
STRESZCZENIE

Rytm theta opisywany jest jako jeden z najlepiej zsynchronizowanych wzorców aktywności elektroencefalograficznej (EEG) generowanej przez komórki nerwowe ssaków. Aktywność w paśmie theta rejestrowana jest głównie z formacji hipokampa (HPC). Rytm theta powiązany jest przede wszystkim z procesami uczenia się i zapamiętywania. Dodatkowo bierze udział w procesach związanych z plastycznością synaptyczną oraz uczestniczy w kontroli orientacji przestrzenni czy też integracji czuciowo-ruchowej. Ponadto, rytm theta jest niespecyficznym markerem powszechnie występujących chorób takich jak epilepsja, migrena czy choroba Alzheimera. Na początku lat 90. wykazano, że hipokampalny rytm theta skorelowany jest z aktywnością pewnej puli komórek nerwowych (tzw. neuronów theta-zależnych) obecnych w obszarze tylnego podwzgórza (PHa). Potwierdziło to hipotezę, że neurony znajdujące się w jądrze tylnego podwzgórza (PH) oraz jądrze nadsuteczki (SuM) są częścią tzw. wstępującego układu synchronizującego, odpowiedzialnego za powstawanie i modulowanie rytmu theta w korze limbicznej.

Hipokampalny rytm theta różni się jednak od tylnopodwzgórzowej aktywności w paśmie theta. Przede wszystkim, wolnofalowa aktywność rytmiczna w PH posiada znacznie niższą amplitudę (7-8 krotnie) niż jej hipokampalny odpowiednik. Ponadto, rytm theta rejestrowany z okolic tylnego podwzgórza pojawia się spontanicznie w zapisie EEG stosunkowo rzadko ze znacznie niższą częstotliwością niż hipokampalny rytm theta. Dodatkowo, w odróżnieniu od zapisu hipokampalnego, rytm theta w PH jest wzorcem mało stabilnym. W związku z powyższym w niniejszej pracy podjęto próbę:

1. opracowania modelu doświadczalnego, pozwalającego na długotrwałe rejestracje lokalnych neuronów związanych z rytmem theta obserwowanym w obszarze tylnego podwzgórza;
2. scharakteryzowania puli lokalnych komórek theta-zależnych rejestrowanych z obszaru tylnego podwzgórza;

3. zbadania wpływu farmakologicznego modelowania połączeń szczelinowych na rytm theta rejestrowany z obszaru tylnego podwzgórza.

Badania zostały przeprowadzone na anastetyzowanych szczurach. Wszystkie operacje stereotaktyczne zostały przeprowadzone w oparciu o współrzędne stereotaktyczne wybranych struktur w obrębie tylnego podwzgórza. Rejestracji tylnopodwzgórzowej aktywności polowej dokonywano za pomocą elektrod wolframowanych (o oporności 0.3 - 0.9 M Ω) implantowanych do jądra tylnego podwzgórza lub jądra nadsuteczkwatego, natomiast rejestracji aktywności komórkowej dokonano przy użyciu elektrod szklanych (o oporności 3 - 9 M Ω) oraz mikromanipulatora. Badania zostały przeprowadzone w 3 cyklach badawczych. W I cyklu doświadczalnym użyto 58 szczurów podzielonych na 3 podgrupy. Osobnikom z każdej z grup podano domózkowo jeden z trzech związków farmakologicznych indukujących rytm theta: karbachol (0.5, 1.0, 1.5 oraz 2.0 μ g/0.5 μ l), karbenoksolon (25 oraz 50 μ g/0.5 μ l) oraz kwas kainowy (0.1 i 0.25 μ g/0.5 μ l). W II cyklu doświadczeń wykorzystano 143 zwierząt, u których dokonywano rejestracji aktywności komórkowej neuronów związanych z rytmem theta rejestrowanym z PHa, który indukowany był iniekcjami karbacholu (1.0 μ g/0.5 μ l). W III cyklu doświadczeń wykorzystano 54 szczury, które podzielono na 4 podgrupy. Zwierzętom z pierwszej podgrupy do tylnego podwzgórza podano karbenoksolon (75 μ g/1 μ l), który jest blokerem połączeń szczelinowych i agonistą receptorów mineralokortkoidowych. Osobniki z drugiej podgrupy otrzymały domózkowe iniekcje trimetyloaminy (40 μ g/1 μ l) - tzw. otwieracza połączeń szczelinowych. Szczurom z trzeciej podgrupy w pierwszym etapie podawane były tylnopodwzgórzowe iniekcje spironolaktonu (10 μ g/1 μ l), będącego antagonistą receptorów mineralokortykoidowych, a następnie iniekcje mieszaniny spironolaktonu i karbenoksolonu (w dawkach odpowiednio 10 μ g/1 μ l oraz 75 μ g/1 μ l). Ostatecznie (4 podgrupa) premedykowanym atropiną (10 μ g/kg) zwierzętom podawano dopodwzgórzowo karbenoksolon (75 μ g/1 μ l).

Analiza uzyskanych w trakcie doświadczenia danych oparta była na szybkiej transformacie Fouriera, natomiast średnie wartości amplitudy, mocy oraz częstotliwości poddane zostały analizie przy pomocy testów statystycznych: testu Shapiro-Wilka, analizie

wariancji Kruskala-Wallisa oraz testu U-Manna Whitneya. Lokalizację komórek theta-zależnych przeprowadzono dzięki weryfikacji histologicznej, której celem była wizualizacja miejsca ich rejestracji.

Wyniki badań I cyklu doświadczeń wskazały na to, że jedynie karbachol podany w dawce 1.0µg/0.5µl indukował powtarzalne oscylacje w paśmie theta, utrzymujące się w tylnopodwzgórzowym zapisie EEG około 120 min. Iniekcja blokera połączeń szczelinowych i agonisty receptorów mineralokortykoidowych jakim jest karbenoksolon w dawce 25µg/0.5µl nie wpłynęła znacząco na zmianę mocy i amplitudy spontanicznego rytmu theta rejestrowanego w PHa. Pomimo tego, że większa dawka karbenoksolonu - 50µg/0.5µl podana do obszaru tylnego podwzgórza wywołała synchronizację theta, to efekt ten utrzymywał się zbyt krótko, aby móc w sposób powtarzalny prowadzić rejestracje aktywności komórkowej. W przypadku iniekcji dwóch dawek kwasu kainowego (0.1µg/0.5µl oraz 0.25µg/0.5µl) okazało się, że niższa z nich była dawką podprogową, a wyższa skutkowałą silnymi wyładowaniami epileptycznymi. Efektem przeprowadzenia II cyklu doświadczeń była rejestracja 381 neuronów, z czego 105 zaklasyfikowano jako związane z lokalnym rytmem theta. 56 komórek określono jako neurony theta-on toniczne, a 39 scharakteryzowano jako theta-off toniczne. Spośród wszystkich komórek, aktywność 4 komórek wskazywała, że są to neurony bramkujące typu B, natomiast aktywność 6 neuronów nie była dotąd opisana, a nowo odkryte komórki nazwano komórkami bramkującymi typu D. Co więcej, podczas rejestracji aktywności EEG odkryto obecność w PHa kolejnego typu nieopisanych dotychczas komórek, które nazwano „neuronami czasowymi”(11 neuronów). W III cyklu doświadczeń karbenoksolon powszechnie znany jako bloker synaps elektrycznych podany do PHa w dawce 75µg/1µl wpłynął na wzrost mocy i amplitudy rytmu theta. Pobudzający efekt iniekcji karbenoksolonu na tylnopodwzgórzową aktywność theta należy wiązać z oddziaływaniem podanego związku na receptory mineralokortykoidowe, bowiem karbenoksolon jest ich agonistą. Trimetyloamina (40µg/1µl) pozostała bez wpływu na aktywność w paśmie theta. Mikroiniekcja spironolaktonu (10µg/1µl) do PHa przyczyniła się do obniżenia mocy i amplitudy rytmu theta związanego z PHa, natomiast dożylnie podanie siarczanu atropiny

(10 μ g/kg) nie tylko znosiło rytm theta z zapisu EEG ale i hamowało działanie późniejszego, domózgowego podania karbenoksolonu (75 μ /1 μ l).

Na podstawie wyników rozprawy doktorskiej można wyciągnąć wniosek, że to karbachol podany w dawce 1.0 μ g/0.5 μ l, ze względu na najdłuższy czas działania oraz brak początkowych efektów epileptogennych jest optymalnym związkiem farmakologicznym indukującym pojawienie się rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. W świetle powyższych badań taki model *in vivo* wydaje się najodpowiedniejszy do długotrwałych rejestracji aktywności komórek theta-zależnych w PHa. Dowiedziono także, że w obszarze tylnego podwzgórza obecne są komórki theta-zależne toniczne oraz kilka rodzajów komórek bramkujących. Po raz pierwszy opisano nowy wzorzec komórkowej aktywności nazwanej „komórkami czasowymi”, które mogą brać udział w ułatwianiu synchronizacji komórek tonicznych w obszarze tylnego podwzgórza. Ostatnia konkluzja dotyczy braku udziału połączeń szczelinowych w powstawaniu rytmu theta w obszarze tylnego podwzgórza. Na podstawie wyników sądzi się, że wzrost niektórych parametrów tylnopodwzgórzowego rytmu theta po iniekcji karbenoksolonu, może być związany z oddziaływaniem tego związku na receptory mineralokortykoidowe.

Paulina Kłos-Wętko

ABSTRACT

Theta rhythm is described as one of the best synchronized electroencephalographic activities generated by mammalian brains. This activity is registered mainly from a structure called the hippocampus formation (HPC). Theta activity is related to learning and memory processes, synaptic plasticity, spatial orientation and navigation or sensorimotor integration. In addition, theta rhythm may be a biomarker of commonly occurring diseases like epilepsy, migraine or Alzheimer's disease. At the beginning of 90s. it was shown that hippocampal theta rhythm is correlated with the activity of some neuron's population – called “theta-related cells” recorded from posterior hypothalamus nuclei (PH) and supramammillary nucleus (SuM). This confirmed the hypothesis that neurons located in PH and SuM are a part of so-called “an ascending synchronizing system” which is responsible for the formation and modulation of theta activity in the limbic system.

However, the hippocampal theta rhythm differs from the same oscillation recorded from the posterior hypothalamus. First of all, slow-wave activity in PH has a much lower amplitude (7-8 times) in comparison to HPC. Secondly, spontaneous theta rhythm recorded from the PH occurs rarely in the EEG and at much lower frequency than in case of the hippocampus formation. In addition, unlike to hippocampal recording, theta rhythm in PH is an unstable phenomenon what makes it extremely difficult and non-standard research model. Based on these premises, purposes of this study were:

- a) development of an experimental model allowing long-term registration of theta-related neurons in the area of the posterior hypothalamus;
- b) characterization of the local theta-related population's cells from the posterior hypothalamic area;
- c) to examine the pharmacological effect of gap junctions modulations on theta rhythm in the posterior hypothalamus.

Studies were conducted on anesthetized rats. All stereotaxic experiments were based on coordinates for posterior hypothalamus area according to Stereotaxic Brain Atlas for Rats. Recording of local theta activity was made by using tungsten electrodes (with 0.3 - 0.9 M Ω resistance) implanted in PHa, whereas recording of local neurons was made by using glass electrodes (with 3 - 9 M Ω) and micromanipulator. Experiments were divided into 3 main experiment cycles. Experiment 1 was conducted on 58 male rats, which were divided into three subgroups. Each of them was subjected to intracerebral injections with one of three pharmacological compounds inducing theta rhythm: carbachol (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μ g /0.5 μ l), carbenoxolone (25 and 50 μ g /0.5 μ l) and kainic acid (0.1 and 0.25 μ g/0.5 μ l). Experiment 2 was conducted on 143 rats in which local theta-related cells were recorded from PHa. In the second experiment theta rhythm was induced by carbachol injections (1.0 μ g/0.5 μ l). Experiment 3 was conducted on 54 male rats, which were divided into 4 subgroups. The first of them was administered intracerebral by 75 μ g/1 μ l of carbenoxolone which is a blocker of gap junctions and agonist of mineralocorticosteroid receptors. The second group received trimethyloamine microinjections to PH (an agonist of gap junctions) in dose of 40 μ g/1 μ l. The third group was administered by spironolactone (10 μ g/1 μ l) which is an antagonist of mineralocorticosteroids receptors, and after 10 minutes from the first PHa microinjection, a mixture of spironolactone and carbenoxolone (in doses of 10 μ g/1 μ l and 75 μ g/1 μ l respectively) was given. The last group was firstly administered by atropine (10 μ g/kg) via jugular vein. After observing full blockage of local theta activity in EEG, carbenoxolone (75 μ g/1 μ l) was given to PHa.

The analysis of data obtained during the experiments was based on a Fast Fourier Transformation, while theta rhythm mean values of power, amplitude and frequency were analyzed using statistical tests: the Shapiro-Wilk test, the Kruskal-Wallis variance analysis and U-Mann Whitney test. The localization of theta-related cells was made by histological verification which aim was to visualize recording site.

Results of Experiment 1 showed that carbachol (1µg/0.5µl) is one of the most reliable compound inducing repeatable theta oscillations which remained in EEG for around 120 min. Microinjections of the lowest doses of carbenoxolone (25µg/0.5µl) failed to induce any significant changes in theta epochs parameters in PHa. Although, highest dose of carbenoxolone (50µg/0.5µl) caused synchronization of theta epochs, this effects does not remain long enough to achieve reliable and repeatable recordings. In case of kainic acid both doses (0.1µg/0.5µl and 0.25µg/0.5µl) turned out to be ineffective. The lowest dose was subthreshold, and the highest dose produced epileptic discharges presented in EEG recording for 30 min after injection. In the Experiment 2 381 neurons were recorded, 105 of which were classified as theta-related cells. 56 neurons were indentified as theta-on tonic cells and 39 as a theta-off tonic cells. Among all neuron cells, activity of 4 of them was described as gating cells type B, 6 as a newly discovered type D. What is more, during the experiments, new type of neuron cells (11) were discovered and called as „timing cells”. In the Experiment 3 carbenoxolone (75µg/1µl) caused enhancement of theta parameters (power and amplitude), however this compound is also known from its agonistic impact on mineralocorticoids receptors. Trimethyloamine (40µg/1µl) produce no effects on theta activity in PHa. Microinjection of spironolactone (10µg/1µl) to posterior hypothalamic area decreased parametres of theta, while intravenous injections of atropine sulphate (10µg/kg) not only abolished theta rhythm but also inhibited the effect of carbenoxolone (75µ/1µl).

Based on the results from studies it can be concluded that carbachol (1.0µg/0.5µl) due to the longest duration of action and the lack of initial epileptogenic effects, is optimal pharmacological compound inducing the appearance of theta rhythm in the posterior hypothalamus. In the light of the above studies, carbachol-dependent *in vivo* model seems to be the most suitable for long-term experiments regarding recording of theta-related cells in posterior hypothalamus. It has also been proved that theta-related tonic on and off cells and also several types of gating cells (type B and D) are present in the area of posterior hypothalamus. For the first time, a new pattern of cellular activity calles “timing cells” were described, which may be involved in providing a regular rhythmic signal facilitating the

transduction of tonic cells. The last conclusion concerns lack of gap junctions involvement in modulation of hypothalamic theta epochs. Based on the results, it is possible that the stimulating effect of carbenoxolone on some theta rhythm parameters may be related to the involvement of mineralocorticoid receptors in this process.

Paulina Kłos-Wojcik