwolf, C.H., 2003. *An Odyssey Through the Brain, Behavior and the Mind.* Springer US.
- Vanderwolf, C.H., 1969. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 26, 407–418. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(69\)90092-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(69)90092-3)
- Vanderwolf, C.H., Baker, G.B., 1986. Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, non-cholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent

- behavior. *Brain Res.* 374, 342–356. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90428-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90428-2)
- Vertes, R.P., 1992. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 326, 595–622. <https://doi.org/10.1002/cne.903260408>
- Vertes, R.P., Crane, A.M., Colom, L.V., Bland, B.H., 1995. Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.* 359, 90–116. <https://doi.org/10.1002/cne.903590107>
- Vertes, R.P., Kocsis, B., 1997. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81, 893–926. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00239-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00239-x)
- Vertes, R.P., Martin, G.F., 1988. Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 275, 511–541. <https://doi.org/10.1002/cne.902750404>
- Vertes, R.P., McKenna, J.T., 2000. Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. *Synap. N. Y. N* 38, 281–293. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20001201\)38:3<281::AID-SYN7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20001201)38:3<281::AID-SYN7>3.0.CO;2-6)
- Vinogradova, O.S., Brazhnik, E.S., Karanov, A.M., Zhadina, S.D., 1980. Neuronal activity of the septum following various types of deafferentation. *Brain Res.* 187, 353–368. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90208-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90208-5)
- Vutskits, L., Gascon, E., Tassonyi, E., Kiss, J.Z., 2006. Effect of ketamine on dendritic arbor development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 91, 540–549. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj180>
- Wang, X.-J., 2010. Neurophysiological and Computational Principles of Cortical Rhythms in Cognition. *Physiol. Rev.* 90, 1195–1268. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2008>
- Wang, Z.-J., Zhang, X.-Q., Cui, X.-Y., Cui, S.-Y., Yu, B., Sheng, Z.-F., Li, S.-J., Cao, Q., Huang, Y.-L., Xu, Y.-P., Zhang, Y.-H., 2015. Glucocorticoid receptors in the locus coeruleus mediate sleep disorders caused by repeated corticosterone treatment. *Sci. Rep.* 5, 9442. <https://doi.org/10.1038/srep09442>
- Winson, J., 1978. Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201, 160–163. <https://doi.org/10.1126/science.663646>
- Wolkowitz, O.M., Reus, V.I., Canick, J., Levin, B., Lupien, S., 1997. Glucocorticoid medication, memory and steroid psychosis in medical illness. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 823, 81–96. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48381.x>

- Woodnorth, M.-A., Kyd, R.J., Logan, B.J., Long, M.A., McNaughton, N., 2003. Multiple hypothalamic sites control the frequency of hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 13, 361–374. <https://doi.org/10.1002/hipo.10111>
- Woodnorth, M.-A., McNaughton, N., 2005. Different systems in the posterior hypothalamic nucleus of rats control theta frequency and trigger movement. *Behav. Brain Res.* 163, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.04.004>
- Woodnorth, M.-A., McNaughton, N., 2002. Similar effects of medial supramammillary or systemic injection of chlordiazepoxide on both theta frequency and fixed-interval responding. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 2, 76–83. <https://doi.org/10.3758/cabn.2.1.76>
- Yamamoto, C., McIlwain, H., 1966. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J. Neurochem.* 13, 1333–1343. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb04296.x>
- Yoder, R.M., Pang, K.C.H., 2005. Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 15, 381–392. <https://doi.org/10.1002/hipo.20062>
- Zaba, M., Kirmeier, T., Ionescu, I.A., Wollweber, B., Buell, D.R., Gall-Kleebach, D.J., Schubert, C.F., Novak, B., Huber, C., Köhler, K., Holsboer, F., Pütz, B., Müller-Myhsok, B., Höhne, N., Uhr, M., Ising, M., Herrmann, L., Schmidt, U., 2015. Identification and characterization of HPA-axis reactivity endophenotypes in a cohort of female PTSD patients. *Psychoneuroendocrinology* 55, 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.02.005>
- Zhou, M., Bakker, E.H.M., Velzing, E.H., Berger, S., Oitzl, M., Joëls, M., Krugers, H.J., 2010. Both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors regulate emotional memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.005>

## **8. DOROBEK NAUKOWY**

## PRACE ORYGINALNE:

1. Kowalczyk T., **Staszelis A.**, Bocian R., Siwiec M., Sowa J.E., Tokarski K., Kaźmierska-Grębowska P., Caban B., 'Posterior hypothalamic theta rhythm: electrophysiological basis and involvement of glutamatergic receptors', *Hippocampus*, January 2023, DOI: 10.1002/hipo.23500; IF: 3,753; MNiSW: 100
2. **Staszelis A.**, Mofleh R., Kocsis B., 'The effect of Ketamine on delta-range coupling between prefrontal cortex and hippocampus supported by respiratory rhythmic input from the olfactory bulb', *Brain Research*, June 2022, DOI: 10.1016/j.brainres.2022.147996; IF: 2,900; MNiSW: 100
3. Kowalczyk T., **Staszelis A.**, Kaźmierska-Grębowska P., Tokarski K., Caban B., 'The role of the posterior hypothalamus in the modulation and production of rhythmic theta oscillations', *Neuroscience* 470(3), July 2021, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.07.001; IF: 3,708; MNiSW: 140
4. **Staszelis A.**, Kowalczyk T., 'The role of the posterior hypothalamic area in the generation of theta rhythm', *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 75(1):406-416, June 2021, DOI: 10.5604/01.3001.0014.9333; IF: 0,357; MNiSW: 40
5. Caban B., **Staszelis A.**, Kaźmierska-Grębowska P., Kowalczyk T., Konopacki J., 'Postnatal development of the posterior hypothalamic theta rhythm and local cell discharges in rat brain slices: hypothalamic theta postnatal development', *Developmental Neurobiology* 78(11), July 2018, DOI: 10.1002/dneu.22628; IF: 2,600; MNiSW: 100

## STAŻE NAUKOWE:

Projekt na Uniwersytecie Harvarda finansowany z grantu z Fundacji Kościuszkowskiej zrealizowany między 1 lipca a 30 września 2021 w laboratorium profesora Bernata Kocsisa, gdzie badałam i analizowałam wcześniej zebrane dane. Dane składały się z 24-godzinnych nagrań aktywności mózgu szczura po podaniu ketaminy.

## KONFERENCJE NAUKOWE:

- 11-15. 07. 2020 Caban B., **Staszelis A.**, Sowa J. E., Siwiec M.,  
Kazmierska-Grebowska P., Bocian R., Kowalczyk T.  
*'Well-synchronized theta oscillations induced by corticosterone  
in the posterior hypothalamic region of rats'*  
FENS (Federation of European Neuroscience Societies) 2020,  
Glasgow (on-line)  
- prezentacja plakatowa
- 11-15. 07. 2020 Kowalczyk T., **Staszelis A.**, Sowa J.E., Siwiec M.,  
Kaźmierska-Grębowska P., Caban B.  
*'The involvement of different glutamatergic stimulation  
in the production of local posterior hypothalamic theta  
oscillations in vitro'*  
FENS (Federation of European Neuroscience Societies) 2020,  
Glasgow (on-line)  
- prezentacja plakatowa
- 22-24. 11. 2019 **Staszelis A.**  
*'Overview of the main functions of the hypothalamus'*  
9th International Conference Aspects of Neuroscience,  
Warszawa, Polska  
- prezentacja plakatowa
- 28-30. 08. 2019 **Staszelis A.**, Caban B., Kaźmierska-Grębowska P.,  
Sowa J. E., Siwiec M., Kowalczyk T.  
*'NMDA-induced posterior hypothalamic theta rhythm  
recorded in vitro'*  
14th International Congress of the Polish  
Neuroscience Society, Katowice, Polska  
- prezentacja plakatowa

- 28-30. 08. 2019 Kowalczyk T., **Staszelis A.**, Kaźmierska-Grębowska P., Sowa J. E., Siwiec M., Caban B.  
*'Posterior hypothalamic „timing cells” activity and kainite-induced local theta rhythm in both in vitro and in vivo preparations'*  
 14th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Katowice, Polska  
 - prezentacja plakatowa
- 24-25. 06. 2019 **Staszelis A.**, Kowalczyk T.  
*'Glutamatergic theta rhythm in the posterior hypothalamic area in vitro - involvement of AMPA receptors'*  
 ENCODS 2019, Francis Crick Institute, London, United Kingdom  
 - prezentacja plakatowa
- 23-25. 11. 2018 **Staszelis A.**, Kowalczyk T.  
*'Posterior hypothalamic area (PHa) – a modulator of hippocampal theta and independent generator of local rhythmic activity'*  
 8th International Conference "Aspects Of Neuroscience", Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska  
 - prezentacja plakatowa
- 7-11. 07. 2018 Kowalczyk T., Bocian R., **Staszelis A.**, Caban B., Kaźmierska P., Siwiec M., Tokarski K.  
*'Kainate-induced posterior hypothalamic theta rhythm in vivo: modulation by corticosterone'*  
 "FENS" conference, Berlin, Niemcy  
 - prezentacja plakatowa



- 7-11. 07. 2018      Kaźmierska P., Caban B., **Staszelis A.**, Bocian R., Siwiec M., Tokarski K., Kowalczyk T.  
*'Kainate-induced posterior hypothalamic theta rhythm in vitro: modulation by corticosterone'*  
"FENS" conference, Berlin, Niemcy  
- prezentacja plakatowa
- 7-11. 07. 2018      Caban B., **Staszelis A.**, Kaźmierska P., Siwiec M., Tokarski K., Kowalczyk T.  
*'Kainate-Induced Theta-Related Neuronal Activity in the Posterior Hypothalamic Area in vitro'*  
"FENS" conference, Berlin, Niemcy  
- prezentacja plakatowa
- 25-26. 04. 2018      Caban B., **Staszelis A.**, Kaźmierska P., Siwiec M., Sowa J.E., Kowalczyk T.  
*'Cellular correlates of kainate-induced posterior hypothalamic theta rhythm in vitro'*  
XI Konferencja Elektrofizjologiczna, Warszawa  
- prezentacja ustna
- 20-22. 04. 2018      **Staszelis A.**, Simonsen O.W., Witter M.P.  
*'Immunohistochemical classification of neurons in layer V of the medial entorhinal cortex with proven convergent input from the subiculum and the retrosplenial cortex'*  
„Neuronus”, Kraków, Polska  
- prezentacja ustna
- 9-10. 12. 2017      **Staszelis A.**  
*'Memory processes - a neurobiological perspective'*  
2nd Student Conference "Psych-On", Instytut Psychologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska  
- prezentacja ustna

24-26. 11. 2017

**Staszelis A.**

*'Subpopulations of theta-related cells in the hippocampal formation and posterior hypothalamic area'*

7th International Conference "Aspects Of Neuroscience",

Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska

- prezentacja plakatowa