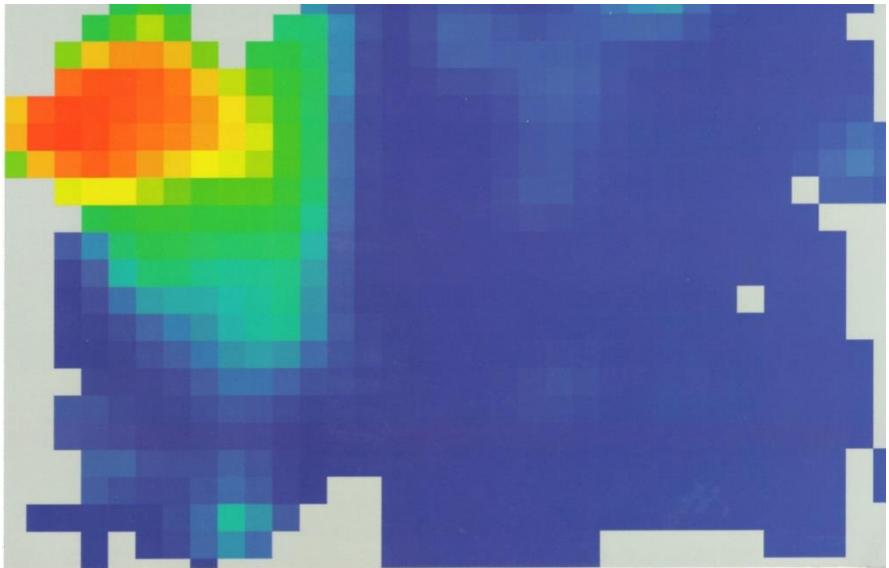


MTA Doktori Értekezés Tézisei

## **Hippocampus *in vivo* –**

**Memóriaképződés és navigáció, információkódolás és patológia**



**Dr. Czurkó András**

Richter Gedeon Nyrt.

Farmakológiai és Gyógyszerbiztonsági Kutatási Főosztály

Preklinikai EEG laboratórium

Budapest, 2024

**Fedőlap ábrája:** Egy ún. „wheel-sejt” aktivitását mutatja a futókerékben.

A European Journal of Neuroscience (Volume 11, Issue 1, Jan 1999) címlapja.

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>ELŐSZÓ</b> .....	<b>6</b>
<b>I. BEVEZETÉS</b> .....	<b>14</b>
<b>A hippocampus <i>in vivo</i>, a hippocampus funkciójával kapcsolatos teóriák</b> ...	<b>14</b>
A hippocampus szerepe az epizódikus memóriában .....	14
A hippocampus szerepe a téri tájékozódásban .....	16
A hippocampus szerepe a válasz gátlásban .....	18
<b>Gyrus dentatus - téri tanulás és fejlődési plaszticitás</b> .....	<b>19</b>
<b>A hippocampus elektromos aktivitása</b> .....	<b>19</b>
A „theta” aktivitás.....	20
Az atropin-rezisztens és atropin-szenzitív hippocampális theta ritmus ...	21
A nagy amplitúdójú irreguláris aktivitást ( <i>LIA, sharp wave, „ripple”</i> ) .....	22
<b>A hippocampális „hely-sejtek”</b> .....	<b>23</b>
<b>Információkódolás kérdései a hippocampusban</b> .....	<b>23</b>
<b>A hippocampushoz kapcsolódó patológiás agyi folyamatok</b> .....	<b>26</b>
<b>II. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>28</b>
<b>Okoz-e súlyos téri tájékozódási deficitet a Morris féle vízilabirintus tesztben a neonatális patkányok egyszeri nagy dózísú agyi röntgen besugárzása? (1)</b> 28	
<b>Vizsgálható-e a „futókerék feladat” (<i>wheel running</i>) alatt a hippocampális piramis sejtek aktiválódása? (2)</b> .....	<b>28</b>
<b>Elkülöníthetők-e a piramis sejtek és az interneuronok, csupán fiziológiai jellegzetességeik alapján a hippocampális extracelluláris mikroelektródás elvezetésekben? (3-10)</b> .....	<b>28</b>
<b>Vizsgálható-e a piramis sejt – interneuron szinaptikus kapcsolat a keresztkorrelációs módszer alkalmazásával, viselkedő állatokon? (3)</b> .....	<b>29</b>

Észlelhető-e a téri topográfia ill. a magatartási állapotok hatása a „futókerék feladat” alatt megjelenő sejt párokon, mint funkcionális klasztereken? (4)	29
Vizsgálható-e a hippocampális piramissejtek „futókerék feladat” alatti kódolása: tüzelési-frekvencia-ráta kód ill. idői theta-fázis kód? (5)	29
Előre jelzi-e a hippocampális piramissejtek tüzelési dinamikája az adott akciós potenciál theta-fázishoz kapcsolódó „fázis-változást”? (6)	29
Tipizálhatóak-e a hippocampális interneuronok lokális field oscillációik alapján? (7, 8)	29
Mutatnak-e valamiféle kapcsoltságot a téri tüzelésükben a hippocampális „hely-sejt” – interneuron párok? (9)	29
Változik-e a hippocampális neuronok tüzelési frekvenciája az egymást követő alvási periódusok alatt ill. az “újdonság” éber tapasztalása kapcsán? (10)	29
Hogyan modellezhető a hippocampushoz kapcsolódó néhány patológiás agyi folyamat, <i>in vivo</i> ? (11-14)	29
<b>III. MÓDSZEREK</b>	<b>30</b>
<b>Állatok</b>	<b>30</b>
<b>Magatartási feladatok</b>	<b>30</b>
Morris féle vízi labirintus teszt	30
A <i>wheel running</i> magatartási feladat	31
A <i>pellet chasing</i> magatartási feladat	31
A <i>chocolate chasing</i> magatartási feladat	31
A feladatok előtti és utáni alvás szakaszok	32
<b>Műtétek</b>	<b>32</b>
<b>Szisztémás kezeléssel kiváltott epilepsziás aktivitás</b>	<b>33</b>
<b>Az epilepsziás aktivitás magatartási értékelése</b>	<b>34</b>
<b>EEG elvezetések</b>	<b>34</b>

<b>Technológiai fejlesztések.....</b>	<b>35</b>
<b>Sokcsatornás elektrofiziológiai elvezetések.....</b>	<b>36</b>
<b>Adattárolás .....</b>	<b>37</b>
<b>Adatanalízis.....</b>	<b>37</b>
A theta EEG aktivitás és a unitok theta fázisának meghatározása.....	38
<b>MRI mérések .....</b>	<b>38</b>
<b>Szövetteni módszerek .....</b>	<b>39</b>
Gallyas-féle „sötét sejt” ezüstözés.....	40
<b>IV. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA .....</b>	<b>40</b>
<b>V. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>45</b>
<b>VI. IRODALOM .....</b>	<b>47</b>
<b>VI/1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények .....</b>	<b>47</b>
<b>VI/2. Egyéb az <i>in vivo</i> multielektrodás elektrofiziológiai metodikához     kapcsolódó saját közlemények .....</b>	<b>49</b>
<b>VI/3. Egyéb a doktori fokozat óta megjelent saját közlemények .....</b>	<b>50</b>
<b>VI/4. Publikációs mutatók .....</b>	<b>52</b>
<b>VI/5 A tézisek általános irodalom jegyzéke .....</b>	<b>53</b>

# ELŐSZÓ

Disszertációmban a hippocampus in vivo kutatásának kérdéseibe nyújtok némi betekintést, ugyanakkor mindenképpen szükségesnek érzem a tárgyalt kérdések egy kicsit nagyobb látószögű keretbe helyezését. A hippocampus funkciójának bemutatását Buzsáki György a Magyar Pszichológiai Szemlében, 2007-ben megjelent, a Grastyán-iskola örökségéről is szóló eredeti közleményéből vett idézettel lehet a legjobban elkezdni:

„H. M. híres páciens esete óta – akinek mindkét oldali hippocampusát műtéti beavatkozással eltávolították epilepsziakezelés miatt – megegyezés alakult ki a pszichológusok között, hogy a hippocampus és asszociált struktúrái a deklaratív (epizodikus és talán szemantikus) memóriáért felelősek (Scoville & Milner, 1957). A kódolás és információkinyerés mechanizmusának tisztázása viszont a jövő óriási feladata maradt.” (Buzsáki, 2007).

Tehát a hippocampus memóriaképzésben betöltött szerepéről nem az állatkísérletes pszichológia akkoriban domináló behaviorista iskolája szolgáltatta az első meghatározó eredményeket, hanem egy klinikai esettanulmány, amit William Scoville idegsebész és Brenda Milner neuropszichológus írtak le. Így, ironikusan a H. M. rövidítésű beteg, mint 2008-as halála után felfedték Henry Gustav Molaison, hozzájárulása az emberi memória működésével kapcsolatos ismereteinkhez jelentősebb bármely, a témával foglalkozó tudományos kutató hozzájárulásánál. Hasonlóan, mint a rosette-i kő, H. M. memória károsodásának vizsgálata forradalmasította a memória idegrendszeri alapjaival kapcsolatos megértésünket (Pinel, 2000). Hogy megfelelő perspektívából lássuk H. M. klinikai esetének leírását, tanulmányozását és ennek hatását, tudnunk kell, hogy az 1950-es évek memória kutatását a kor egyik legbefolyásosabb kutatójának, Karl Lashley-nek, a mintegy 33 évig tartó, de hiábavaló „*engram*” kutatása határozta meg, vagyis az az eredmény, hogy a memórianyomok az agyban diffúzan és ekvipotenciálisan helyezkednek el (Pinel, 2000; Bruce, 2001). Ezeket a kísérleteket Karl Lashley az akkoriban művelhető agyi léziós technikával végezte patkányokon, macskákon és majmokon miután komplex tanulási feladatokat tanított meg az állatoknak. A kor másik meghatározó teóriája Donald O. Hebb

memória konszolidációs teóriája volt, vagyis, hogy a tapasztaláshoz kapcsolódó szenzoros információk a rövid távú memória zárt idegkörében reverberálnak és csak megfelelő idő után a szinapszisok strukturális változásával íródnak a hosszú távú memóriába (Hebb, 1949; Pinel, 2000).

Az agykutatás kezdeti korszakában bármely agyi régió funkciójának tanulmányozásában, a lokális agyi léziós kísérletek domináltak. Ez nagyrészt a XIX. századi híres klinikai neurológiai esetleírásokból adódott (Paul Broca / Carl Wernicke) melyek aztán az állatkísérletesen végzett agyi léziók alkalmazásával kulcsfontosságú betekintést engedtek a magatartás idegrendszeri alapjainak megértéséhez (Vaidya és mtsai., 2019). Az agy tanulmányozásának másik, szintén már a XIX. századtól fejlődő megközelítése, az agy lokális elektromos stimulálása volt, mely Wilder Penfield nagyszerű idegsebészeti munkájában csúcspontot ért el az agy részletes feltérképezésében (Isitan és mtsai., 2018). Megjegyzendő, hogy Donald O. Hebb is együtt dolgozott Wilder Penfielddel, amikor 1937-től két éves ösztöndíját töltötte a Montreáli Neurológiai Intézetben, ahol epilepszia műtéten átesett, agykérgi léziós betegeket tesztelt, és egy hosszú távú kollaboráció is kialakult közöttük. Ennek kapcsán ajánlotta diákját Brenda Millert Penfieldnek, aki aztán H.M. híres neuropszichológiai esetét is tanulmányozta (Corballis, 2020).

John O'Keefe fedezte fel a hippocampus-ban az ún. „hely-sejteket” (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). John O'Keefe a kanadai McGill Egyetemen szerezte Mester és PhD fokozatát, Donald O. Hebb Pszichológia tanszékén és Donald O. Hebb híres szemináriumain is részt vett. Hebb ezeken a szemináriumokon ragaszkodott hozzá, hogy „Mister Hebb”-nek szólítsák ne dokornak vagy professzornak. Ez a formalitás a Harvard Egyetem professzorai között volt hagyomány, és Hebb valószínűleg arra próbált ezzel utalni, hogy Ő a Harvardon végzett. Egy visszaemlékezés szerint a csoportban csak John O'Keefe-nak volt elég bátorsága ahhoz, hogy Donald O. Hebbet így szólítsa, a többiek csak motyogtak valamit (Corballis, 2020). John O'Keefe az 1971-es rövid *Brain Research* cikkében is, a mai szemmel nagyon kevés (8 / 76 *units*) elvezetett „hely-sejt” alapján, egy nagyon bátor kijelentést tett, mely szerint a hippocampus egy térbeli térképet szerkeszthet (Moser és mtsai., 2017).

John O'Keefe és Lynn Nadel az 1978-ban megjelent, *The hippocampus as a cognitive map* könyvük előszavában minderről így írnak:

*„Our voyage of discovery was launched from the McGill Psychology Department where we were both Ph.D. students in the 1960s. At McGill, Don Hebb had built a department which encouraged students to theorize about the neural bases of perception, motivation, and cognition, and which gave them the freedom and the opportunity to test their ideas. Hebb's theory of the cell assembly was like a model map—it showed what a theory of the brain would look like. Hebb's graduate seminar was particularly influential.”* (O'Keefe & Nadel, 1978).

John O'Keefe nagyrészt a hippocampus-ban lévő „hely-sejtek” felfedezéséért 2014-ben Brenda Milnerrel és Marcus Raichle-el közösen a Kavli-díjat majd May-Britt Moserrel és Edvard Moserrel együtt a Nobel-díjat kapta meg.

Az idegtudományban az ún. mikroelektrodákkal történő extracelluláris unit elvezetés (*single-unit recordings*) is egy alapvető módszerré vált már az 1950-es évektől. Ez a módszer szolgáltatja a legprecízebb információt időben az egyes neuronok akciós potenciáljairól akár éber, viselkedő állatokból is. Már 1940-ben Renshaw és mtsai. a macska hippocampus piramis sejteinek aktivitását vezették el (Renshaw és mtsai., 1940), majd az 1950-es évektől több laboratórium is vezetett el extracelluláris *unit* aktivitást az agy különböző részeiből akár éber állatokból is (Brookhart és mtsai., 1950; Woldring & Dirken, 1950; Li & Jasper, 1953; Hubel és mtsai., 1959). 1959-ben publikálta David H. Hubel és Torsten Wiesel azt a vizsgálatukat, amelyben felületesen altatott macskák látókérgéből vezettek el extracelluláris *unit* aktivitást és meghatározták az egyes idegsejtek „érzékenységi mezőit” (*receptive fields*) (Hubel & Wiesel, 1959). Ezért a munkájukért, illetve vizuális rendszerben történő információfeldolgozás kutatásáért 1981-ben Nobel-díjat kaptak.

Amikor John O'Keefe a hippocampus-ban leírta a „hely-sejteket” (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), akkor már az általuk kifejlesztett és technikai áttörésnek számító, lokális mikromozgatókkal működő mikroelektrodás technikát használt éber, viselkedő patkányokon (Ainsworth és mtsai., 1969). A következő technikai áttörés a kvantitatív *video-tracking* metodika kifejlesztése volt a hippocampális elvezetések számára, amit John O'Keefe Bruce McNaughtonnal közösen fejlesztett ki (McNaughton és mtsai., 1983), illetve tőlük függetlenül Bob Muller is kifejlesztette (Muller és mtsai., 1987). A következő nagy áttörés a tetród elektródákkal történő elvezetés alapelveinek kidolgozása volt, mely az extracelluláris *spike* magasságok és alakok variációit kihasználva lehetővé teszi számos *single unit* meghatározását egy adott elvezetési helyről a hippocampus-ban (McNaughton és mtsai., 1983). Ez a tetród alapelv és a hyperdrive kifejlesztése tette lehetővé, hogy egyszerre akár több mint 100 hippocampális idegsejt aktivitását is elvezethessék (Wilson & McNaughton, 1993), ami már a Donald O. Hebb által megjósolt idegsejt-együttesek (Hebb, 1949) kódolásának a tanulmányozását jelentette.

Ahogy fentebb említettem, O'Keefe és Dostrovsky az 1971-es rövid cikkükben arról számoltak be, hogy a patkány hippocampus néhány extracellulárisan elvezetett idegsejtjének valószínűleg téri receptív mezeje van (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Ebben az 1971-es cikkükben ezen jól lokalizálható tüzelésű „hely-sejteket” száma valóban csekély volt, konkrétan 8, míg a maradék 68-ból pl. 14 unit a Vinogradova-féle „*arousal*” vagy „figyelmi” sejtekhez tartozónak tűnt (Vinogradova és mtsai., 1970), 21 *unit* pedig olyan a „mozgással” kapcsolatos magatartás alatt volt aktív, mint az „orientáció”, szimatolás vagy járkálás. Később John O'Keefe a következő, 1976-os cikkében a „hely-sejtek” létezését már jelentős mennyiségű adattal támasztotta alá (O'Keefe, 1976), és ekkorra már James B. Ranck Jr., aki két laboratóriumában is (University of Michigan és SUNY Downstate Medical Centerben, Brooklyn) tanulmányozta szabadon mozgó patkányokon a hippocampus aktivitását (Ranck, 1973) is látott már ilyen „hely-sejteket” (Best & White, 1999; Moser és mtsai., 2017).

John O'Keefe és Lynn Nadel az 1978-ban megjelent, „*The hippocampus as a cognitive map*” könyvük előszavában minderről így írnak:

*„Jim Ranck pioneered the recording of single cells from the hippocampus of the freely moving animal. Others had done so before him (most notably Olds (1965) and Vinogradova (1970)) but under very restricted conditions which may have prevented them from seeing the more spatial aspects of these cells. Jim Ranck's rats, like ours, were allowed to move about in an extended environment. The remarkable similarity between his data and ours was a source of great encouragement in those early days. We used different terminology and emphasized different aspects of the behavioural correlates but it was clear that we were seeing the same things.” (O’Keefe & Nadel, 1978).*

A „hely-sejtek” léte, illetve, hogy ezek az egyes sejtek a téri környezet különböző részein voltak aktívak, valamint Edward C. Tolman 1948-as teóriája, hogy a téri navigációt egy belső kognitív térkép irányítja (Tolman, 1948), inspirálta O’Keefe és Nadel felvetését, mely szerint a „hely-sejtek” ennek az allocentrikus kognitív térképnek az alapegységei (O’Keefe & Nadel, 1978).

O’Keefe és Nadel ezen felvetése mérföldkőnek számít a hippocampus funkciójával kapcsolatos kutatásokban. Könyvük, *„The hippocampus as a cognitive map”* (O’Keefe & Nadel, 1978), évtizedek ellentmondásos kísérletes vizsgálatait szintetizálja és értelmezi újra, különösen a léziós vizsgálatokat. Ezeket egy egységes teoretikus keretbe helyezi, melynek központi részét a „hely-sejtek” képezik, melyek a tér reprezentálásának alap elemei, ugyanakkor eseményeket és élményeket is összekapcsolhatnak a térrel. A könyv Tolman kognitív térkép elképzelésének idegsejt szintű kiteljesítése, mely megmutatja, hogy egy ilyen térkép a kognitív funkciók széles spektrumát teheti lehetővé, akár az emberben is. Ez a könyv még most is, 45 évvel a publikálása után egy olyan teoretikus pillér, amelyen majd minden a hippocampus téri kódolásával kapcsolatos későbbi vizsgálat alapul (Moser és mtai., 2017).

Jómagam 1994-ben csatlakoztam Prof Szabó Imre PTE Magatartástudományi Intézetben lévő laboratóriumához, hogy a hippocampális idegsejt aktivitását vezethessem el az ott fejlesztett sok-csatornás elektrofiziológiai mérőrendszerrel. Így jutottam ki aztán

Prof. Buzsáki György laboratóriumába Newarkba (NJ, USA) is, illetve később Prof. Robert (Bob) Muller akkor induló bristoli (University of Bristol, UK) laboratóriumába.

John O'Keefe így ír Bob Mullerről 2013-ban bekövetkezett hirtelen halálát követően:

*“As early as 1975, he decided to switch from working on the properties of biological membranes to studying the spatial functions of the hippocampus by recording the activity of single cells in freely moving animals. It was during a visit to London that he stopped in to see Lynn Nadel and myself, and announced his Pauline conversion. In his usual forthright manner, he told us that he had decided to make the switch not because he thought that the cognitive map theory was necessarily correct, but that if space had any role to play in the function of the hippocampus, even marginally, great classical thinkers had provided us with a panoply of ideas and approaches that we could exploit in our attempts to understand it. Space would be our hippocampal Rosetta Stone and Bob believed he could help to decipher it.” (O'Keefe, 2014)*

Ezek szerint a hippocampus *in vivo* működésének megértéséhez két rosette-i kőről is beszélnek, az egyik H.M. és a hozzá hasonló betegek memória károsodásának neuropszichológiai vizsgálata lehet, a másik pedig a térbeli navigáció vizsgálata a hippocampális „hely-sejtek” aktivitásán keresztül. Véleményem szerint azonban, a hippocampus *in vivo* működésének teljes megértéséhez egy harmadik rosette-i kő is szükséges, ami azokat az általánosabb patológiás folyamatokat jeleníti meg, melyek szintén kapcsolódnak a hippocampus gyakran nem megfelelő működéséhez. Ilyen patológiás működés az epilepszia betegség, hisz H.M. beteg esetén is ez volt a híressé vált műtétének kiváltó oka. Hasonlóan kiemelendő a neurodegeneratív megbetegedések közül az Alzheimer-kór, melyben a hippocampus az egyik legkorábban érintett agyi struktúra. Ebből adódóan nem meglepő, hogy a betegség egyik első jele az emlékezetzavar, de az Alzheimer-kór kialakulását megelőző egyik első jelnek számít a térbeli tájékozódásban tapasztalt nehézség is (Allison és mtsai., 2016).

Az Alzheimer-kór kiváltó okait még nem értjük teljesen, a manapság intenzíven kutatott amyloid hipotézis mellett, a klinikai gyakorlatban a korábbi kolinerg hipotézisen

alapuló kolinészteráz enzim gátló gyógyszereket alkalmazták a betegek tüneteinek kezelésére. Amikor több mint 10 évvel ezelőtt a gyógyszerkutatásba kerültem, elég hamar szembesültem azzal, hogy a farmakológiai kutatásokban az öregkori memória diszfunkció kolinerg hipotézise (Bartus és mtsai., 1982) alapján a szkopolammal, mint egy standard referencia vegyülettel váltanak ki kísérletes kognitív romlást, mind a kísérleti állatokban, mind az emberekben. Ebből a szempontból talán érdemes itt is megemlíteni, hogy már a hippocampus kutatásának korai időszakában is a szkopolamin kezelést egyenértékűnek tartották a hippocampektómiával, a hippocampus sebészi eltávolításával.

A farmakológiai kutatásokban a szkopolamin által kiváltott kognitív romlást a lehetséges kognitív javító anyagok keresésére használják, azonban a szkopolamin ilyen szisztémás adása elég korlátozott prediktív erővel bír, nagyon sokszor fals pozitív eredmény mutat (Sarter, 2006; Barak & Weiner, 2011). Ennek egyik oka az lehet, hogy ez a szisztémásan adott antikolinerg szer olyan, nem specifikus magatartási hatásokat is okoz, főleg nagyobb dózisban, ami a perifériás mellékhatásokból is adódhat (Klinkenberg & Blokland, 2010). Az objektív képző eljárások a gyógyszerkutatásokban is egyre nélkülözhetetlenebb eszközökké válnak, így érthető, hogy funkcionális kisállat MRI segítségével is megpróbáltuk felderíteni a szkopolamin hatását az agyra.

Az agykutatás egyik központi problémája, az információkódolás kérdése, vagyis az, hogy agyunk hogyan képezi le az elsősorban a külső környezetünkből érkező (ránk zúduló) információkat. Donald O. Hebb már említett memória konszolidációs teóriája is tulajdonképpen ehhez a nagy kérdéshez kapcsolódik. A kérdés alapvetően két nézőpont felől közelíthető meg: az egyik a tüzelési rátára teszi a hangsúlyt (frekvencia kódolás), a másik az egyes tüzelések időzítésére fókuszál (idő kódolás). Az első megközelítés úgy határozza meg az agyban lévő idegsejtek aktivitását, mint a Geiger–Müller-számláló, a másik inkább egy hangszerezen történő játék hallgatásához hasonlóan közelíti meg az idegsejtek aktivitását, fontos, hogy a zongorán milyen gyakran ütnek le egy adott billentyűt, de az is lényeges, a dallam szempontjából, hogy pontosan mikor szólal meg az adott hang (Renken, 2021).

A jelen értekezés nem tűzi ki célul ezen kiindulópontok részletesebb taglalását, hanem azt az alapállást tükrözi, hogy az agy, illetve a hippocampus, valószínűleg mind a két stratégiát használja az információkódolás során. Tehát a tüzelési ráta és az akciós potenciálok pontos időzítése lehet egymástól kölcsönösen függő, kiegészítő vagy független, vagyis az input különböző jellegzetességeit kódoló mechanizmus. Mindezek miatt az értekezés adottnak veszi azt az elképzelést, hogy magának a kódolási folyamatnak valószínűleg a részét képezheti az idegsejtek tüzelésének relatív időzítése a lokálisan észlelhető EEG hullámokhoz képest.

# I. BEVEZETÉS

## **A hippocampus *in vivo*, a hippocampus funkciójával kapcsolatos teóriák**

A hippocampus funkciójára vonatkozó teóriák három fő elképzelés körül csoportosultak a szakirodalomban: epizódikus memória, téri kogníció és a válasz gátlás.

### **A hippocampus szerepe az epizódikus memóriában**

A hippocampus speciális szerepe a memória konszolidáció és az információtárolás mechanizmusaiban már nagyon korán (1889) felmerült, a corpora mammilláriákat is érintő patológiai folyamatok (Korsakow szindróma) miatt (Grastyán, 1973; Vein, 2009). Bechterew 1899-ben mutatott be egy beteget, akinek jelentős memória zavara volt, amelyet a temporális lebenyek bilaterális ellágyulása okozott, elsősorban a gyrus uncinatus és a hippocampus károsodása. Ötven évvel később, Gleees és Griffith írta le egy 58 éves asszony esetét, akinek súlyos memória károsodása alakult ki feltehetőleg egy agyi érkatasztrófa után. Miután 15 év múlva súlyos epilepsziás rohamokat követően meghalt, a neuropatológiai vizsgálat cisztás degenerációt talált bilaterálisán a hippocampusban és a hippocampális és fusiform gyrusban. Ezen eset és egy 5 évvel korábbi esetleírás (Grünthal) alapján a szerzők azt a következtetést vonták le, hogy a hippocampus és a környezetében lévő agyi struktúrák fontos szerepet játszanak a memória funkció fenntartásában (Stepien & Sierpinski, 1964).

Később, a temporális lebenyt érintő idegsebészeti beavatkozások következményeként jelentkező tanulási, megjegyzési zavarok világítottak rá újra a hippocampus memóriafolyamatokban betöltött fontos szerepére. Az első ezzel kapcsolatos nevezetes klinikai esettanulmány (H.M.) az előszóban már említésre került. William Scoville idegsebész és Brenda Milner neuropszichológus írták ezt az esettanulmányt 1957-ben, amelyben két másik beteg esetével együtt, a híres H. M. rövidítésű beteg is szerepelt (Scoville & Milner, 1957).

Tulajdonképpen, H.M. beteg jelenti a modern memóriakutatás kezdetét. H.M. beteg esete előtt, nagyrészt Karl Lashley (lásd előszó) munkásságának köszönhetően a memória funkciókról úgy gondolkodtak, hogy azok nagyrészt az egész agykéregben széles körben szétosztva az intellektuális és perceptuális funkciókkal integrálódva helyezkednek el. H.M. esetének tanulmányozása világított rá, hogy a memória egy különálló agyi funkció, ami elkülönül az intellektuális és egyéb kognitív képességektől, és szerveződésében a mediotemporális lebeny kulcsfontosságú (Squire, 2009).

A korai cikkek címei ebből a szempontból félrevezetőek voltak mert sokan kizárólag a hippocampus-szal azonosították a memóriát, pedig a cikkekből és konklúzióikból kiderült, hogy a sebési leírások szerint a hippocampus, amygdala, és a környező parahippocampalis gyrus került eltávolításra. Brenda Milner erről évekkel később így ír: *“Despite the use of the word ‘hippocampal’ in the titles of my papers with Scoville and Penfield, I have never claimed that the memory loss was solely attributable to the hippocampal lesions”* (Squire, 2009).

Henry Gustav Molaison 82 éves korában meghalt, de tudományos közreműködését folytatva örömmel hozzájárult, hogy agyát 2008 decemberi halála után is tovább tanulmányozzák (Augustinack et al., 2014). Halála után nem sokkal *in situ* 3 T MRI felvételek készültek az agyról, majd a boncolás és fixálás után *ex vivo* ultranagy felbontású 3 T és 7 T MRI felvételek készültek. Ezek alapján H.M. beteg operációjánál a következő anatómiai területeket távolították el: a mediális temporopólaris kérget, a piriform kérget, a teljes entorhinalis kérget, a perirhinalis kéreg nagy részét és a subiculumot, az amygdalát (kivéve a dorzális centrális és mediális magot), valamint a hippocampus anterior felét és a gyrus dentatust. A posterior parahippocampalis gyrus csak részben sérült.

H.M. beteg agyán részletes szövettani vizsgálatot is végeztek azért, hogy teljes mikroszkópos képet kapjanak a teljes agyról. Ezért az agy egészéből 2401 szövettani metszetet készítettek a University of California, San Diego ún. *The Brain Observatory* - jában, 2009-ben, majd ezeket digitalizálták, 3D-ben rekonstruálták és hozzáférhetővé tették az interneten: <https://www.thebrainobservatory.org/project-hm>.

Ebből a mikroszkópikus felbontású 3D modellből is részletes méréseket végeztek és ezekből is az derült ki, hogy H.M. beteg mindkét oldali féltekéjében a hippocampus jelentős része (posterior fele) megmaradt az operáció után és ezek a megmaradt hippocampus részek szövettani szempontból is épnek tűntek (Annese et al., 2014). Egy további meglepő lelet volt, hogy egy jól körül határolt léziót találtak a bal frontális kéreg laterális orbitalis gyrusában, melyet az operáció folyamatával hoztak összefüggésbe. Abból a szempontból pedig, hogy H.M. beteg eredetileg epilepsziás beteg volt nagyon érdekes, hogy a szövettani vizsgálat a megmaradt hippocampus-ra vonatkozóan nem talált olyan neuropatológiai jellegzetességeket (a gyrus dentatus szemcsejeit diszperziója, idegsejt pusztulás a piramis rétegben) ami az idiopátiás temporális lebeny epilepsziára utalhatott volna.

Az, hogy H.M. beteg esetében a hippocampus posterior része megmaradt jól összecseng avval a megfigyeléssel, hogy elég részletesen le tudta rajzolni lakhelyének alaprajzát annak ellenére, hogy 5 évvel az operációja után költözött csak oda. Suzanne Corkin evvel kapcsolatban így ír: *„H.M. acquired the representation after the onset of his amnesia. Presumably, he was able to construct a cognitive map of the spatial layout of his house as the result of daily locomotion from room to room, thereby encoding the location of each room in relation to the other rooms. This allocentric representation of his house, based on thousands of 'learning trials', was shown in his drawing of the floor plan.”* (Corkin, 2002).

## **A hippocampus szerepe a téri tájékozódásban**

A hippocampus funkciójával kapcsolatos másik nagy teória a téri tájékozódással kapcsolatos, mely eredetileg az állatkísérletes eredményekből nőtt ki. Az előszóban már érintettünk. O'Keefe és Nadel *The hippocampus as a cognitive map* (O'Keefe & Nadel, 1978) című könyvét, mely mérföldkőnek számít a hippocampus funkciójával kapcsolatos fogalomalkotásban. A későbbiekben a patkány hippocampus téri tájékozódásban játszott szerepéről jelentős mennyiségű bizonyító adat gyűlt össze (Nadel, 1991) és konszenzus alakult ki, hogy a téri tájékozódás súlyosan károsodik a különböző hippocampus lézióknál

(Sutherland, Whishaw, & Kolb, 1983). Mindezzel nagymértékben összecsengett, hogy a hippocampus piramissejtjei a „hely-sejtek”, specifikusan a téri környezet bizonyos helyein tüzeltek (R. U. Muller, Kubie, & Ranck, 1987; O'Keefe & Dostrovsky, 1971).

John O'Keefe 1971-ben írta le ezeket a „hely-sejteket” vagy „place sejteket”, melyek olyan hippocampális piramissejtek melyek a tér egy adott helyét kódolják, megnövelik tüzelési frekvenciájukat a tér egy adott pontján. Ezen „hely-sejtek” létezését és az őket befolyásoló tényezők mibenlétét, az elmúlt több mint 50 évben a világ sok-sok laboratóriumában már hatalmas mennyiségű kísérletes adattal támasztották alá. Ezért a felfedezésért 2014-ben John O'Keefe, a Moser házaspárral együtt (grid sejtek) Nobel díjat is kapott.

O'Keefe és Nadel teoretikus gondolkodását egyrészt a „hely-sejtek” felfedezése inspirálta, másrészt Edward C. Tolman 1948-as teóriája, mely szerint a téri navigációt egy belső kognitív térkép irányítja (Tolman, 1948). O'Keefe és Nadel mindezeket egy egységes teoretikus keretbe helyezte, melynek központi részét a „hely-sejtek” képezték, melyek a tér reprezentálásának alapelemei, az allocentrikus kognitív térkép alapegységei (O'Keefe & Nadel, 1978).

Hosszú évtizedek állatkísérletes kutatásai után, a funkcionális agyi képalkotó eljárások is igazolták az emberi hippocampus szerepét a téri tájékozódásban. Komplex virtuális környezetben történő navigáció során a jobb oldali hippocampus aktivációját mérték pl. PET vizsgálatokban (Maguire, Burgess, & O'Keefe, 1999). A további kutatásokban a hippocampus posterior részének aktivációját is mérték, melyről MRI morfometriai vizsgálattal később kimutatták, hogy a londoni taxisokban megnagyobbodott, és a megnagyobbodás mértéke korrelált a taxizással töltött idővel (Maguire et al., 2000).

Ezek a humán téri tájékozódással kapcsolatos agyi képalkotó eredmények jól megfeleltethetők az állatkísérletes eredményeknek is. A teljes hippocampus lézióra vonatkozó adatok mellett, ugyanis a hippocampus egyes alrégióinak szerepét is elkezdtek vizsgálni a téri tanulásban (E. Moser, Moser, & Andersen, 1993; Stubley-Weatherly, Harding, & Wright, 1996; Sutherland et al., 1983). A Morris-féle vízi labirintus tesztet használó vizsgálatok különbségeket mutattak ki a szelektív dorzális és ventrális

hippocampus léziók (E. Moser et al., 1993), valamint a dorzális CA1 és a ventrális CA3 alrégiók lézióinak (Stubley-Weatherly et al., 1996) hatásaiban is. Azt is kimutatták, hogy a patkány hippocampus dorzális egyharmadának roncsolása elég ahhoz, hogy súlyos téri tanulási deficit alakuljon ki, míg a ventrális rész kétharmadának léziója hatástalan (M. B. Moser, Moser, Forrest, Andersen, & Morris, 1995). Ezt a dorzális/ventrális funkcionális elkülönülést a rágcsáló hippocampusban számos további kísérlet erősítette meg és ez az elkülönülés evolúciósan megfeleltehető humán hippocampus navigációra vonatkozó posterior/anterior elkülönülésének (Maguire et al., 1999).

### A hippocampus szerepe a válasz gátlásban

A hippocampus magatartási gátlás teóriája a hatvanas évektől kezdve, széleskörben elfogadott volt, mivel a hippocampus léziós állatok általában hiperaktivitást mutattak ill. azokban tanulási tesztekben okozott a hippocampus lézió zavarokat, ahol a korábban megtanult (vagy nem tanult, de rossz) válaszokat kellett elnyomni („*response inhibition*”).

Grastyán Endre 1973-ban az Orientáció és megerősítés című MTA doktori értekezésében erről így ír (92. oldal): „*A hippocampus lézióját követő tünetek értékelésében, ha nem is általánosan, de dominálónan elfogadott nézet az, hogy a következményeket bizonyos gátlási folyamatok hiánya okozza, következésképpen a hippocampus funkciója egészét tekintve gátló agyi rendszer (Douglas, 1967; Kimble, 1968, 1969.) Ezt a gondolatot, a korábban már idézett hippocampalis ingerléses adatainkra alapozva, először határozottan talán mi magunk juttattuk kifejezésre. Általános jelentőségét tekintve a hippocampust egy negatív feed-back kör közti kapcsoló-elemeként értelmeztük, amely az agytörzsi aktivációs rendszerek működését hivatott kontrollálni.*”

## **Gyrus dentatus - téri tanulás és fejlődési plaszticitás**

Az intrahippocampális triszinaptikus kör első állomása a gyrus dentatus (DG). A DG téri tanulásban betöltött szerepe ellentmondásos (Conrad & Roy, 1993; McNaughton, Barnes, Meltzer, & Sutherland, 1989; Sutherland et al., 1983). Míg a kolhicin indukálta DG lézió súlyos téri tanulási deficitet okozott (McNaughton et al., 1989; Sutherland et al., 1983), az adrenalektómia után kialakuló mintegy 80 %-os szelektív DG károsodás szinte hatástalan volt (Conrad & Roy, 1993). Megjegyzendő azonban, hogy a kolhicin indukálta DG lézió magában foglalhatja a hílus (CA4) és a CA3 hippocampális alrégiók károsodását is (Goldschmidt & Steward, 1980; Tilson & Peterson, 1987).

Az idegrendszerben lévő differenciálódott vagy érett sejtekkel szemben, az osztódó sejtek extrém radioszenzitívek (Altman, Anderson, & Wright, 1969). Ez lehetővé teszi a posztnatálisan képződő DG szemcsesejtek szelektív elpusztítását (Baver & Altman, 1975; Bayer, Brunner, Hine, & Altman, 1973). A specifikus agyterületek frakcionált röntgen besugárzásával létrehozott szelektív és nagymértékű DG szemcsesejt csökkenés a hippocampus károsodás számos magatartási jelét is kiváltja (Bayer et al., 1973; Mickley & Ferguson, 1989). A neonatális röntgen besugárzás hatása azonban alapvetően különbözik a felnőtt állatokon kolhicinnel vagy adrenalektómiával kiváltott szelektív DG károsítás hatásától, mert az előbbi a DG szemcsesejtek és a kapcsolódó hálózatok kialakulását gátolja, míg az utóbbi a már kialakult DG struktúrát roncsolja.

## **A hippocampus elektromos aktivitása**

A hippocampusból elvezethető elektromos aktivitási minták, oscillációk, ismertetését leggyakrabban Cornelius H. Vanderwolf nevének említésével kezdik. Vanderwolf az 1960-as évek közepétől vezetett el magatartással korreláltatott lokális EEG aktivitást szabadon mozgó patkányok hippocampus-ából, és három jól elkülöníthető állapotot írt le: a ritmikus lassú aktivitást (*RSA* ill. „theta” ritmus) az akaratlagos mozgások pl. lokomóció, ágaskodás alatt; a nagy amplitúdójú irreguláris aktivitást (*LIA*) az immobilitás (pl. „freezing”) vagy ivás alatt; és a kis amplitúdójú irreguláris aktivitás (*SIA*) állapotát pl. hirtelen ébredést követően (C.H. Vanderwolf, 1969). Vanderwolf ebben az 1969-es cikkében is igazából a „theta”

ritmusra fókuszál és már a bevezetőben a hippocampus elektromos aktivitásával kapcsolatban, saját theta-val kapcsolatos patkány megfigyeléseit (C. H. Vanderwolf & Heron, 1964) a Grastyán Endre által javasolt hipotézisekkel, konkrétan az orientációs reflex (Grastyán, Lissák, Madarasz, & Donhoffer, 1959) és a megközelítési magatartás (Grastyán, Karmos, Vereczkey, & Kellenyi, 1966), szemben tételezi.

## A „theta” aktivitás

Grastyán Endre MTA doktori értekezéséből (1973) is tudhatjuk, hogy hippocampális theta aktivitást eredetileg Jung és Kornmüller fedezte fel, (Jung & Kornmüller, 1938) és ezt az aktivitást akut kísérletekben, főként nyulaknál Green és Arduini (Green & Arduini, 1954) vizsgálta szisztematikusan (Grastyán, 1973). Brian Bland (Bland, 2004) azonban a hippocampális theta aktivitás leírását még korábbra teszi, ui., Saul és Davis 1933-ban *“action currents”* néven már vezetett el ilyen elektromos aktivitást macskák hippocampusából különböző szenzoros ingerléseket követően, melynek maximális amplitúdója 500 mikrovolt volt, kb. 5 Hz frekvenciájú: *„which are very regular and have waves of very constant and definite shape”* (Saul, 1933). Jung és Kornmüller a perifériás idegek stimulációja során nyulak hippocampusából vezette el a theta aktivitást, Green és Arduini pedig három fajon is tanulmányozta ezt (Bland, 2004). Bár ezekben a korai vizsgálatokban nem vizsgálták a hippocampális theta aktivitás speciális funkcióját, Green és Arduini felvetették, hogy a theta ritmus esetlegesen az archicortex sajátos ébredési reakciója (*arousal*) lehet. Ezt a felvetésüket valószínűleg arra a tényre alapozták, hogy a hippocampális theta jelentkezésekor a neocortex gyakran mutatott határozott deszinkronizációt.

Patkánynál a hippocampális theta EEG aktivitáshoz köthető legjellemzőbb magatartási állapotok az állat mozgási és explorációs tevékenységéhez kapcsolódnak, pl.: járás, futás, úszás, ágaskodás, ugrás, explorációs fejmozgás, explorációs szimatolás és a REM alvás. A nyúlnál vagy macskánál a theta EEG aktivitás frekvenciája nem csak alacsonyabb (4 Hz körül van) mint a patkánynál, hanem ezekben az állatfajokban theta aktivitás sokkal kevésbé köthető a mozgáshoz: ilyen a mozdulatlan figyelemhez kapcsolt

theta a nyúlban és az aktív explorációs szemmozgások a macskában. Érdekes, hogy a denevérekben a theta aktivitás akkor jelentkezik, amikor lokomóció nélkül, echó lokalizációval explorálják a környezetüket. Ez a theta aktivitás nem folyamatos, hanem rövid intermittáló burst jellegű (Ulanovsky & Moss, 2007),

Emberben az idegsebészeti beavatkozások kapcsán váltak lehetővé a hippocampusból történő direkt mélyelektrodás elvezetések, és érdekes módon az emberi hippocampális theta 1-4 Hz frekvenciájának adódott (Jacobs, 2014). Amikor azonban szisztematikusan megvizsgálták az ilyen mélyelektrodás elvezetésekben a theta oszcillációkat a hippocampus teljes antero-poszterior hosszában, kiderült, hogy hippocampus anterior részén mérhető ez a lassabb kb. 3 Hz-es theta oszcilláció, melynek frekvenciája nem változik a virtuális valóságban (VR) történő navigáció során, míg a poszterior hippocampus területéről egy kb. 8 Hz-es theta oszcilláció vezethető el, melynek frekvenciája korrelál a VR mozgás sebességével, ami téri navigációban betöltött szerepére utalhat (Goyal et al., 2020).

### **Az atropin-rezisztens és atropin-szenzitív hippocampális theta ritmus**

Kramis, Vanderwolf és Bland 1975-ben vetették fel, hogy patkányban és nyúlban a hippocampusból két különböző típusú theta aktivitás vezethető el, melyek különböznek mind a magatartási, mind a farmakológiai tulajdonságaikban (Kramis, Vanderwolf, & Bland, 1975). Az egyes típusú (*type 1*) theta, atropin rezisztens, és a lokomóció és más akaratlagos mozgások ill. a REM alvás alatt figyelhető meg és mintegy 7–12 Hz frekvenciájú. A kettes típusú (*type 2*) theta, atropin szenzitív, és immobilitás vagy éter ill. uretán altatás alatt észlelhető 4–7 Hz frekvenciával, és ahogy a nevében is benne van, atropin adagolásával megszüntethető. Sok későbbi vizsgálat is megerősítette, hogy a hippocampális theta aktivitás két típusra osztható, bár az atropin-szenzitív (*type 2*) theta az éber patkányokban ritkán detektálható. Ez az atropin-szenzitív (4–7 Hz) theta viszont jól detektálható éber nyúlban és tengerimalacban ill. éber mozdulatlan patkányban például akkor, amikor egy ragadozó (macska, vadászgörény) is jelen van (Sainsbury, Heynen, & Montoya, 1987).

Az atropin-rezisztens (*type 1*) theta a lokomóció és más akaratlagos mozgások alatt jelenik meg, azonban nem kizárható, hogy az ilyen mozgások alatt az atropin-szenzitív (*type 2*) theta is jelen van, elsősorban azért, mert az atropin adagolása után a mozgás alatti (*type 1*) theta hullámok alakja némiképp megváltozott annak ellenére, hogy a theta frekvencia azonos maradt. Ugyanígy, amikor uretán altatás hatására eltűnik az akaratlagos mozgás, megszűnik az atropin-rezisztens (*type 1*) theta, és ez lehetővé teszi, hogy 4–7 Hz frekvenciával az atropin szenzitív (*type 2*) theta kerüljön az előtérbe (Kramis et al., 1975).

### **A nagy amplitúdójú irreguláris aktivitást (*LIA, sharp wave, „ripple”*)**

A *LIA* állapot egy rendezetlenebb, szélesebb spektrumú, de elsősorban az alacsonyabb frekvenciatartományokat érintő EEG állapot. A *LIA* állapotot jellemző magatartási állapotok: a lassú hullámú alvás és a mozdulatlan ébrenlét és a nem-explorációs-viselkedések (pl. evés, ivás, tisztálkodás). Ezt az EEG állapotot jellemzi a nagy amplitúdójú (akár 1 mV a hippocampus stratum radiatum-ában), 50-150 ms időtartamú szinkron idegi tevékenységet tükröző ún. éles-hullám (*sharp wave, SPW*) ami véletlenszerűen jelentkezik, de egy átlagosan kb. 1 s-os intervallummal (Buzsáki, 1986; S.S. Suzuki & Smith, 1987).

Eredetileg az éles-hullámokat Cornelius Vanderwolf figyelte meg a hippocampusban (C.H. Vanderwolf, 1969) az éles-hullámokhoz kapcsolódó, a CA1 piramis rétegében mérhető nagy frekvenciás 150-200 Hz körüli „*ripple*” oszcillációk leírása és képe pedig először John O’Keefe és Lynn Nadel híres könyvében jelenik meg 1978-ban „*a sinusoidal ripple consisting of 4-10 waves with periods of 4-8 ms (see Fig.14),”* hivatkozva „*Dostrovsky and O’Keefe, unpublished*” eredményeire (O’Keefe & Nadel, 1978). Később Shinya Suzuki és Grant Smith éles-hullámokkal foglalkozó cikksorozatukban használják O’Keefe és Nadelre hivatkozva a „*ripple*” kifejezést és részletesen bemutatják a jelenséget (S. S. Suzuki & Smith, 1988). A „*ripple*” oszcilláció a gátló interneuronok és a piramis sejtek (10-ből 1) populációs kisülését jelzi, ami valószínűleg a gátló interneuron hálózat szinkronizált *soma* régióban érvényesülő gátló posztszinaptikus potenciáljai és az apikális dendritekre érkező CA3 serkentő afferensek együttes működését tükrözi vissza.

## A hippocampális „hely-sejtek”

A hippocampális „hely-sejteket” vagy „*place* sejteket” O'Keefe és Dostrovsky írta le 1971-ben (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Ezen idegsejtek tüzelése bárki számára lenyűgöző, aki saját szemmel látta a jelenséget. Ez tipikusan akkor történik, amikor a hippocampus idegsejtjeinek extracelluláris akciós potenciálját monitorozzuk, és hang erősítéssel is követjük a sejtek tüzelését szabadon mozgó állatokon (Fox & Ranck, 1975). Amikor egy megfelelően tágas környezetben mozog az állat, bárki számára nyilvánvaló, hogy összefüggés van az állat egy adott területén történő áthaladása és a „hely-sejt” tüzelési frekvenciájának dramatikus megnövekedése között. Azt a területet, ahol a „hely-sejt” aktivitása megnő „tüzelési mezőnek” vagy „hely mezőnek” nevezzük. Az alaptüzelési frekvenciáról mely kevesebb mint 1 Hz (*spike/s*) a tüzelési frekvencia 100 Hz fölé is növekedhet, bár előfordulhat az is, hogy néhány a hely mezőn történő áthaladás esetén az idegsejt nem is tüzel. A „hely-sejtek” nagyon sokféle környezetben megfigyelhetők és az adott helyre történő „válaszuk” jól elkülönül az egyéb magatartások esetleges zavaró hatásától. Amikor random „*pellet chasing*” magatartási feladatba helyezzük az állatokat, szinte bármilyen téri környezetben találunk hippocampális „hely-sejteket” (R. Muller, 1996).

## Információkódolás kérdései a hippocampusban

Az agykutatás egyik központi problémája, az információkódolás kérdése, vagyis az, hogy agyunk hogyan képezi le az elsősorban a külső környezetünkből érkező (ránk zúduló) információkat. Az agyi információkódolás kérdése alapvetően két nézőpont felől közelíthető meg. Az egyik szerint az idegsejtek, mint az agy önálló, saját számítási kapacitással rendelkező egységei, axonjaikon keresztül diszkrét információcsomagokat küldözgetnek egymásnak. Ez az elgondolás az agyi információ-reprezentáció mibenlétével kapcsolatban a tüzelési rátára teszi a hangsúlyt (frekvencia kódolás). Ez a gondolkodási keret, a „frekvencia kód” modell, azt mondja, hogy egy adott input specifikus sajátosságai az adott neuroncsoport tüzelési rátájában (elosztottan) keresendők (Adrian & Zotterman, 1926; Barlow, 1972; Georgopoulos, Kalaska, Caminiti, & Massey, 1982; M.N. Shadlen &

Newsome, 1994; M. N. Shadlen & Newsome, 1998; Wilson & McNaughton, 1993). A másik megközelítés, inkább holisztikusabb elvek szerint, az idegsejtegyüttesek tüzelési mintázatából indul ki, nagyszámú idegsejt együttes működésére koncentrál és az egyes tüzelések időzítésére (idői kódolás). Az „idői kód” modell az egyes akciós potenciálok egymáshoz ill. a populációs ritmushoz való idői viszonyát emeli ki, és ezt tarja az információkódolás lényegének (Buzsáki, 1989; Buzsaki & Chrobak, 1995; de Ruyter van Steveninck, Lewen, Strong, Koberle, & Bialek, 1997; Gray & Singer, 1989; Hopfield, 1995; Konig, Engel, & Singer, 1996; Lisman & Idiart, 1995; O'Keefe & Recce, 1993; Riehle, Grun, Diesmann, & Aertsen, 1997; Skaggs, McNaughton, Wilson, & Barnes, 1996; Vaadia, Bergman, & Abeles, 1989). Ebben a nézőpontban különös hangsúlyt kap az idegsejt-hálózatok szinkron elektromos aktivitása, mely az agy régóta ismert ritmikus elektroencefalográfiai (EEG) aktivitásaiban jelenik meg.

Az idegsejtek magatartás függő kooperációjának megértéséhez elengedhetetlen az idegsejtek közötti szinaptikus kommunikáció szabályainak intakt agyban történő vizsgálata. A központi idegrendszerben az idegsejtek aktivitásának egymásra történő átadódása a szinaptikus átvitel (a szinaptikus transzmisszió) abban az értelemben nem túl hatékony, hogy egyetlen preszinaptikus akciós potenciál igen kis valószínűséggel süti ki a posztszinaptikus neuront. A posztszinaptikus neuron „kiszütéséhez” általában sokszoros szinaptikus input szükséges, ráadásul az egyes szinapszisok működése dinamikusan változik és pontosan ennek a dinamikának a változtatása jelenti a memóriaképződés szinaptikus alapjait. Ez alól az általános elv alól a perifériás érzékszervi információk thalamikus továbbítása jelenti, talán az egyetlen jól ismert kivételt, hisz a thalamikus relésejtek a perifériás afferens információt a lehető legpontosabb formában közvetítik az agykéreg felé. Ennek anatómiai alapját a perifériás afferens rostok óriási terminálisai jelentik, melyek nagyszámú serkentő szinapszist adnak a relésejtek proximális dendritjeire (Szentagothai, 1963). A relésejt szómájához közeli nagyszámú szinaptikus input biztosítja a szinaptikus transzmisszió megnövelt valószínűségét, vagyis a relésejt tüzelési mintázata hűségesen követi az afferens pálya aktivitását (Sherman & Guillery, 1998).

A piramis sejtek gátló interneuronokra történő információátadásának azonban valószínűleg más lehet a funkciója hisz az interneuronok inkább globálisan hatnak az adott

ideghálózat működésére (Freund & Buzsaki, 1996). Ezek a piramisajt interneuron szinapszisok *in vitro* nagyobb hatékonyságot és különböző rövidtávú dinamikát mutatnak, mint a kortikális piramis sejtek közötti szinapszisok (Gulyas et al., 1993). Az intakt agyban végzett korábbi kísérletek azonban, csak az interneuronok átlag viselkedésével és lokális EEG eseményekhez való kapcsolatával foglalkoztak (Buzsaki & Eidelberg, 1983; Buzsaki, Leung, & Vanderwolf, 1983; Fox, Wolfson, & Ranck, 1986; Skaggs et al., 1996; Ylinen, Bragin, et al., 1995; Ylinen, Soltesz, et al., 1995), nem vizsgálták a lehetséges piramis sejt – interneuron párokat *in vivo*.

A hippocampus kritikus szerepet játszik az epizodikus-deklaratív memória kialakulásában és konszolidálásában (Eichenbaum, 1999; Squire & Alvarez, 1995). Már korábban is felmerült, hogy az éber tapasztalás módosítja az idegsejt-együttesek tüzelési mintázatát a hippocampális hálózatban. Specifikusan, az éber exploráció során szerzett új „mintázatok” ismételten re-aktiválódtak az évs, immobilitás és lassú hullámú alvás (SWS) magatartási állapotok alatt, vagyis a tanult idegsejt reprezentációk mintegy konszolidálódnak (Buzsáki, 1989; Marr, 1971; McClelland, McNaughton, & O'Reilly, 1995).

Az általános vélekedés szerint az információ az ideghálózatokban legalább részben az egyes neuronok tüzelési frekvenciájában (is) reprezentálódik. Az éber agyban, az agykérgi neuronok tüzelési frekvenciájának változását a külső környezetből érkező változatos szenzoros input, vagy a mozgáshoz kapcsolódó re-afferenciációs szignálok váltják ki. Az alvás alatt azonban, ezek a szignálok nagyrészt hiányoznak, vagyis az idegsejtek tüzelését az ideghálózat belső dinamikája határozza meg. Vajon az agykérgi ideghálózatok ezen belső saját dinamikáját megváltoztathatja-e a külső szenzoros és belső motoros magatartási tapasztalás? Ha megváltoztathatja, akkor a hálózat funkcionális módosulásának „reflektálnia” kell a különböző hálózati állapotok során az egyes, hálózatban résztvevő neuronok hosszú-távú tüzelési frekvenciájának változásában (Turriano, 1999).

## A hippocampushoz kapcsolódó patológiás agyi folyamatok

Már H.M. esetének bemutatása kapcsán is előkerült az epilepszia betegsége, és valóban, a felnőttkori gyógyszer-rezisztens epilepsziák 60-70%-át a temporális lebeny epilepszia teszi ki, és a betegek többségének hippocampális szklerózisa is van (Janszky et al., 2005). Az ilyen gyógyszer-rezisztens temporális lebeny epilepsziás betegek esetén ma is gyakran csak a rezektív műtéti eljárás vezethet gyógyuláshoz. Ez a műtét a részleges elülső temporális lobectomia, melytől a műtött betegek 60-90%-a rohammentes lesz (Bóné, 2014).

Az epilepsziás aktivitás az idegsejtek szintjén az intracelluláris kalcium szint emelkedésével jár, amely mind patológiás, mind protektív változásokkal járhat a sejtekben lévő fehérjék szintjén (Ogita et al., 2005). A sejtmorfológia szintjén, mindez a jelentősen megnövekedett kalcium koncentráció a sejtek ultrastruktúrájának kompaktációjához is vezethet. Ezeket a sejteket nevezték tradicionálisan „sötét” idegsejteknek (Agardh, Kalimo, Olsson, & Siesjo, 1981; Czurko & Nishino, 1993; Gallyas, Farkas, & Mazlo, 2004; Gallyas, Zoltay, & Dames, 1992). Ezek a „sötét” idegsejtek a Gallyas-féle „sötét sejt” ezüstözéssel nagyon érzékenyen és szelektíven tehetőek láthatóvá (Gallyas, Guldner, Zoltay, & Wolff, 1990). A fokálisan induló és másodlagosan generalizálódó epilepsziás rohamokban résztvevő neuronhálózatokat a Gallyas-féle „sötét sejt” ezüstözéssel vizsgálva, ezek mikroszkópikus szinten láthatóvá tehetőek az állatkísérletekben.

Az Alzheimer-kór (*Alzheimer's disease*, AD) egy neurodegeneratív betegség, melyben a hippocampus az egyik legkorábban érintett agyi struktúra. Az AD eseteket leíró neuropatológiai diagnosztika háttérében lévő folyamatok azonban nem ismertek teljesen. Számos egymással is versengő hipotézis próbálja megmagyarázni az AD mögött álló neuropatológiai folyamatokat, ezek közül a két legmeghatározóbb hipotézis az amyloid béta hipotézis és a kolinerg hipotézis.

Az amyloid hipotézis újabb verziója szerint a diffúzibilis oligomer amyloid béta aggregátumok lehetnek a patológiai folyamat vezető faktorai, melyek már korán megváltoztatják a szinaptikus működést. Ezt az elképzelést támogatja egy recesszíven öröklődő familiáris AD forma is, az Osaka mutáció (Tomiyama et al., 2008). Ebben az esetben a mutáns amyloid prekursor fehérjéből (APP) olyan amyloid béta keletkezik,

melyből hiányzik a 22-es aminosav, a glutamát. Ez a mutáció azt a sajátos helyzetet eredményezi, hogy a mutáns amyloid béta gyorsabban oligomerizálódik, viszont nem képez fibrillumokat és így nem rakodik le az amyloid plakkokban (Tomiyama & Shimada, 2020). Mindez azt mutatja, hogy az amyloid béta oligomerizáció önmagában lehet az AD amyloid bétához kapcsolódó patofiziológiai folyamatainak kulcsa és nem az amyloid béta lerakódása.

Az utóbbi időben felmerült az AD és az epilepsziás rohamok patogenezisének hasonlósága is, ugyanis régóta ismert az AD és az epilepsziás betegség ko-morbiditása (Verret et al., 2012). Nem ismert azonban, hogy a különböző aggregátságú amyloid béta oligomerek hogyan befolyásolják az idegsejtek excitabilitását. Ez a kérdés oly módon vizsgálható, hogy a hippocampus területén mező potenciálokat mérünk *in vivo* a perforáns pálya ingerlésével és ezeken teszteljük az amyloid béta oligomer oldatok hatását, amelyeket *in vitro* különböző ideig aggregáltatunk.

Az AD mögött álló neuropatológiai folyamatokat magyarázó legkorábbi hipotézis, a kolinerg hipotézis, mely szerint a csökkent acetilkolin (ACh) szintézis állhat az AD tünetei mögött. A kolinerg hipotézis gyakorlatilag nagyrészt beigazolódott, amikor a centrálisan ható kolinészteráz enzim gátló szerek a klinikai vizsgálatokban javították az AD betegek tüneteit (Summers, Majovski, Marsh, Tachiki, & Kling, 1986). Mindemellett, a farmakológiai kutatásokban a szkopolamin (SCO) által kiváltott kognitív romlás, egy széleskörben használt teszté vált a lehetséges kognitív javító anyagok keresésében (Hegedus et al., 2015; Lenz et al., 2012; Snyder, Bednar, Cromer, & Maruff, 2005). Azonban a SCO ilyen szisztémás adása elég korlátozott prediktív erővel bír, nagyon sokszor fals pozitív eredmény mutat (Barak & Weiner, 2011; Sarter, 2006). Ennek egyik oka az lehet, hogy ez a szisztémásan adott antikolinerg szer olyan, nem specifikus magatartási hatásokat is okoz, főleg nagyobb dózisban, ami a perifériás mellékhatásokból is adódhat (Klinkenberg & Blokland, 2010).

Valójában ezt a modellt használva már a korai vizsgálatok alapján is vita alakult ki amiatt, hogy SCO metilbromid is jelentős „amnestikus” hatást váltott ki, pedig ez a SCO amin analóg vegyülete nem megy át a vér-agy gáton (Andrews, Grutzner, & Stephens, 1992; Buccafusco, 2009; Buxton, Callan, Blatt, Wong, & Fontana, 1994; Ruotsalainen,

Miettinen, MacDonald, Koivisto, & Sirvio, 2000). Mindezért fontosnak tűnik, hogy olyan objektív képalkotó eljárással is vizsgáljuk a SCO hatását kisállatokon, amely a klinikai vizsgálatok számára is hasznos „átranzformálható” információkat adhat.

## II. CÉLKITÚZÉSEK

Kísérleteink fő célja az volt, hogy nagyrészt éber, viselkedő állatokon történő különböző magatartási tesztekkel és elektrofiziológiai elvezetésekkel ill. agyi képalkotó és speciális szövettani eljárásokkal közelebb jussunk a hippocampus ideghálózati működésének megértéséhez, néhány hozzá kapcsolódó patológiás agyi folyamat tükrében is.

Kutatásaink során az alábbi konkrét kérdésekre kerestünk választ:

Az egyes kérdések után zárójelben szereplő számok az irodalomjegyzékben megtalálható saját közleményekre utalnak.

**Okoz e súlyos téri tájékozódási deficitet a Morris féle vízilabirintus tesztben a neonatális patkányok egyszeri nagydózisú agyi röntgen besugárzása? (1)**

**Vizsgálható-e a „futókerék feladat” (*wheel running*) alatt a hippocampális piramissejtek aktiválódása? (2)**

**Elkülöníthetők-e a piramissejtek és az interneuronok, csupán fiziológiai jellegzetességeik alapján a hippocampális extracelluláris mikroelektrodás elvezetésekben? (3-10)**

**Vizsgálható-e a piramissejt – interneuron szinaptikus kapcsolat a keresztkorrelációs módszer alkalmazásával, viselkedő állatokon? (3)**

**Észlelhető-e a téri topográfia ill. a magatartási állapotok hatása a „futókerék feladat” alatt megjelenő sejtpárokon, mint funkcionális klasztereken? (4)**

**Vizsgálható-e a hippocampális piramissejtek „futókerék feladat” alatti kódolása: tüzelési-frekvencia-ráta kód ill. idői theta-fázis kód? (5)**

**Előre jelzi-e a hippocampális piramissejtek tüzelési dinamikája az adott akciók potenciál theta-fázishoz kapcsolódó „fázis-változását”? (6)**

**Tipizálhatóak-e a hippocampális interneuronok lokális field oscillációik alapján? (7, 8)**

**Mutatnak-e valamiféle kapcsoltságot a téri tüzelésükben a hippocampális „hely-sejt” – interneuron párok? (9)**

**Változik-e a hippocampális neuronok tüzelési frekvenciája az egymást követő alvási periódusok alatt ill. az “újdság” éber tapasztalása kapcsán? (10)**

**Hogyan modellezhető a hippocampushoz kapcsolódó néhány patológiás agyi folyamat, *in vivo*? (11-14)**

### III. MÓDSZEREK

Az értekezésben bemutatott kísérletek részletes leírása a kapcsolódó publikációkban megtalálhatóak a megfelelő hivatkozásokkal együtt. Itt csak vázlatosan kerülnek ismertetésre az egyes alkalmazott módszerek.

#### **Állatok**

A kísérletek során általában felnőtt hím (300 –600 g) Sprague-Dawley, Long–Evans ill. Wistar patkányokat használtunk. A Morris féle vízi labirintus kísérletekben a Long–Evans csuklyás állatokat (Charles River Breeding Laboratories) a Pécsi Orvostudományi Egyetem állatházában tenyésztettük.

#### **Magatartási feladatok**

##### **Morris féle vízi labirintus teszt**

Az apparátus egy 2 méter átmérőjű 55 cm magas két medencéből állt mely 25 cm magas 20 °C fokos vízzel volt feltöltve. A láthatatlan platform egy 11 cm átmérőjű Plexiglas henger volt a víz felszíne alatt 1 cm-rel, az egyik kvadráns közepén (Exp, 1, 3 és 4) ill. az Exp. 2-ben egy hasonló, de látható platform. A nagy kísérleti helyiséget indirekt lámpafény világította meg, mely lehetővé tette a távoli vizuális kulcsingerek észlelését. A sötét kondícióban minden fényforrást elimináltunk, azonban a külső zajforrások (pl. számítógép hűtő ventilátora) jelenthettek hallható kulcsingereket.

Az állatok úszási útvonalának rögzítését egy, az állatok mellkasára erősített infravörös kibocsátású dióda segítségével végeztük, melyet egy infravörös érzékeny TV kamera detektált a medence felett 100 ms-os idői felbontással. A kísérleti helyiségben mindig csak egy kísérletező személy tartózkodott.

### **A *wheel running* magatartási feladat**

A *wheel running* a magatartási feladatban a szomjas állatok megtanulták, hogy víz jutalomért fussanak egy magatartásdoboz (30 x 40 x 35 cm) egyik oldalán elhelyezett futókerékben (29.5 cm átmérő, 10 cm széles). A futókerék tengelyéhez egy optikus enkódert csatlakoztattunk (HEDS 5500, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), mely a futási sebességet mérte. Egy előre meghatározott kerék-fordulatszám elérése után, hang szignál jelezte az állatoknak a víz jutalom „hozzáférhetőségét”, amelyre a patkány egyenesen az itatócsőhöz futott. Az itatócső az apparátus doboz részében helyezkedett el. A futókerékhez való visszatérés útvonala is meglehetősen sztereotip volt. Ebből adódóan a helyhez kapcsolódó sejtek egy-egy alcsoportja ismételten aktiválódott a futókerékben (“wheel-sejtek”) és/vagy a dobozban. A magatartásdoboz elülső oldala egy átlátszó üvegpanel volt, a futókerék pedig rozsdamentes acéldrót-hálóból készült így az állatok jól láthatták a szoba vizuális kulcsingereit a futókeréken ill. az üvegpanelen keresztül.

### **A *pellet chasing* magatartási feladat**

A pellet chasing magatartási feladatban az éhes állatok egy 76 cm átmérőjű henger alakú arénában tartózkodtak, ahova random elszórva 25 mg-os táp pellet-ek hullottak kb. 3 db / perc gyakorisággal. A szürke falú henger egyik oldalán 45°-nyi területen egy fehér ún. „kulcsinger kártya” volt felragasztva, ami a felül középen elhelyezkedő kamera képén 3:00 óránál látszott. Ebben a feladatban az állatok gyorsan megtanulják, hogy folyamatos mozgásban, az aréna teljes területét bejárva szedegessék össze a táp pelleteket. A henger alakú arénát egy 2 m átmérőjű fekete függöny vette körül mely vizuálisan izolálta a kísérleti állatokat a szoba egyéb vizuális kulcsingereitől.

### **A *chocolate chasing* magatartási feladat**

Ebben a feladatban a jóllakott állatokat egy 120 cm × 120 cm-es négyzet alapú, 50 cm magas oldalú fadobozba helyeztük és ennek bejárását random beszórt apró csokoládé

darabokkal segítettük. Az „újdonság” észlelését különböző új tárgyak (karton doboz, karton elválasztó fal, futókerék) behelyezésével biztosítottuk.

### **A feladatok előtti és utáni alvás szakaszok**

A futókerék feladatnál mind a feladat előtti, mind a feladat utáni alvás az állatok megszokott tartódobozában történt. A nagy négyzet alapú dobozban történő elvezetéseknel az állatok folyamatosan a dobozban tartózkodtak a nap folyamán, így az „újdonság” észlelését megelőző és azt követő alvási elvezetések is itt történtek.

### **Műtétek**

A kísérletek során felnőtt hím (300 –600 g) Sprague-Dawley ill. Long–Evans patkányokat használtunk. Az állatokat a műtétek során vagy injekciós keverékkel (ketamine (25 mg/ml), xylazine (1.3 mg/ml), acepromazine (0.25 mg/ml) keveréke 4 ml/kg dózisban) vagy inhalációs izoflurán vagy inhalációs halotán segítségével altattuk. Az állatokba 4-8 individuálisan mozgatható tetrode elektródot (Recce & O'Keefe, 1989) vagy silicon elektródot implantáltunk a hippocampus CA1 régiója fölé, melyek között a távolság kb. 300 mikrométer volt (Csicsvari, Hirase, Czurkó, Mamiya, & Buzsáki, 1999). Az individuálisan mozgatható tetrode elektródáinkat 12 vagy 25  $\mu$ m-es szigetelt NiCr drótokból (H. P. Reid Company, Palm Coast, FL vagy Stablohm 675, California Fine Wire) készítettük el (Czurkó, Huxter, Li, Hangya, & Muller, 2011; Csicsvari et al., 1999). Két 50 mikrométer átmérőjű rozsdamentes drótot és csavart használtunk kétoldalt a cerebellum felett a földeléshez és referencia elektródként. Az elvezető elektródokat un. mikrodrive-okkal mozgattuk, melyek működési elve azonos volt a korábban Wilson & McNaughton által publikált mechanizmussal (Wilson & McNaughton, 1993).

A 4-AP kezelés esetén egy 1.5 mm átmérőjű lyukat fúrtunk az állatok koponyájába a jobb parieto-occipitalis kéreg felett. A dura mater óvatos eltávolítása után egy 4-AP kristályt (0.5 mg/kg) helyeztünk a kéreg felszínére. A koponyán lévő lyukat mesterséges fibrin szivaccsal

fedtük. Negyven perc múlva a lyukat fiziológiás sóoldattal kimostuk, csontviasszal fedtük és a megszüntettük a halotán altatást.

A hippocampális mező potenciálok kiváltásához a perforáns pályát ingereltük (AP:-8.3 L:4.8 V:3.4) (Andersen, Bliss, & Skrede, 1971) egy bipoláris ingerlő elektródával (bifilar stainless steel 316LVM, California Fine Wire, CA, USA). Az elvezető elektródát a ventralis hippocampus gyrus dentatus hilus területére (AP:-4.8 L:4.5 V:4.5) implantáltuk (bifilar stainless steel 316LVM, melyhez egy fused silica kapillárist erősítettünk, lásd később). Az elvezetések során az elektromos jeleket Neurofax EEG erősítővel (Nihon Kohden, Tokyo, Japan, band pass 0.2–3000 Hz, sensitivity: 300  $\mu$ V/mm) erősítettük. Az ingerléseket BioStim (SuperTech Inc, Pécs, Hungary) digitálisan szabályozott ingerlővel, négyzög-hullám pulzusokkal (0.1 ms hosszú) percenként végeztük. Az ingerlés erősségét a populációs Spike ( $\rho$ Spike) maximális amplitúdójának 50 %-ára állítottuk. Az elvezető elektróda optimális mélységének beállítása után 30 percet vártunk, hogy az agyszövet helyreálljon az implantálás során esetlegesen fellépő traumából. Ezután kezdtük felvenni a 30 perces kontroll adatokat.

A különböző aggregátságú A $\beta$  oldatok injektálásához egy ún. fused silica kapillárist (Fused Silica Capillary TSP075150, Optronis GmbH, Kehl, Germany) ragasztottunk az elvezető bipoláris elektródához úgy, hogy annak vége e felső elektród szintjéig ért. A beadott A $\beta$  oldatok mennyisége 1  $\mu$ l 200  $\mu$ M-os A $\beta$  oldat volt (0.2 nmol A $\beta$  per állat). A beadást egy mikroperfúziós pumpával (KD-Scientific 1001i, KD-Scientific Inc., Holliston, MA, USA) végeztük 0.03  $\mu$ l/perc beadási sebességgel, így az 1  $\mu$ l A $\beta$  oldat beadása kb. 30 percet vett igénybe.

## **Szisztémás kezeléssel kiváltott epilepsziás aktivitás**

Szisztémás injekcióval adott 4-AP (4-amionpyridine; Sigma-Aldrich, Hungary, 4.5-5 mg/kg, i.p.), pilocarpine (pilocarpine hydrochloride; Sigma-Aldrich, Hungary, 340-370 mg/kg, i.p.) ill. kainát (kainic acid, Sigma-Aldrich, Hungary, 10 mg/kg, s.c.) használatával is epilepsziás aktivitást váltottunk ki az éber állapotokban, mely kb. 10 perccel az injekció után jelentkezett.

## **Az epilepsziás aktivitás magatartási értékelése**

Az epilepsziás aktivitás magatartási megjelenését a Racine Skála szerint értékeltük (Racine, 1972), némi módosítással (Malhotra & Gupta, 1997; Medina-Ceja, Cordero-Romero, & Morales-Villagran, 2008). Specifikusan a 0. szint azt jelentette, hogy nem volt észlelhető magatartási epilepsziás jel. 1. szint: vagy magatartási leállást (mozdulatlanság) jelentett, felborzolt szőrrel, gyors lélegzéssel, nyálazással vagy hiperaktivitást, nyugtalansággal és bajuszrángásokkal; 2. szint: fej bólogatás, fej és szem clonus (myoclonusos rángások); 3. szint: mellső láb clonus (unilateralis vagy bilateralis láb clonus) vagy un. "wet dog shakes"; 4. szint: clonusos rohamok (mellső láb clonusos roham) vagy clonusos ágaskodás; 5. szint: generalizált clonusos epilepsziás roham eleséssel, kontrollálhatatlan ugrások és a későbbi fázisban atonia.

## **EEG elvezetések**

Az epilepsziás aktivitás EEG monitorozására 6 lyukat fúrtunk az állatok koponyájának felülethez közeli rétegébe a frontális, a szomatoszenzoros és a parieto-occipitális területekre bilaterálisan. Ezeket a lyukakat egy elektromosan vezető pasztával töltöttük ki, melybe egy rozsdamentes acél elektródot helyeztünk. Ily módon az elektródokat megfelelően rögzítettük a koponyához, de nem sértettük meg a dura matert, ami a később megnehezítette volna szövettani vizsgálatok értékelését. A referens elektród egy ezüst lemez elektród volt a bőr alatt, melynek a belső oldalát fogászati cementtel fedtük le. A hat elektródot és a hozzájuk forrasztott elektromos csatlakozót szintén fogászati cementtel fedtük le ill. rögzítettük, azokban az állatokban, amelyeknél fokális 4-AP kristály kezelést terveztünk. Ebben az esetben egy 2 mm átmérőjű, később eltávolítható rudat cementeztünk a 4-AP kristály kezelésnek megfelelő helyre.

Az EEG aktivitást egy Grass EEG 8B készülék segítségével vezettük el, 0.3 Hz és 70 Hz közötti szűréssel és 7  $\mu\text{V}/\text{mm}$ -es erősítéssel. Az EEG jeleket egy CED 1401 rendszer és SPIKE2 v2.1 program (CED, Cambridge, UK) segítségével digitalizáltuk 3000 Hz-es mintavételezéssel és

a 60 perc hosszú felvételeket rögzítettünk. A Fourier power spektrumokat (Power Spectral Density, PSD) a NeuroExplorer v.3.2 (Nex Technologies, MA, USA) programmal számoltuk ki.

A perforáns pálya ingerlésével kiváltott hippocampális mező potenciálokat Neurofax EEG erősítővel (Nihon Kohden, Tokyo, Japan, band pass 0.2–3000 Hz, sensitivity: 300  $\mu\text{V}/\text{mm}$ ) erősítettük. Az elektromos jeleket CED 1401micro (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK) A/D konverter segítségével digitalizáltuk, majd átlagoltuk Signal 1.9 szoftver segítségével.

## **Technológiai fejlesztések**

A viselkedő állatokon végzett elektrofiziológiai kísérletek egyik fontos sajátossága, hogy az elvezető drót mikroelektrodákat a kísérletek közben a regisztrálni kívánt idegsejtek közelében kell mozgatnunk. A mikroelektrodák ezen precíz mozgását az ún. microdrive-ok teszik lehetővé, melyeket sebészileg, az általában patkány, kísérleti alanyok koponyájához rögzítünk. Mivel a kereskedelmi forgalomban beszerezhető ilyen microdrive-ok igen drágák és a méretük is meglehetősen nagy, a világ vezető laboratóriumaiban is általában egyénileg készítik ezeket. Az ilyen microdrive-ok készítése egy megfelelő műhelyt és nagy technikai tudást igényel.

Hazai körülmények között a microdrive-ok készítésére egy teljesen új megközelítést, a nyomtatott áramköri (NYÁK vagy angolul PCB) lapok alkalmazását dolgoztuk ki. A PCB microdrive-ok lényege, hogy egy lekerekített fejű csavar fejét két PCB lap rögzíti vertikális irányban, az anyacsavar oldalsó körbefordulását pedig, az ún. PCB távtartó rudak akadályozzák meg. Így, a PCB-k közötti csavar csavarásával az anyacsavar mozog le és fel, melyhez az elvezető elektródák rögzíthetők (Szabó, Czurkó, et al., 2001).

A krónikus implantálásokra a PCB microdrive-ok mellett a Bristol Egyetemen MRC központjában kifejlesztett (Computer Aided Design & Machining; Bruno Rivard / Robert L. Muller) delrin mikrodriveokat is alkalmaztuk. A PCB microdrive-okat az évek során

felgyülemlett tapasztalatok ill. néhány külföldi kísérletes labor észrevételei alapján tovább is fejlesztettünk (Tóth, Petykó, Máthé, Szabó, & Czurkó, 2007).

A PCB microdrive technológiával és a szintén helyileg kifejlesztett, sokcsatornás előerősítők alkalmazásával sikerült egy új csatlakoztatási módot is kifejlesztenünk, amely lehetővé teszi nagyon kis helyen, igen sok elvezető csatorna csatlakoztatását (Szabó, Máthé, Tóth, Hernádi, & Czurkó, 2002). A megoldás lényege, hogy mikrocsatlakozók helyett a csatlakoztatni kívánt PCB-ken alakítunk ki két, identikus csatlakozási felszínt és ezek között egy úgynevezett szilikon inter-rubber létesít rugalmas elektromos összeköttetést. Az alkalmazott megoldás igen nagy jelentőségű, mivel világszerte, folyamatosan nő a viselkedő állatokon történő sokcsatornás elektrofiziológiai elvezetésekkel kapcsolatos érdeklődés, és a folyamatos technikai fejlődés mellett az egyik legnagyobb kihívás az egyre növekvő csatornaszám csatlakoztatása az állatok fején szűken rendelkezésre álló helyre.

A sokcsatornás előerősítők elektromos táppal történő ellátására egy galvanikusan izolált alacsony elektromos zajú tápegységet is kifejlesztettünk (Tóth, Máthé, Petykó, Szabó, & Czurkó, 2008), a megfelelő csatornák kiválasztásához pedig egy analóg input kiválasztó elektronikus kapcsolási eszközt (Szabó, Máthé, Tóth, & Czurkó, 2001), az egész rendszer tesztelésére pedig egy kis méretű, elemmel táplált az előerősítők bemenetére csatlakoztatható szignál generátort (Máthé, Tóth, Petykó, Szabó, & Czurkó, 2007).

## **Sokcsatornás elektrofiziológiai elvezetések**

Viselkedő állatokból több helyről párhuzamosan történő multiunit elvezetéseket végeztünk ún. tetródokkal, a hippocampus CA1 régiójából. A CA1 piramis sejtekkel együtt vezettük el a piramis rétegben lévő interneuronok aktivitását ill. a lokális EEG potenciálokat.

Az elvezetésekhez 16 ill. 32 csatornás előerősítőket használtunk (BAK Electronics, Germantown, MD) melyek a kábel mozgási artefakt-okat csökkentették. Erősítés és szűrés (10,000x; 1 Hz–5 kHz, Model 12–64 channels; Grass Instruments, Quincy, MA ill. units 10,000–50,000 x; 300 Hz – 6 kHz; EEG 5000x; 1 - 475 Hz, 32 channels, Neuralynx, Tucson,

AZ) után az extracelluláris elektrofiziológiai jeleket digitalizáltuk (12-bit ISC-16 vagy 16-bit, 10 vagy 20 kHz DATAMAX system; RC Electronics, Santa Barbara CA ill. 12-bit unit 30 kHz; EEG 5 kHz Cheetah system, Neuralynx, Tucson, AZ). A digitalizált elektrofiziológiai jeleket IBM PC kompatibilis számítógépeken rögzítettük.

## **Adattárolás**

A felvett sokcsatornás elektrofiziológiai adatokat AIX operációs rendszert futtató IBM RS-6000 számítógépre, LINUX operációs rendszer futtató PC számítógépre vagy HP-Unix operációs rendszert futtató HP workstation számítógépre transzferáltuk és 4 mm DAT vagy SONY V8 digital tapes mágnesszalagokon tároltuk.

## **Adatanalízis**

A sokcsatornás elektrofiziológiai adatokat offline analizáltuk. Az analízisre elsősorban custom-made C programnyelven írt (Csicsvári József) programokat használtunk melyek UNIX (LINUX) operációs rendszeren Xwindow környezetben futottak.

A folyamatosan felvett wide-band elektrofiziológiai jeleket digitálisan szűrtük (0.8–5 kHz), majd detektáltuk az extracelluláris akciós potenciálokat (spike-detektálás, (Bankman, Johnson, & Schneider, 1993)). Spike-detektálás után, a unitokat a spike amplitúdó és hullámforma alapján multidimenzionális grafikus klaszterezéssel („gclust”: custom-made Xwindow software, József Csicsvári) ill. automatikusan („KlustaKwik”: Kenneth D. Harris) identifikáltuk elsősorban a rekonstruált spike alak (40 kHz, (Press, Teukolsky, Vetterling, & Flannery, 2007)) principális komponensei alapján (PCA, (Csicsvari et al., 1999; Wilson & McNaughton, 1993)). A Neuralynx rendszerrel külön rögzített akciós potenciálok szétválasztására a Plexon cég grafikus klaszterező szoftverét is használtuk (Offline Sorter, Plexon, Dallas, TX).

Csak azok a unitok (single cell action potential) kerültek be az analízisbe, melyeknek megfelelő refrakteritása (<3 ms), jól definiált kluszter határai és tüzelési szintje (>0.02 Hz)

volt. Az adott tetrode ill. szilicon probe összes lehetséges sejt-párjáról keresztkorrelációs hisztogramokat készítettünk és a centrális bin-eknél szimmetrikus bemélyedéseket kerestünk (kommon refrakteritás) mely azt jelezte, hogy a kezdeti két klaszter ugyanannak a sejtnek az aktivitását reprezentálhatja (Fee, Mitra, & Kleinfeld, 1996), így ezeket a klasztereket összevontuk.

### **A theta EEG aktivitás és a unitok theta fázisának meghatározása**

A lokális field aktivitás meghatározására az eredeti wide-band adat file-okat újra mintavételeztük 1.25 kHz-en, az újra-mintavételezett file-okat pedig digitálisan szűrtük. A theta periódusokat a theta (5–10 Hz) és delta (2–4 Hz) frekvencia sávok Fourier komponenseinek hányadosával detektáltuk egy mozgó 1.6 másodperces Hamming ablakban 0.8 s átfedéssel. Amennyiben a theta–delta power hányados nagyobb volt mint 6, az EEG aktivitást theta-nak tekintettük. Ezután az individuális theta hullámokat identifikáltuk. Itt egy szélesebb digitális szűrési sávot választottunk a theta hullámok negatív csúcsainak minél pontosabb detektálására, empirikusan. A negatív theta csúcsokat a konkavitás keresésével detektáltuk, mert a hippocampus st. oriens és pyramidale rétegében a pozitív csúcsok nem voltak elég kifejezetek. Az egymást követő negatív csúcsok között eltelt idő definiálta a theta hullám periódus idejét. A theta ciklusokat normalizáltuk. A unitok és a theta aktivitás fázis viszonyát 15<sup>o</sup>-os pontossággal határoztuk meg a normalizált theta cikluson (15<sup>o</sup>-os bin méret).

A Neuralynx rendszerrel felvett hippocamalis EEG esetén az 5–12 Hz-es theta frekvencia tartományból detektáltuk lehetséges theta hullámokat és ezeket a szinusz hullámhoz korreláltattuk. Ebben az esetben a unit fázis viszonyokat 18<sup>o</sup>-os pontossággal határoztuk meg.

### **MRI mérések**

A funkcionális MRI mérések alatt az állatokat egyrészt izofluránnal (Forane, Abbot Laboratories) altattuk a korábban leírtaknak megfelelően (Nyitrai et al., 2018; Spisák et al.,

2017; Spisák et al., 2019). másrészt egy kombinált izoflurán- medetomidine altatásban (bolus medetomidine injekció (0.05 mg/kg i.p. dexdor, dexmedetomidine, Orion Pharma) plusz folyamatos alacsonyabb dózisu izoflurán).

Az MRI méréseket egy 9.4 T Varian (Agilent) Direct Drive MRI rendszeren (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, CA) végeztük, a rendszer paramétereit korábban részletesen leírtuk (Nyitrai et al., 2018; Spisák et al., 2017; Spisák et al., 2019).

A funkcionális MRI mérések regisztrálásához anatómiai képeket is készítettünk (proton density (PD) weighted gradient-echo multi-slice imaging (GEMS)) horizontális orientációban és/vagy (T2 weighted fast spin-echo multi-slice imaging (FSEMS)) axiális orientációban.

A funkcionális MRI BOLD méréseihez EPI (Echo Planar Imaging) szekvenciákat használtunk (GE EPI (Gradient-echo EPI): TR/TE = 1000 ms/10 ms, FA: 90°) és SE EPI (Spin-echo EPI): TR/TE = 1000 ms/40 ms, FA: 90°). A több szeletes ASL (arterial spin labeling) méréseket egy FAIR-ASL (flow-sensitive alternating inversion recovery (TR/TE = 3.6 s/18 ms, matrix: 64 × 64, slice thickness: 2 mm, 9 axial slices)) szekvenciával végeztük (Nasrallah, Lee, & Chuang, 2012). A funkcionális MRI alatti bajusz ingerléseket a korábbiakban leírtaknak megfelelően végeztük block-design-ban (Nyitrai et al., 2018; Spisák et al., 2017; Spisák et al., 2019).

Az MRI adatok analízisét több szintű feldolgozási folyamatban végeztük az FSL (Jenkinson, Beckmann, Behrens, Woolrich, & Smith, 2012) analízáló program környezet segítségével a korábbiakban részletesen leírtaknak megfelelően (Nyitrai et al., 2018; Spisák et al., 2017; Spisák et al., 2019).

## **Szövetani módszerek**

A kísérletek végeztével az állatokat pentobarbitállal túlaltattuk és intrakardiálisan perfundáltuk foszfát pufferrel és 4%-os paraformaldehiddel. A agyakat fagyasztó mikrotómon metszettük 60 µm-es metszetekre és valamelyik Gallyas féle ezüstözési

módszert végeztük el rajtuk (Gallyas, Hsu, & Buzsaki, 1993), vagy paraffin blokkokból készítettünk sorozat metszeteket melyeket krezil violával festettünk.

### Gallyas-féle „sötét sejt” ezüstözés

A metszeteket 16 órán keresztül inkubáltuk 56C<sup>o</sup>-on észterifikáló oldatban (1-propanol és 1,2% kénsav). A metszeteket ezután 1%-os ecetsavas oldatban 5 percig előkezeltük, majd szilikowolframsavas előhívó oldattal sárgásbarnává festettük őket (Gallyas et al., 1990; Gallyas et al., 1993). Az előhívást 1%-os ecetsav oldattal állítottuk le.

## IV. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A gyrus dentatus (DG) szemcsesejtjeinek veszteségét okozó neonatális röntgen besugárzás után vizsgáltuk a felnőtt állatok téri tájékozódását. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy az első posztnatális napon alkalmazott magas dózísú röntgen besugárzás nagymértékú DG szemcsesejt veszteséget okozott (60-80 %-os csökkenés) és a felnőtt állatok súlyos zavart mutattak a Morris-féle vízi labirintus tesztben. A besugárzott állatok nem voltak képesek megtanulni a láthatatlan platform helyét, csak a medence fala mellett úsztak ill. a tréning vége felé is csak véletlenszerűen úsztak be a medence közepére. Mivel a besugárzott állatok a látható platformot sem találták meg, megállapítottuk, hogy a besugárzás valószínűleg súlyos látási károsodást is okozott, mely befolyásolta a téri tájékozódási teljesítményt. Ezért teljes sötétségben is megvizsgáltuk a kontroll és besugárzott állatok téri tájékozódását. Az új csoport naiv kontroll állatok fokozatosan megtanulták, hogy a platformot a medence belső részén kell keresniük, míg az új csoport besugárzott állat tanulása csak lassú és marginális volt. Mindez azt mutatta, hogy a besugárzott állatok súlyos téri tájékozódási deficitje nem csak a

látáskárosodás következménye, mivel a besugárzott állatok a teljes sötétségben is rosszabbul teljesítettek. Meghatároztuk az allocentrikus ill. az egocentrikus memória relatív szerepét is a besugárzott állatok téri tájékozódási zavarában. Megállapítottuk, hogy a besugárzott állatok nagyrészt vagy kizárólag az egocentrikus navigációt használhatták az átlagosan rosszabb teljesítményük során. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy DG szemcsesejtek kialakulásának meggátlása a neonatális patkányok agyi röntgen besugárzásával ugyanolyan súlyos téri tájékozódási zavart idéz elő, mint a DG szemcsesejtek felnőttkori eltávolítása, vagyis a hippocampus ideghálózatának plasztikus változása nem kompenzálja a DG szemcsesejtek elvesztését.

2. A „futókerék feladat” (*wheel running*) alatt vizsgáltuk a hippocampális piramissejtek aktiválódását. A hippocampális CA1 piramis sejtek folyamatosan fenntartották tüzelésüket a futókerékben, ahol a térben elfoglalt helyzetük konstans volt („*space clamp*”), és a theta aktivitás is jelen volt. A „wheel-sejtek” aktivitását mind a lokális, mind a távolabbi kulcsingerek (cue-k) befolyásolták. A sejtek tüzelési frekvenciája a mozgás sebességének függvényében változott annak ellenére, hogy a theta oszcilláció frekvenciája állandó maradt.
3. Viselkedő állatokon a piramissejt – interneuron szinaptikus kapcsolat működését vizsgáltuk a keresztkorrelációs módszer segítségével. A monoszinaptikus latencia időnél (átlagos latencia 1.56 ms) szignifikáns csúcsot mutató piramissejt – interneuron pároknál a spike transzmisszió átlagos valószínűsége a feltételezett preszinaptikus piramissejtről a posztzinaptikus interneuronra 12% volt. A piramissejtek burst kisülései hatékonyabbak voltak az interneuronok „kisütésében”, mint az ún. single spike-ok. A szinaptikus transzmisszió a hálózat magatartási állapotától is függött, és a téri topográfia (távolság) is befolyásolta a piramissejtek és interneuronok kapcsoltságát.
4. A „futókerék feladat” (*wheel running*) alatt is megvizsgáltuk a sejt párokat, mint funkcionális klasztereket. A keresztkorrelációs módszer segítségével egy nagyobb

időablakban vizsgáltuk a lokális és távoli piramisajt párokat ill. piramisajt-interneuron párokat a theta ill. non-theta EEG hálózati aktivitás alatt. Megállapítottuk, hogy mind a téri topográfia, mind az EEG állapotok hatása észlelhető. A theta állapot alatt észlelt szignifikánsan magasabb lokális piramisajt-interneuron pár spike keresztkorreláció a távoli párokhoz képest a piramisajt-interneuron párok, magatartási állapot függő spike transzmissziós valószínűségével magyarázható.

5. A „futókerék feladat” (*wheel running*) alatt a hippocampális piramisajtek információkódolást (frekvenciaráta kód, ill. idői theta-fázis kód) is vizsgáltuk. A futási sebesség függvényében elkülönült a tüzelési ráta növekedése a tüzelési fázis stabil voltától, azonban a wheel-sejtek többsége relatív alacsony frekvenciával tüzelt. Az alacsony tüzelési frekvenciáknál úgy is növelhető a tüzelési ráta, hogy az egymás utáni theta hullámokhoz adódik hozzá mindig egy-egy akciós potenciál. Ahhoz, hogy több spike is legyen egy adott theta ciklusban, átlagosan a theta frekvenciánál magasabb tüzelési rátát kell az idegsejt tüzelésének elérnie. Amikor a tüzelési ráta meghaladta a 11 Hz-et néhány „wheel-sejt” esetén a tüzelés theta fáziseltolódása, úgy tűnt, elkezdett megjelenni.
6. A hippocampális piramisajtek tüzelési dinamikáját is megvizsgáltuk a „futókerék feladat” (*wheel running*) és egyéb (*linear track*, *open field* és REM alvás) magatartások alatt. A hippocampális piramisajtek akciós potenciáljainak theta ritmushoz viszonyított időzítése korrelált a pillanatnyi tüzelési frekvenciával mind a téri, mind a nem-téri magatartások alatt és az ún. „*phase precession*” hatást is láttuk, ha a tüzelési ráta meghaladta az egy per theta ciklus értéket. Mindez megerősíti azt a hipotézist, hogy a fázis moduláció a ritmikus szomatikus gátlás és a dentritikus excitáció interferencia hatásaként alakulhat ki (szoma-dentritikus interferencia modell).
7. Megvizsgáltuk a hippocampális interneuronok lokális field oszcillációk alapján történő tipizálhatóságát. A vizsgált interneuronok többsége határozott theta fázis

preferenciát mutatott a theta hullámok negatív fázisához. A piramis sejtek populációs aktivitásának csúcsához képest, mely a theta hullámok negatív csúcsánál volt, az int (p) és int(a/o) interneuronok egy korábbi theta fázisban tüzeltek, a piramis sejtekhez képest mintegy 60 (int (p)) ill. 40 (int(a/o)) fokkal korábbi theta fázisban. Az interneuronok aktivitása a SPW / ripple oszcillációk alatt heterogénebb mintázatot mutatott (*single peak, double peaks, anti-SPW, SPW-independent, biphasic*). A hippocampális interneuronok szabadon mozgó patkányokon ún. „*pellet chasing*” feladatot alatti theta aktivitás szerinti formalizált elkülönítése (oszcillációs score) két nagyobb csoportot, egy theta-independens és egy theta-modulált interneuron csoportot eredményezett. A theta-independens csoportba tartozhattak a korábban megfigyelt ún. „*bursty*” interneuronok, a theta-modulált interneuronok pedig a preferált theta fázisaik alapján 4 alcsoportra oszlottak. Ezek a theta fázis kapcsolt alcsoportok csak részben estek össze a lassabb, urethane theta alatt klasszifikált és később anatómiailag is azonosított interneuronokkal.

8. Az ún. „*pellet chasing*” magatartási feladat kapcsán az interneuronok és „hely-sejtek” téri korrelációit is megvizsgáltuk. Az egyidejűleg elvezetett „hely-sejt” interneuron párok között mind pozitív, mind negatív téri korrelációkat is találtunk. A negatív téri korrelációk a vizsgált idegsejtpárok aktivitásának komplementer tüzelési térképét mutatták még akkor is, amikor az idői keresztkorrelációjuk serkentő monoszinaptikus kapcsolatot mutatott. A pozitív téri korrelációt mutató „hely-sejt” - interneuron párok esetén is találtunk a keresztkorrelációs hisztogramban a feltételezett monoszinaptikus kapcsolatra jellemző csúcst, azonban olyanokat is, melyeknél hiányzott a rövid latenciájú feltételezett monoszinaptikus excitáció. Mindezek alapján az interneuronok hely-specifikus tüzelésváltozása nem egyszerűen a piramissejtről érkező serkentő input következménye. Mivel egyes „hely-sejtek” szelektíven az interneuronok alacsonyabb tüzelési rátájú régióiban tüzeltek, feltételezhetjük, hogy a „hely-sejtek” aktivitását az interneuronok aktivitásának csökkenése is meghatározhatja.

9. A hippocampális piramis sejtek tüzelési aktivitásának változásait is vizsgáltuk az éber és alvási magatartási állapot alatt. Eredmények szerint az "ismerős" környezetben (sztereotip „*wheel running*” feladat, nap mint nap ismételt) a szimultán elvezetett individuális CA1 piramis sejtek tüzelési frekvenciája és a sejt párok ko-aktivációja nagymértékben korrelált maradt az alvás-ébrenlét-alvás szekvenciák során. Az állatokat egy új környezeti szituációba helyezve, az "újdonság" hatására a piramis sejtek egy másik csoportja aktiválódott. A piramis sejtek tüzelési rátáinak összehasonlítása az "újdonság előtti" és "újdonság utáni" alvások között már nem mutatott korrelációt, a sejtek tüzelési rátája az új környezeti szituációban azonban még mindig korrelált mind az "újdonság előtti", mind az "újdonság utáni" alvással. Az egész piramis sejt populációra vonatkoztatott tüzelési frekvenciák nagy átlaga állandó maradt a különböző magatartási állapotok és vizsgálati kondíciók során, ami azt sugallja, hogy az egyes idegsejtek hosszú-távú tüzelési mintázata megváltozhat a tapasztalás során, de a hippocampális ideghálózat átlagos ingerlékenysége / tüzelése nem változott.
10. A fokális kortikális epilepsziás roham generalizálódását követtük magatartási, elektrofiziológiai és morfológiai módszerekkel. Eredményeink azt mutatták, hogy a fokális epilepsziás rohamok generalizálódásával párhuzamosan „sötét idegsejtek” jelentek meg a hippocampusban és a *pontis reticularis* magjaiban. Azokban az állatokban, amelyek folyamatosan *status epilepticus*-ban voltak, jelentős mennyiségű „sötét idegsejtet” találtunk a *pontis reticularis* magjaiban. Ezeknél az állatoknál generalizált alacsony frekvenciájú (1 és 2 Hz) EEG aktivitás volt mérhető, ami a hídi *formatio reticularis* aktiváló funkciójának kiesésére utalhat. Később bizonyítottuk, hogy a *status epilepticus* kiváltási módjától függetlenül „sötét idegsejtek” jelennek meg a hídi *formatio reticularis* területén, generalizált alacsony frekvenciájú EEG aktivitással együtt.
11. A különböző aggregátságú amyloid-beta (A $\beta$ ) oligomerek hatását is vizsgáltuk a hippocampusban kiváltott mező potenciálok populációs spike-jaira *in vivo*. Mind az uretánnal altatott, mind az éber állatokban a 24 óráig aggregáltatott A $\beta$  oligomer

oldat megnövelte, míg a 72 óráig aggregáltatott A $\beta$  oligomer oldat lecsökkentette a perforáns pálya ingerlésével kiváltott populációs válasz spike komponensének amplitúdóját. Ezen eredmények összecsenghetnek avval a jól ismert klinikai ténnyel, hogy komorbiditás van az Alzheimer-kór és az epilepsziás betegség között.

12. A szkopolamin (SCO) által kiváltott kognitív „rontás” mibenlétét is modelleztük preklinikai funkcionális MRI segítségével. Különböző altatási metodikákat, MRI felvételekhez kapcsolódó beállítási paramétereket (szekvenciák) és SCO dózisokat ill. a csak perifériásan ható butylscopolamint (BSCO) vizsgáltuk, hogy közelebb juthassunk a SCO által kiváltott „rontás” mélyebb megértéséhez. A bajuszingerléssel kiváltott funkcionális MRI (BOLD) válaszokat ún. „cross-over design”-ban mértük. Izoflurán altatásban a GE EPI szekvenciával a SCO csökkentette a kiváltott BOLD aktivációt a barrel kéregben (BC), míg a BSCO növelte a cinguláris kéregben. A medetomidine-izoflurán kombinált altatásban a SCO csökkentette a kiváltott BOLD aktivációt a BC-ben és az inferior colliculus (IC)-ban, míg a BSCO csak az IC-ben csökkentette. Eredményeink szerint a SCO BC-ben kiváltott BOLD aktivációt csökkentő hatása valószínűleg egy centrális hatás, míg az IC-ben kiváltott BOLD aktivációt csökkentő hatása valószínűleg egy perifériás hatás.

## V. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatói pályám elindításáért, mely a Pécsi Orvostudományi Egyetem Élettani Intézetében indult, elsősorban Lénárd László professzor úrnak szeretnék köszönetet mondani. A hippocampus anatómiájával történő közelebbi megismerkedésemért Seress László professzornak köszönhetem, és az Ő laboratóriumával történő kollaboráció kapcsán tölthettem mintegy két hónapot Dr. Jan Bures laboratóriumában is. A viselkedő állatokból hippocampuszából történő sokcsatornás elektrofiziológiai elvezetések módszerének elsajátítására Buzsáki György professzor laboratóriumában töltött posztdoktori éveim során kaptam lehetőséget. Neki és Szabó Imre professzornak köszönhetem az

elektrofiziológiai elvezetési technikákról és a hippocampus működéséről történő tudományos gondolkodásom kialakítását. A hippocampális „hely-sejtek” jól kontrollált elvezetését Prof. Robert (Bob) Muller bristoli (University of Bristol, UK) laboratóriumában sajátíthattam el. Ő sajnos már elhunyt, ahogy idősebb Prof. Gallyas Ferenc is, akitől a „sötét sejtek” ezüstözésének nagyon érzékeny módszerének alkalmazását tanultam.

Külön köszönöm az PTE ÁOK Magatartástudományi Intézet volt vezetőjének, Szabó Imre emeritus professzor úrnak és az egykori és mostani munkatársaknak, hogy a kutatói és oktatói munkámat támogatták, valamint Dr. Juhász Gábornak az MTA-ELTE Neurobiológiai Kutatócsoport volt vezetőjének és akkori kollegáimnak, hogy a hippocampus neuropathológiájával kapcsolatos kutatásokat is folytathattunk. Ugyanígy köszönöm, a Richter Gedeon Nyrt. Farmakológiai és Gyógyszerbiztonsági Kutatási Főosztály, Preklinikai képző, illetve EEG laboratórium volt és jelenlegi munkatársainak a közös munkát. Konkrétan hálásan köszönöm a fentebb említett laborokban az egykori és mostani munkatársaimnak - Csicsvári Józsefnek, Czéh Boldizsárnak, Hajime Hirasenek, Kenneth Harrisnek, John Huxternek, Li Yunak, Hangya Balásznak, Baracska Péternek, Orbán Gergelynek, Kékesi Katalinnak, Spisák Tamásnak, Nyitrai Gabriellának, Hlatky Dávidnak, Spisák Zsófiának és Somogyi Gergelynek - , hogy tudásukkal és munkájukkal nagymértékben hozzájárultak kutatási eredményeink létrejöttéhez.

A disszertáció véleményezését köszönöm Dr. Juhász Gábornak, Buzsáki György, Csicsvári József, Lénárd László, Seress László professzoroknak, valamint Dr. Kékesi Katalinnak és Dr. Papp Editnek. Szeretném Dr. Kékesi Katalinnak és Dr. Papp Editnek külön is megköszönni a segítségét az elütések, helytelen megfogalmazások javításában.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni a családomnak: feleségemnek, hogy mindig mellettem áll, és gyermekeinknek a rengeteg szeretetet és támogatást.

## VI. IRODALOM

### VI/1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. **Czurkó A**, Czéh B, Seress L, Nadel L, Bures J. Severe spatial navigation deficit in the Morris water maze after single high dose of neonatal x-ray irradiation in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2766-71. PubMed PMID: 9122269; PubMed Central PMCID: PMC20165.
2. **Czurkó A**, Hirase H, Csicsvari J, Buzsáki G. Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur J Neurosci*. 1999 Jan;11(1):344-52. PubMed PMID: 9987037.
3. Csicsvari J, Hirase H, **Czurkó A**, Buzsáki G. Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron*. 1998 Jul;21(1):179-89. PubMed PMID: 9697862.
4. Hirase H, Leinekugel X, Csicsvari J, **Czurkó A**, Buzsáki G. Behavior-dependent states of the hippocampal network affect functional clustering of neurons. *J Neurosci*. 2001 May 15;21(10):RC145. PubMed PMID: 11319243.
5. Hirase H, **Czurkó A**, Csicsvari J, Buzsáki G. Firing rate and theta-phase coding by hippocampal pyramidal neurons during 'space clamping'. *Eur J Neurosci*. 1999 Dec;11(12):4373-80. PubMed PMID: 10594664.
6. Harris KD, Henze DA, Hirase H, Leinekugel X, Dragoi G, **Czurkó A**, Buzsáki G. Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):738-41. PubMed PMID: 12066184.
7. Csicsvari J, Hirase H, **Czurkó A**, Mamiya A, Buzsáki G. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J Neurosci*. 1999 Jan 1;19(1):274-87. PubMed PMID: 9870957.
8. **Czurkó A**, Huxter J, Li Y, Hangya B, Muller RU. Theta Phase Classification of Interneurons in the Hippocampal Formation of Freely Moving Rats. *J Neurosci*. 2011 Feb 23;31(8):2938-2947. PubMed PMID: 21414915.

9. Hangya B, Li Y, Muller RU, **Czurkó A**. Complementary spatial firing in place cell-interneuron pairs. *J Physiol*. 2010 Nov 1;588(Pt 21):4165-75. PubMed PMID: 20819942; PubMed Central PMCID: PMC3002448.
10. Hirase H, Leinekugel X, **Czurkó A**, Csicsvari J, Buzsáki G. Firing rates of hippocampal neurons are preserved during subsequent sleep episodes and modified by novel awake experience. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9386-90. Epub 2001 Jul 24. PubMed PMID: 11470910; PubMed Central PMCID: PMC55430.
11. Baracskaý P, Szepesi Z, Orbán G, Juhász G, **Czurkó A**. Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Res*. 2008 Sep 4;1228:217-28. Epub 2008 Jun 21. PubMed PMID: 18602900.
12. Baracskaý P, Kiglics V, Kékesi KA, Juhász G, **Czurkó A**. Status epilepticus affects the gigantocellular network of the pontine reticular formation. *BMC Neurosci*. 2009 Nov 13;10:133. PubMed PMID: 19912649; PubMed Central PMCID: PMC2781816.
13. Orbán G, Völgyi K, Juhász G, Penke B, Kékesi KA, Kardos J, **Czurkó A**. Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats. *Brain Res*. 2010 Oct 1;1354:227-35. Epub 2010 Jul 24. PMID: 20659435.
14. Somogyi G, Hlatky D, Spisák T, Spisák Z, Nyitrai G, **Czurkó A**. Deciphering the scopolamine challenge rat model by preclinical functional MRI. *Sci Rep*. 2021 May 25;11(1):10873 PMID: 34035328; PMCID: PMC8149883.

## VI/2. Egyéb az *in vivo* multielektródás elektrofiziológiai metodikához kapcsolódó saját közlemények

1. Csicsvari J, Hirase H, **Czurkó A**, Mamiya A, Buzsáki G. Fast network oscillations in the hippocampal CA1 region of the behaving rat. *J Neurosci*. 1999 Aug 15;19(16):RC20. PubMed PMID: 10436076.
2. Nádasdy Z, Hirase H, **Czurkó A**, Csicsvari J, Buzsáki G. Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *J Neurosci*. 1999 Nov 1;19(21):9497-507. PubMed PMID: 10531452.
3. Szabó I, **Czurkó A**, Csicsvari J, Hirase H, Leinekugel X, Buzsáki G. The application of printed circuit board technology for fabrication of multi-channel micro-drives. *J Neurosci Methods*. 2001 Jan 30;105(1):105-10. PubMed PMID: 11166371.
4. Szabó I, Máthé K, Tóth A, **Czurkó A**. The application of cross-point switch arrays as input selector switch devices for multi-channel electrophysiological experiments. *J Neurosci Methods*. 2001 Oct 15;111(1):75-81. doi: 10.1016/s0165-0270(01)00446-0. PMID: 11574122.
5. Szabó I, Máthé K, Tóth A, Hernádi I, **Czurkó A**. The application of elastomeric connector for multi-channel electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods*. 2002 Feb 15;114(1):73-9. doi: 10.1016/s0165-0270(01)00515-5. PMID: 11850041.
6. Tóth A, Petykó Z, Máthé K, Szabó I, **Czurkó A**. Improved version of the printed circuit board (PCB) modular multi-channel microdrive for extracellular electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods*. 2007 Jan 15;159(1):51-6. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.06.014. PMID: 16890295.
7. Máthé K, Tóth A, Petykó Z, Szabó I, **Czurkó A**. Implementation of a miniature sized, battery powered electrophysiological signal-generator for testing multi-channel recording equipments. *J Neurosci Methods*. 2007 Sep 15;165(1):1-8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.017. PMID: 17624440.
8. Tóth A, Máthé K, Petykó Z, Szabó I, **Czurkó A**. Implementation of a galvanically isolated low-noise power supply board for multi-channel headstage preamplifiers. *J Neurosci Methods*. 2008 Jun 15;171(1):13-8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.029. PMID: 18372046.

### VI/3. Egyéb a doktori fokozat óta megjelent saját közlemények

1. Gallyas F, Kiglics V, Baracska P, Juhász G, **Czurkó A**. The mode of death of epilepsy-induced "dark" neurons is neither necrosis nor apoptosis: an electron-microscopic study. *Brain Res*. 2008 Nov 6;1239:207-15. Epub 2008 Sep 4. PubMed PMID: 18801347.
2. Kovács Z, **Czurkó A**, Kékesi KA, Juhász G. Clomipramine increases the incidence and duration of spike-wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. *Epilepsy Res*. 2010 Jun;90(1-2):167-70. Epub 2010 Mar 17. PubMed PMID: 20299188.
3. Takács E, Nyilas R, Szepesi Z, Baracska P, Karlsen B, Røsvold T, Bjørkum AA, **Czurkó A**, Kovács Z, Kékesi KA, Juhász G. Matrix metalloproteinase-9 activity increased by two different types of epileptic seizures that do not induce neuronal death: a possible role in homeostatic synaptic plasticity. *Neurochem Int*. 2010 May-Jun;56(6-7):799-809. Epub 2010 Mar 18. PubMed PMID: 20303372.
4. Kovács Z, **Czurkó A**, Kékesi KA, Juhász G. The effect of intraperitoneally administered dimethyl sulfoxide on absence-like epileptic activity of freely moving WAG/Rij rats. *J Neurosci Methods*. 2011 Apr 15;197(1):133-6. Epub 2011 Feb 12. PubMed PMID: 21320528.
5. Kovács Z, **Czurkó A**, Kékesi KA, Juhász G. Intracerebroventricularly administered lipopolysaccharide enhances spike-wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. *Brain Res Bull*. 2011 Jul 15;85(6):410-6. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.05.003. Epub 2011 May 17. PMID: 21619914.
6. Kovács Z, Kékesi KA, Baracska P, Juhász G, **Czurkó A**. Doxycycline could aggravate the absence-like epileptic seizures of WAG/Rij rats via matrix metalloproteinase inhibition. *Neurochem Int*. 2011 Oct;59(5):563-6. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.016. Epub 2011 Jun 28. PMID: 21740942.
7. Kékesi KA, Juhász G, Simor A, Gulyássy P, Szegő EM, Hunyadi-Gulyás E, Darula Z, Medzihradsky KF, Palkovits M, Penke B, **Czurkó A**. Altered functional protein networks in the prefrontal cortex and amygdala of victims of suicide. *PLoS One*. 2012;7(12):e50532. doi: 10.1371/journal.pone.0050532. Epub 2012 Dec 6. PMID: 23272063; PMCID: PMC3516509.
8. Kovács Z, **Czurkó A**, Kékesi KA, Juhász G. Neonatal tricyclic antidepressant clomipramine treatment reduces the spike-wave discharge activity of the adult WAG/Rij rat. *Brain Res Bull*. 2012 Nov 1;89(3-4):102-7. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.07.010. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22884691.
9. Györfy B, Kovács Z, Gulyássy P, Simor A, Völgyi K, Orbán G, Baracska P, Szabó Z, Janáky T, Dobolyi A, Juhász G, **Czurkó A**, Kékesi KA. Brain protein expression changes in WAG/Rij rats, a genetic rat model of absence epilepsy after

- peripheral lipopolysaccharide treatment. *Brain Behav Immun*. 2014 Jan;35:86-95. doi: 10.1016/j.bbi.2013.09.001. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24021561.
10. Gellén B, Völgyi K, Györfly BA, Darula Z, Hunyadi-Gulyás É, Baracska P, **Czurkó A**, Hernádi I, Juhász G, Dobolyi Á, Kékesi KA. Proteomic investigation of the prefrontal cortex in the rat clomipramine model of depression. *J Proteomics*. 2017 Feb 5;153:53-64. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.027. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27371348.
  11. Spisák T, Pozsgay Z, Aranyi C, Dávid S, Kocsis P, Nyitrai G, Gajári D, Emri M, **Czurkó A**, Kincses ZT. Central sensitization-related changes of effective and functional connectivity in the rat inflammatory trigeminal pain model. *Neuroscience*. 2017 Mar 6;344:133-147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.12.018. Epub 2016 Dec 18. PMID: 28003158.
  12. Völgyi K, Gulyássy P, Todorov MI, Puska G, Badics K, Hlatky D, Kékesi KA, Nyitrai G, **Czurkó A**, Drahos L, Dobolyi A. Chronic Cerebral Hypoperfusion Induced Synaptic Proteome Changes in the rat Cerebral Cortex. *Mol Neurobiol*. 2018 May;55(5):4253-4266. doi: 10.1007/s12035-017-0641-0. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28620701.
  13. Nyitrai G, Spisák T, Spisák Z, Gajári D, Diószegi P, Kincses TZ, **Czurkó A**. Stepwise occlusion of the carotid arteries of the rat: MRI assessment of the effect of donepezil and hypoperfusion-induced brain atrophy and white matter microstructural changes. *PLoS One*. 2018 May 31;13(5):e0198265. doi: 10.1371/journal.pone.0198265. PMID: 29851990; PMCID: PMC5979036.
  14. Spisák T, Román V, Papp E, Kedves R, Sággy K, Csölle CK, Varga A, Gajári D, Nyitrai G, Spisák Z, Kincses ZT, Lévay G, Lendvai B, **Czurkó A**. Purkinje cell number-correlated cerebocerebellar circuit anomaly in the valproate model of autism. *Sci Rep*. 2019 Jun 25;9(1):9225. doi: 10.1038/s41598-019-45667-1. PMID: 31239528; PMCID: PMC6592903.
  15. Tukacs V, Mittli D, Györfly BA, Hunyadi-Gulyás É, Hlatky D, Tóth V, Ravasz L, Medzihradzsky FK, Nyitrai G, **Czurkó A**, Juhász G, Kardos J, Kékesi KA. Chronic stepwise cerebral hypoperfusion differentially induces synaptic proteome changes in the frontal cortex, occipital cortex, and hippocampus in rats. *Sci Rep*. 2020 Sep 29;10(1):15999. doi: 10.1038/s41598-020-72868-w. PMID: 32994510; PMCID: PMC7524772.
  16. Nyitrai G, Kiss B, Farkas B, Balázs O, Diószegi P, Lendvai B, **Czurkó A**. Cariprazine modulates sleep architecture in rats. *J Psychopharmacol*. 2021 Mar;35(3):303-310. doi: 10.1177/0269881120981378. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33406962.
  17. Pálfi E, Lévay G, **Czurkó A**, Lendvai B, Kiss T. Acute blockade of NR2C/D subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors modifies sleep and neural oscillations in mice. *J Sleep Res*. 2021 Aug;30(4):e13257. doi: 10.1111/jsr.13257. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33314505.
  18. Némethy Z, Kiss B, Lethbridge N, Chazot P, Hajnik T, Tóth A, Détári L, Schmidt É, **Czurkó A**, Kostyalik D, Oláh V, Hernádi I, Balázs O, Vizi ES, Ledneczki I, Mahó S,

- Román V, Lendvai B, Lévy G. Convergent cross-species pro-cognitive effects of RGH-235, a new potent and selective histamine H3 receptor antagonist/inverse agonist. *Eur J Pharmacol.* 2022 Feb 5;916:174621. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174621. Epub 2021 Dec 26. PMID: 34965389.
19. Tukacs V, Mittli D, Hunyadi-Gulyás É, Hlatky D, Medzihradzsky KF, Darula Z, Nyitrai G, **Czurkó A**, Juhász G, Kardos J, Kékesi KA. Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Disturbed Proteostasis of Mitochondria and MAM Is Reflected in the CSF of Rats by Proteomic Analysis. *Mol Neurobiol.* 2023 Jun;60(6):3158-3174. doi: 10.1007/s12035-023-03215-z. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36808604; PMCID: PMC10122630.

### **Könyvfejezet:**

1. Buzsaki G , Dragoi G, Csicsvari J, Hirase H, **Czurkó A**, Henze D GABAergic interneuronal networks in the hippocampus. In: Martin D L , Olsen R W (szerk.) *GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. pp. 317-336.
2. **Czurkó A** Neurális és funkcionális plaszticitás. In: Kállai J, Bende I, Karádi K, Racsmány M (szerk.) *Bevezetés a neuropszichológiába.* Budapest: Medicina, 2008. pp. 69-113. (ISBN:978-963-226-134-8)

### **VI/4. Publikációs mutatók**

Eredeti közlemények száma: 55

Könyvfejezetek száma: 2

Független idézetek száma: 3350

## VI/5 A tézisek általános irodalom jegyzéke

- Adrian, E. D., & Zotterman, Y. (1926). The impulses produced by sensory nerve endings. Part.2. The response of a single end organ. *J.Physiol.*, *61*, 151-171.
- Agardh, C. D., Kalimo, H., Olsson, Y., & Siesjo, B. K. (1981). Reply to the remarks by J. B. Brierley and A. W. Brown. *Acta Neuropathol*, *55*(4), 323-325. doi:10.1007/BF00690997
- Altman, J., Anderson, W. J., & Wright, K. A. (1969). Early effects of x-irradiation of the cerebellum in infant rats: decimation and reconstitution of the external granular layer. *Exp Neurol*, *24*(2), 196-216. doi:10.1016/0014-4886(69)90015-6
- Andersen, P., Bliss, T. V., & Skrede, K. K. (1971). Unit analysis of hippocampal population spikes. *Experimental Brain Research*, *13*, 208-221.
- Andrews, J. S., Grutzner, M., & Stephens, D. N. (1992). Effects of cholinergic and non-cholinergic drugs on visual discrimination and delayed visual discrimination performance in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *106*(4), 523-530.
- Annese, J., Schenker-Ahmed, N. M., Bartsch, H., Maechler, P., Sheh, C., Thomas, N., . . . Corkin, S. (2014). Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. *Nat Commun*, *5*, 3122. doi:10.1038/ncomms4122
- Augustinack, J. C., van der Kouwe, A. J., Salat, D. H., Benner, T., Stevens, A. A., Annese, J., . . . Corkin, S. (2014). H.M.'s contributions to neuroscience: a review and autopsy studies. *Hippocampus*, *24*(11), 1267-1286. doi:10.1002/hipo.22354
- Bankman, I. N., Johnson, K. O., & Schneider, W. (1993). Optimal detection, classification, and superposition resolution in neural waveform recordings. *IEEE Trans Biomed Eng*, *40*(8), 836-841. doi:10.1109/10.238472
- Barak, S., & Weiner, I. (2011). Putative cognitive enhancers in preclinical models related to schizophrenia: the search for an elusive target. *Pharmacol Biochem Behav*, *99*(2), 164-189. doi:10.1016/j.pbb.2011.03.011
- Barlow, H. B. (1972). Single units and sensation: A neuron doctrine for perceptual psychology? *Perception*, *1*, 371-394.
- Baver, S. A., & Altman, J. (1975). Radiation-induced interference with postnatal hippocampal cytogenesis in rats and its long-term effects on the acquisition of neurons and glia. *J Comp Neurol*, *163*(1), 1-19. doi:10.1002/cne.901630102
- Bayer, S. A., Brunner, R. L., Hine, R., & Altman, J. (1973). Behavioural effects of interference with the postnatal acquisition of hippocampal granule cells. *Nat New Biol*, *242*(120), 222-224. doi:10.1038/newbio242222a0
- Bland, B. H. (2004). The power of theta: providing insights into the role of the hippocampal formation in sensorimotor integration. *Hippocampus*, *14*(5), 537-538. doi:10.1002/hipo.20027
- Bóné, B. (2014). *Temporális lebeny epilepszia és generalizált rohamok*. (Ph.D.), Pécsi Tudományegyetem, Pécs
- Buccafusco, J. J. (2009). The Revival of Scopolamine Reversal for the Assessment of Cognition-Enhancing Drugs. In nd & J. J. Buccafusco (Eds.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton (FL).
- Buxton, A., Callan, O. A., Blatt, E. J., Wong, E. H., & Fontana, D. J. (1994). Cholinergic agents and delay-dependent performance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, *49*(4), 1067-1073.
- Buzsáki, G. (1986). Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res*, *398*(2), 242-252.
- Buzsáki, G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience*, *31*(3), 551-570.

- Buzsaki, G., & Chrobak, J. J. (1995). Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*, 5(4), 504-510.
- Buzsaki, G., & Eidelberg, E. (1983). Phase relations of hippocampal projection cells and interneurons to theta activity in the anesthetized rat. *Brain Res*, 266(2), 334-339.
- Buzsaki, G., Leung, L. W., & Vanderwolf, C. H. (1983). Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res*, 287(2), 139-171.
- Conrad, C. D., & Roy, E. J. (1993). Selective loss of hippocampal granule cells following adrenalectomy: implications for spatial memory. *J Neurosci*, 13(6), 2582-2590.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci*, 3(2), 153-160. doi:10.1038/nrn726
- Czurkó, A., Huxter, J., Li, Y., Hangya, B., & Muller, R. U. (2011). Theta phase classification of interneurons in the hippocampal formation of freely moving rats. *J Neurosci*, 31(8), 2938-2947. doi:10.1523/JNEUROSCI.5037-10.2011
- Czurkó, A., & Nishino, H. (1993). 'Collapsed' (argyrophilic, dark) neurons in rat model of transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 162(1-2), 71-74. doi:10.1016/0304-3940(93)90562-Y
- Csicsvari, J., Hirase, H., Czurkó, A., Mamiya, A., & Buzsáki, G. (1999). Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J Neurosci*, 19(1), 274-287.
- de Ruyter van Steveninck, R. R., Lewen, G. D., Strong, S. P., Koberle, R., & Bialek, W. (1997). Reproducibility and variability in neural spike trains. *Science*, 275, 1805-1808.
- Eichenbaum, H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res*, 103(2), 123-133.
- Fee, M. S., Mitra, P. P., & Kleinfeld, D. (1996). Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. *J Neurosci Methods*, 69(2), 175-188. doi:10.1016/S0165-0270(96)00050-7
- Fox, S. E., & Ranck, J. B., Jr. (1975). Localization and anatomical identification of theta and complex spike cells in dorsal hippocampal formation of rats. *Experimental Neurology*, 49, 299-313.
- Fox, S. E., Wolfson, S., & Ranck, J. B., Jr. (1986). Hippocampal theta rhythm and the firing of neurons in walking and urethane anesthetized rats. *Exp Brain Res*, 62, 495-508.
- Freund, T. F., & Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470.
- Gallyas, F., Farkas, O., & Mazlo, M. (2004). Gel-to-gel phase transition may occur in mammalian cells: Mechanism of formation of "dark" (compact) neurons. *Biol Cell*, 96(4), 313-324. doi:10.1016/j.biocel.2004.01.009
- Gallyas, F., Guldner, F. H., Zoltay, G., & Wolff, J. R. (1990). Golgi-like demonstration of "dark" neurons with an argyrophil III method for experimental neuropathology. *Acta Neuropathol*, 79(6), 620-628. doi:10.1007/BF00294239
- Gallyas, F., Hsu, M., & Buzsaki, G. (1993). Four modified silver methods for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: 'dark' neurons, perikarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *J Neurosci Methods*, 50(2), 159-164.
- Gallyas, F., Zoltay, G., & Dames, W. (1992). Formation of "dark" (argyrophilic) neurons of various origin proceeds with a common mechanism of biophysical nature (a novel hypothesis). *Acta Neuropathol*, 83(5), 504-509. doi:10.1007/BF00310027
- Georgopoulos, A. P., Kalaska, J. F., Caminiti, R., & Massey, J. T. (1982). On the relations between the direction of two-dimensional arm movements and cell discharge in primate motor cortex. *J Neurosci*, 2, 1527-1537.
- Goldschmidt, R. B., & Steward, O. (1980). Preferential neurotoxicity of colchicine for granule cells of the dentate gyrus of the adult rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(5), 3047-3051. doi:10.1073/pnas.77.5.3047

- Goyal, A., Miller, J., Qasim, S. E., Watrous, A. J., Zhang, H., Stein, J. M., . . . Jacobs, J. (2020). Functionally distinct high and low theta oscillations in the human hippocampus. *Nat Commun*, *11*(1), 2469. doi:10.1038/s41467-020-15670-6
- Grastyán, E. (1973). Orientáció és megerősítés. *MTA nagydoktori értekezés, Kéziratban*. doi:<http://real-d.mtak.hu/7/>
- Grastyán, E., Karmos, G., Vereczkey, L., & Kellenyi, L. (1966). The hippocampal electrical correlates of the homeostatic regulation of motivation. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.*, *21*, 34-53.
- Grastyán, E., Lissák, K., Madarasz, I., & Donhoffer, H. (1959). Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.*, *11*, 409-430.
- Gray, C. M., & Singer, W. (1989). Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, *86*, 1698-1702.
- Green, J. D., & Arduini, A. A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*, *17*(6), 533-557. doi:10.1152/jn.1954.17.6.533
- Gulyas, A. I., Miles, R., Sik, A., Toth, K., Tamamaki, N., & Freund, T. F. (1993). Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature*, *366*(6456), 683-687.
- Hegedus, N., Laszky, J., Gyertyan, I., Kocsis, P., Gajari, D., David, S., . . . Tihanyi, K. (2015). Scopolamine provocation-based pharmacological MRI model for testing procognitive agents. *J Psychopharmacol*, *29*(4), 447-455. doi:10.1177/0269881114565652
- Hopfield, J. J. (1995). Pattern recognition computation using action potential timing for stimulus representation. *Nature*, *376*, 33-36.
- Jacobs, J. (2014). Hippocampal theta oscillations are slower in humans than in rodents: implications for models of spatial navigation and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *369*(1635), 20130304. doi:10.1098/rstb.2013.0304
- Janszky, J., Janszky, I., Schulz, R., Hoppe, M., Behne, F., Pannek, H. W., & Ebner, A. (2005). Temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: predictors for long-term surgical outcome. *Brain*, *128*(Pt 2), 395-404. doi:10.1093/brain/awh358
- Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Behrens, T. E., Woolrich, M. W., & Smith, S. M. (2012). Fsl. *Neuroimage*, *62*(2), 782-790. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.09.015
- Jung, R., & Kornmüller, A. E. (1938). Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, *109*(1), 1-30. doi:10.1007/BF02157817
- Klinkenberg, I., & Blokland, A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev*, *34*(8), 1307-1350. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.04.001
- Konig, P., Engel, A. K., & Singer, W. (1996). Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisited [see comments]. *Trends Neurosci*, *19*, 130-137.
- 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*(1 Pt 1), 58-85. doi:10.1016/0014-4886(75)90195-8
- Lenz, R. A., Baker, J. D., Locke, C., Rueter, L. E., Mohler, E. G., Wesnes, K., . . . Saltarelli, M. D. (2012). The scopolamine model as a pharmacodynamic marker in early drug development. *Psychopharmacology (Berl)*, *220*(1), 97-107. doi:10.1007/s00213-011-2456-4
- Lisman, J. E., & Idiart, M. A. (1995). Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science*, *267*, 1512-1515.
- Maguire, E. A., Burgess, N., & O'Keefe, J. (1999). Human spatial navigation: cognitive maps, sexual dimorphism, and neural substrates. *Curr Opin Neurobiol*, *9*(2), 171-177. doi:10.1016/s0959-4388(99)80023-3

- Maguire, E. A., Gadian, D. G., Johnsrude, I. S., Good, C. D., Ashburner, J., Frackowiak, R. S., & Frith, C. D. (2000). Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(8), 4398-4403. doi:10.1073/pnas.070039597
- Malhotra, J., & Gupta, Y. K. (1997). Effect of adenosine receptor modulation on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Br J Pharmacol*, *120*(2), 282-288. doi:10.1038/sj.bjp.0700869
- Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *262*(841), 23-81. doi:10.1098/rstb.1971.0078
- Máthé, K., Tóth, A., Petykó, Z., Szabó, I., & Czurkó, A. (2007). Implementation of a miniature sized, battery powered electrophysiological signal-generator for testing multi-channel recording equipments. *J Neurosci Methods*, *165*(1), 1-8.
- McClelland, J. L., McNaughton, B. L., & O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. [Review] [165 refs]. *Psychological Review*, *102*, 419-457.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., & Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res*, *76*(3), 485-496.
- Medina-Ceja, L., Cordero-Romero, A., & Morales-Villagran, A. (2008). Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. *Brain Res*, *1187*, 74-81. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.040
- Mickley, G. A., & Ferguson, J. L. (1989). Enhanced acoustic startle responding in rats with radiation-induced hippocampal granule cell hypoplasia. *Exp Brain Res*, *75*(1), 28-34.
- Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, *13*(9), 3916-3925.
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(21), 9697-9701.
- Muller, R. (1996). A quarter of a century of place cells. *Neuron*, *17*(5), 813-822.
- Muller, R. U., Kubie, J. L., & Ranck, J. B., Jr. (1987). Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J Neurosci*, *7*(7), 1935-1950.
- Nadel, L. (1991). The hippocampus and space revisited. *Hippocampus*, *1*(3), 221-229. doi:10.1002/hipo.450010302
- Nasrallah, F. A., Lee, E. L., & Chuang, K. H. (2012). Optimization of flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) for perfusion functional MRI of rodent brain. *NMR Biomed*, *25*(11), 1209-1216. doi:10.1002/nbm.2790
- Nyitrai, G., Spisák, T., Spisák, Z., Gajári, D., Diószegi, P., Kincses, T. Z., & Czurkó, A. (2018). Stepwise occlusion of the carotid arteries of the rat: MRI assessment of the effect of donepezil and hypoperfusion-induced brain atrophy and white matter microstructural changes. *PLoS One*, *13*(5), e0198265. doi:10.1371/journal.pone.0198265
- 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.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.
- O'Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, *3*, 317-330.
- Ogita, K., Okuda, H., Watanabe, M., Nagashima, R., Sugiyama, C., & Yoneda, Y. (2005). In vivo treatment with the K<sup>+</sup> channel blocker 4-aminopyridine protects against kainate-induced neuronal cell death through activation of NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology*, *48*(6), 810-821. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.12.018
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., & Flannery, B. P. (2007). *Numerical Recipes 3rd Edition: The Art of Scientific Computing*: Cambridge University Press.

- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32(3), 281-294. doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0
- Recce, M. L., & O'Keefe, J. (1989). The tetrode: a new technique for multiunit extracellular recording. *Soc. Neurosci Abstr.*, 15:1250.
- Riehle, A., Grun, S., Diesmann, M., & Aertsen, A. (1997). Spike synchronization and rate modulation differentially involved in motor cortical function. *Science*, 278, 1950-1953.
- Ruotsalainen, S., Miettinen, R., MacDonald, E., Koivisto, E., & Sirvio, J. (2000). Blockade of muscarinic, rather than nicotinic, receptors impairs attention, but does not interact with serotonin depletion. *Psychopharmacology (Berl)*, 148(2), 111-123.
- Sainsbury, R. S., Heynen, A., & Montoya, C. P. (1987). Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat. *Physiol Behav*, 39(4), 513-519. doi:10.1016/0031-9384(87)90382-9
- Sarter, M. (2006). Preclinical research into cognition enhancers. *Trends Pharmacol Sci*, 27(11), 602-608. doi:10.1016/j.tips.2006.09.004
- Saul, L. J. (1933). Action Currents in the Central Nervous System. *Archives of Neurology And Psychiatry*, 29(2), 255. doi:10.1001/archneurpsyc.1933.02240080045004
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1), 11-21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11
- Shadlen, M. N., & Newsome, W. T. (1994). Noise, neural codes and cortical organization. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4, 569-579.
- Shadlen, M. N., & Newsome, W. T. (1998). The variable discharge of cortical neurons: implications for connectivity, computation, and information coding. *J Neurosci*, 18(10), 3870-3896.
- Sherman, S. M., & Guillery, R. W. (1998). On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing "drivers" from "modulators". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 7121-7126. doi:10.1073/pnas.95.12.7121
- Skaggs, W. E., McNaughton, B. L., Wilson, M. A., & Barnes, C. A. (1996). Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus*, 6(2), 149-172.
- Snyder, P. J., Bednar, M. M., Cromer, J. R., & Maruff, P. (2005). Reversal of scopolamine-induced deficits with a single dose of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor. *Alzheimers Dement*, 1(2), 126-135. doi:10.1016/j.jalz.2005.09.004
- Spisák, T., Pozsgay, Z., Arányi, C., David, S., Kocsis, P., Nyitrai, G., . . . Kincses, Z. T. (2017). Central sensitization-related changes of effective and functional connectivity in the rat inflammatory trigeminal pain model. *Neuroscience*, 344, 133-147. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.12.018
- Spisák, T., Román, V., Papp, E., Kedves, R., Sághy, K., Csölle, C. K., . . . Czurkó, A. (2019). Purkinje cell number-correlated cerebellar circuit anomaly in the valproate model of autism. *Sci Rep*, 9(1), 9225. doi:10.1038/s41598-019-45667-1
- Squire, L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, 61(1), 6-9. doi:10.1016/j.neuron.2008.12.023
- Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*, 5(2), 169-177.
- Stepien, L., & Sierpinski, S. (1964). Impairment of recent memory after temporal lesions in man. *Neuropsychologia*, 2(4), 291-303. doi:10.1016/0028-3932(64)90036-3
- Stubley-Weatherly, L., Harding, J. W., & Wright, J. W. (1996). Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res*, 716(1-2), 29-38. doi:10.1016/0006-8993(95)01589-2
- Summers, W. K., Majovski, L. V., Marsh, G. M., Tachiki, K., & Kling, A. (1986). Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med*, 315(20), 1241-1245. doi:10.1056/NEJM198611133152001

- Sutherland, R. J., Wishaw, I. Q., & Kolb, B. (1983). A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res*, *7*(2), 133-153.
- Suzuki, S. S., & Smith, G. K. (1987). Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates, laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.*, *67*, 348-359.
- Suzuki, S. S., & Smith, G. K. (1988). Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. II. Relations to synchronous burst discharges. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, *69*(6), 532-540. doi:10.1016/0013-4694(88)90165-4
- Szabó, I., Czurkó, A., Csicsvari, J., Hirase, H., Leinekugel, X., & Buzsáki, G. (2001). The application of printed circuit board technology for fabrication of multi-channel micro-drives. *J Neurosci Methods*, *105*(1), 105-110.
- Szabó, I., Máthé, K., Tóth, A., & Czurkó, A. (2001). The application of cross-point switch arrays as input selector switch devices for multi-channel electrophysiological experiments. *J Neurosci Methods*, *111*(1), 75-81.
- Szabó, I., Máthé, K., Tóth, A., Hernádi, I., & Czurkó, A. (2002). The application of elastomeric connector for multi-channel electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods*, *114*(1), 73-79.
- Szentagothai, J. (1963). The Structure of the Synapse in the Lateral Geniculate Body. *Acta Anat (Basel)*, *55*, 166-185.
- Tilson, H. A., & Peterson, N. J. (1987). Colchicine as an investigative tool in neurobiology. *Toxicology*, *46*(2), 159-173. doi:10.1016/0300-483x(87)90125-9
- Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev*, *55*(4), 189-208. doi:10.1037/h0061626
- Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., . . . Mori, H. (2008). A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol*, *63*(3), 377-387. doi:10.1002/ana.21321
- Tomiyama, T., & Shimada, H. (2020). APP Osaka Mutation in Familial Alzheimer's Disease-Its Discovery, Phenotypes, and Mechanism of Recessive Inheritance. *Int J Mol Sci*, *21*(4). doi:10.3390/ijms21041413
- Tóth, A., Máthé, K., Petykó, Z., Szabó, I., & Czurkó, A. (2008). Implementation of a galvanically isolated low-noise power supply board for multi-channel headstage preamplifiers. *J Neurosci Methods*, *171*(1), 13-18.
- Tóth, A., Petykó, Z., Máthé, K., Szabó, I., & Czurkó, A. (2007). Improved version of the printed circuit board (PCB) modular multi-channel microdrive for extracellular electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods*, *159*(1), 51-56.
- Turrigiano, G. G. (1999). Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci*, *22*(5), 221-227.
- Ulanovsky, N., & Moss, C. F. (2007). Hippocampal cellular and network activity in freely moving echolocating bats. *Nat Neurosci*, *10*(2), 224-233. doi:10.1038/nn1829
- Vaadia, E., Bergman, H., & Abeles, M. (1989). Neuronal activities related to higher brain functions--theoretical and experimental implications. *IEEE Trans.Biomed.Eng.*, *36*, 25-35.
- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.*, *26*, 407-418.
- Vanderwolf, C. H., & Heron, W. (1964). Electroencephalographic Waves with Voluntary Movement. Study in the Rat. *Arch Neurol*, *11*, 379-384. doi:10.1001/archneur.1964.00460220041006
- Vein, A. (2009). Sergey Sergeevich Korsakov (1854-1900). *J Neurol*, *256*(10), 1782-1783. doi:10.1007/s00415-009-5289-x
- Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M., Cobos, I., Ho, K., . . . Palop, J. J. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*, *149*(3), 708-721. doi:10.1016/j.cell.2012.02.046

- Wilson, M. A., & McNaughton, B. L. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, *261*(5124), 1055-1058.
- Ylinen, A., Bragin, A., Nadasdy, Z., Jando, G., Szabo, I., Sik, A., & Buzsaki, G. (1995). Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci*, *15*(1 Pt 1), 30-46.
- Ylinen, A., Soltesz, I., Bragin, A., Penttonen, M., Sik, A., & Buzsaki, G. (1995). Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, *5*(1), 78-90.