

A kutatási programnak megfelelően a pályázati beruházásokkal és saját fejlesztésekkel megteremtettük a sokcsatornás multiunit elvezetések alapvető feltételeit. Az extracelluláris elektrofiziológiai jelek sokcsatornás erősítésére az PTE, ÁOK, Magatartástudományi Intézet, Neuropszichológiai Laborjában helyileg kifejlesztett 16 csatornás komputer vezérelt erősítő rendszert használtuk, az elektromos jelek digitalizálására pedig, a limitált támogatásból, sikerült beszereznünk egy gyárilag felújított CED micro1401 12 bites A/D konverter interface rendszert.

A viselkedő állatokon végzett elektrofiziológiai kísérletek egyik fontos sajátossága, hogy az elvezető drót mikroelektrodákat a regisztrálni kívánt idegsejtek közelébe kell mozgatnunk, a kísérletek közben. A mikroelektrodák ezen precíz mozgatását 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. Azonban az ilyen microdrive-ok készítése egy megfelelő műhelyt és technikai tudást igényel.

Nekünk is meg kellett oldanunk ezen microdrive-ok készítését. Egy teljesen új megközelítést, a nyomtatott áramkört (NYÁK vagy angolul PCB) lapokat alkalmazva sikerült leegyszerűsíteni és modulárisá tennünk a microdrive-ok készítését (Czurkó et al., 2001). A PCB microdrive-ok lényege, hogy egy lekerekített fejű csavar fejét két PCB lap rögzíti a vertikális irányban, az anyacsavar oldalsó körbefordulását pedig, az ún. PCB távtartó rudak akadályozzák. Így a PCB-k közötti csavar csavarásával az anyacsavar mozog le és fel, melyhez az elvezető elektrodák rögzíthetők.

A PCB microdrive technológiával és a szintén helyileg kifejlesztett a sokcsatornás előerősítők alkalmazásával sikerült egy új csatlakoztatási módot is kifejlesztenünk, amely lehetővé teszi nagyon kis helyen, igen sok elvezető csatorna csatlakoztatását (Szabó et al., 2002). A megoldás lényege, hogy mikro-csatlakozók 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 fejen szűken rendelkezésre álló helyre.

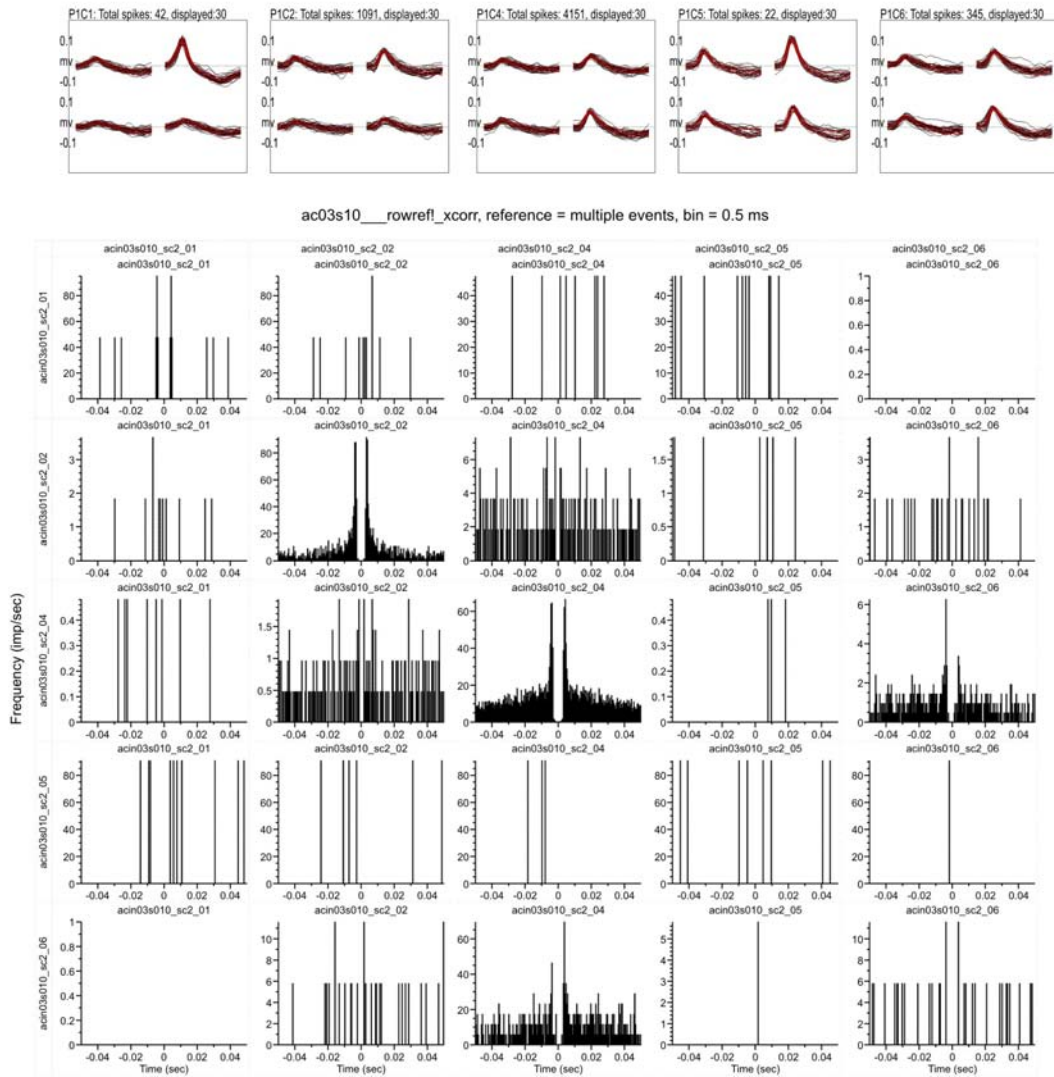
A kutatási programnak megfelelően a Gyrus Dentatus (GD) területén működő szencsejtek és interneuronok aktivitását analizáltuk viselkedő patkányokon. A beszerzett

impedanciamérő készülék segítségével sikerült megfelelően beállítanunk a 25 mikronos tetród elektródák impedancia értékeit az implantálás előtt. A tervezett adatanalizáló programcsomag beszerzése is megtörtént, a Plexon cég Offline Spike Sorter (OFS) programcsomagját szereztük be, mellyel a tetród elektródokkal felvett extracelluláris akciós potenciál mintázatokat analizáltuk grafikus kluszterezéssel.

A krónikus implantálásokra a korábban említett PCB microdrive-okat alkalmaztuk ill. néhány esetben összehasonítás végett a Bristol Egyetemen MRC központjában kifejlesztett (Computer Aided Design & Machining; Bruno Rivard / Robert L. Muller) delrin mikrodrive-okat is kipróbáltuk. A PCB microdrive-okat az évek során felgyülemlett tapasztalatok ill. néhány külföldi kísérletes labor észrevételei alapján tovább is fejlesztettünk. Ezen fejlesztéseket és újításokat egy módszertani cikkben foglaltuk össze, mely most van publikálás alatt (Tóth et al., 2006).

További technikai fejlesztéseink arra irányultak, hogy a krónikus elvezetésekben az állatok szabad mozgását lehetővé tevő sokcsatornás és igen drága „swivel-t” valamilyen megoldással kiváltsuk. Erre kínál megoldást a „digitalis swivel” technológia, melynek lényege, hogy a sokcsatornás, 24 bit felbontással folyamatosan mintavételezett adatokat megfelelő elektronikai megoldással egyetlen adatkábelben vezetjük a számítógép USB port-jára (Szabó et al., 2005).

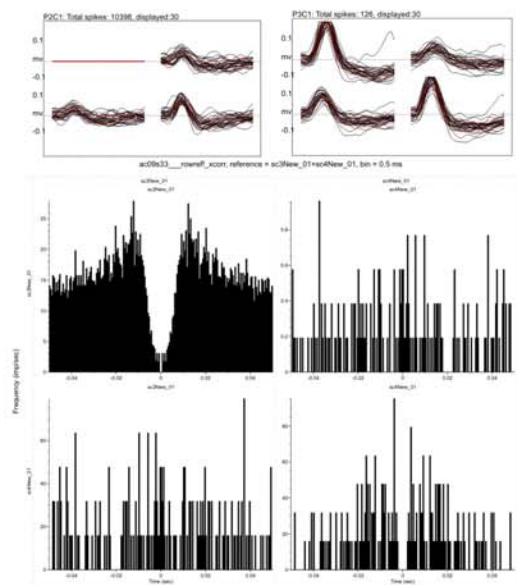
A GD idegsejtjeinek multiunit aktivitás analízise azt mutatja, hogy többféle sejtípust is el tudunk különíteni a GD-ban a sejtek aktivitásmintázata alapján. Ahogy az 1. ábra első sora mutatja, a legnagyobb amplitúdójú akciós potenciállal elvezetett sejtek gyakran igen keveset tüzelnek (az egyes sejtek grafikus kluszterezéssel történő elkülönítését a tetród elektród egyes csatornáin megjelenő akciós potenciál mintázat segíti). Az 1. ábra további része az egyes idegsejtek aktivitásmintázatára jellemző, tüzelési idő korrelációs mátrixot mutat az első sorban jelzett idegsejtekre vonatkozóan (időablak +/- 50 ms, bin=0.5 ms). A bal felső saroktól jobbra keresztben lefelé láthatók a legfelső sorban az akciós potenciálokkal jelzett sejtek autokorrelációi. A mellettük látható keresztkorrelációk esetén a referencia sejt mindig az autokorrelációnak megfelelő sorban van.



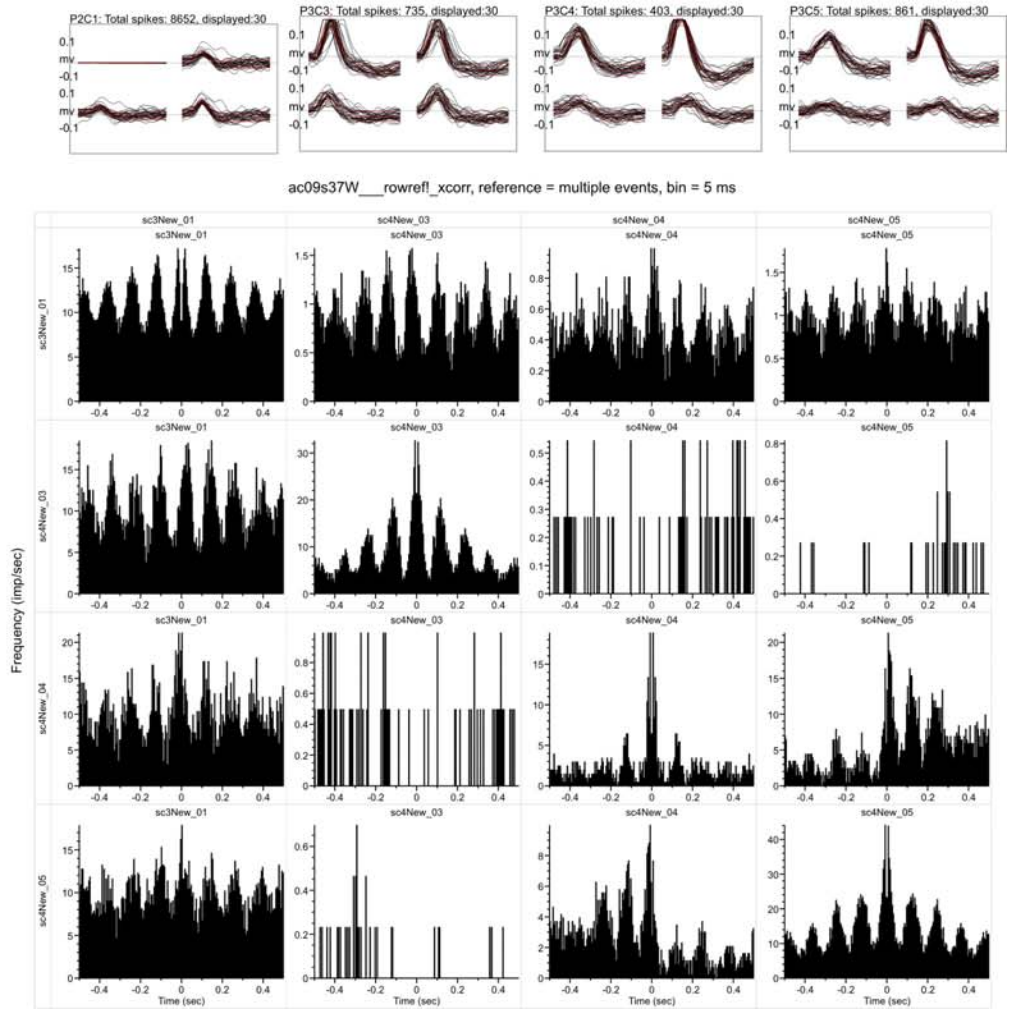
1. ábra

Mint látható az első sor első és negyedik sejtje nagyobb amplitúdójú akciós potenciállal rendelkezik, azonban igen alacsony frekvenciával tüzel (0.039 ill. 0.020 Hz). Az első sor második és harmadik sejtje nagyobb frekvenciával tüzel (1.005 ill. 3.195 Hz) és autokorrelációs hisztogramjuk szép, sajátos „karcsú” burst-ös aktivitásmintázatot mutat. Az ötödik sejt a krosszkorrelációi tanulsága szerint nem különálló sejt, hanem a harmadik sejt aktivitásának a része, mivel a nagyobb valószínűséggel tüzel a harmadik sejt előtt és után, ugyanakkor közös refrakteritásuk van. Látható, hogy nem könnyű elkülöníteni az egyes GD szemcse-sejtjeiket az extracellulális elvezetésekben. Felmerül, hogy a GD szemcse-sejtjeinek aktivitását esetlegesen, mint multiunit aktivitást érdemes a viselkedés tükrében analizálni.

A



B



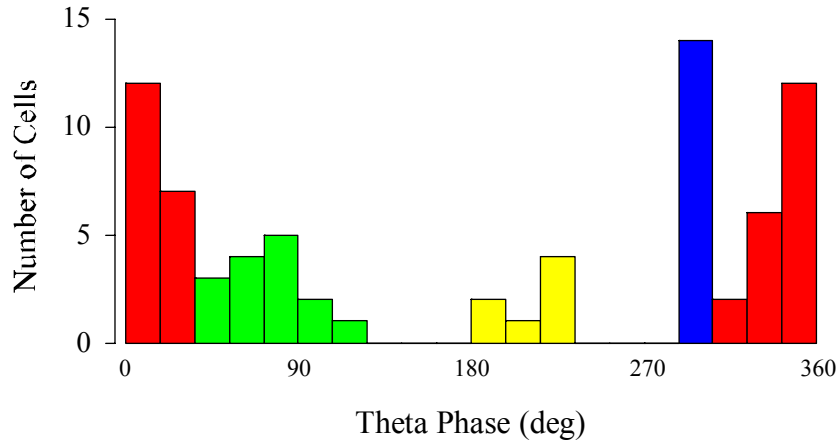
2. ábra

A második ábra A része hasonló elrendezésben két sejtet mutat a GD-ban. Az első egy nagy frekvenciával tüzelő interneuron, a második egy nagy amplitúdójú akciós potenciállal rendelkező szemcsesejt. Az ábra B része ugyanezen interneuron aktivitását mutatja napokkal később, amikor nagyobb aktivitású szemcsesejtek jelentek meg az interneuron mellett. Az ábra ezen B részén a korrelációs mátrix időablaka +/- 500 ms (bin 5 ms) amelyen nagyon jól látszik a sejtek theta modulációja. Az interneuron bal felső autokorrelációs hisztogramján különösen szembetűnő a sejt fenntartott tüzelése mellett a theta modulációból adódó 7 csúcs. A szemcsesejtek autokorrelogramjai esetén is látható a theta moduláció azonban dominál a sejtek burstös jellege, a lecsengő aktivitás. Az interneuron és a szemcsesejtek közötti keresztkorrelációkban is megjelenik a theta moduláció, a harmadik és negyedik sejt közötti keresztkorreláció, pedig megint arra utalhat, hogy a harmadik sejt nem különálló sejt, hanem a negyedik sejt burstjeinek legnagyobb amplitúdójú része.

Mint ahogy az eddigi ábrákból is látható a krónikus elvezetések során aránylag nagy biztonsággal különíthetők el a principális sejtek és az interneuronok a hippocampális elvezetésekben. A principális sejtek anatómiailag homogen csoportot képeznek a hippocampusban, az interneuronok anatómiája azonban igen változatos, és jól karakterizált csoportokra osztható. Mindezekből logikusan adódik az alapvető kérdés amellyel mi is szembe kerültünk, hogy lehetséges-e a krónikus elvezetésekben az interneuronok valamiféle funkcionális csoportosítása.

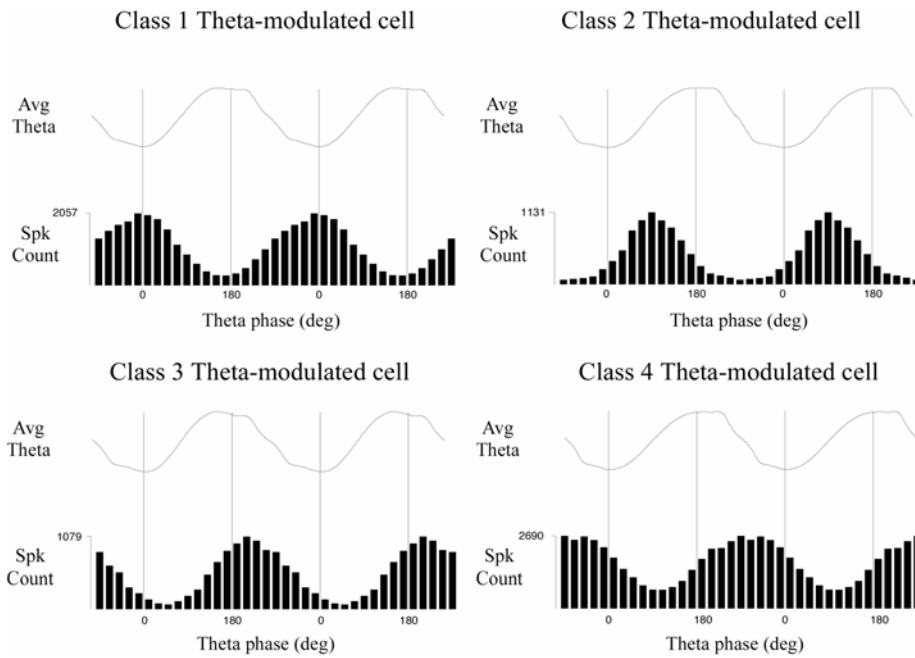
Ennek a kérdésnek a megválaszolására egyrészt korábbi az interneuronok hippocampális sharp wave (SW) korrelációs munkánk (Csicsvari et al., 1999) ill. az utóbbi évek *in vivo* juxtacelluláris munkái (Klausberger et al., 2003; Klausberger et al., 2004; Klausberger et al., 2005) adnak jó kiindulópontot. Jelen kísérleteinkben megvizsgáltuk 75 theta modulált interneuron theta tüzelési fázisát. Mint a 3. ábrán látható, az interneuronok tüzelési valószínűsége nem homogéne oszlik el a theta hullám lefutása során, hanem legalább négy kitüntetett fázis található.

Histogram of peak theta phase for 75 theta-modulated cells



3. ábra

A négy kitüntetett theta fázisnak megfelelően az interneuronokat 4 osztályba soroltuk (lásd 4. ábra).



4. ábra

Mindezek után a megvizsgáltuk az egyes osztályokba sorolt interneuronok SW korrelációit, amennyiben alvás elvezetés is rendelkezésünkre állt a vizsgált interneuronnal kapcsolatban.

| Phase peak classes | class 1 | class 2 | class 3 | class 4 |
|------------------------|---|--|---|--------------------------|
| No of cells in class | 42 | 12 | 7 | 14 |
| No. of SW corr. tested | 18 | 9 | 4 | 6 |
| SW corr. results | Sgl Peak: 9 Double: 6 Biphasic: 1 Unrelated: 2 | Sgl Peak: 6 Double: 2 Unrelated: 1 | Sgl Peak: 1 Inhib.: 1 Sml. Incr.: 2 | Sgl Peak: 4 Double: 2 |

Bistratified

CCK basket

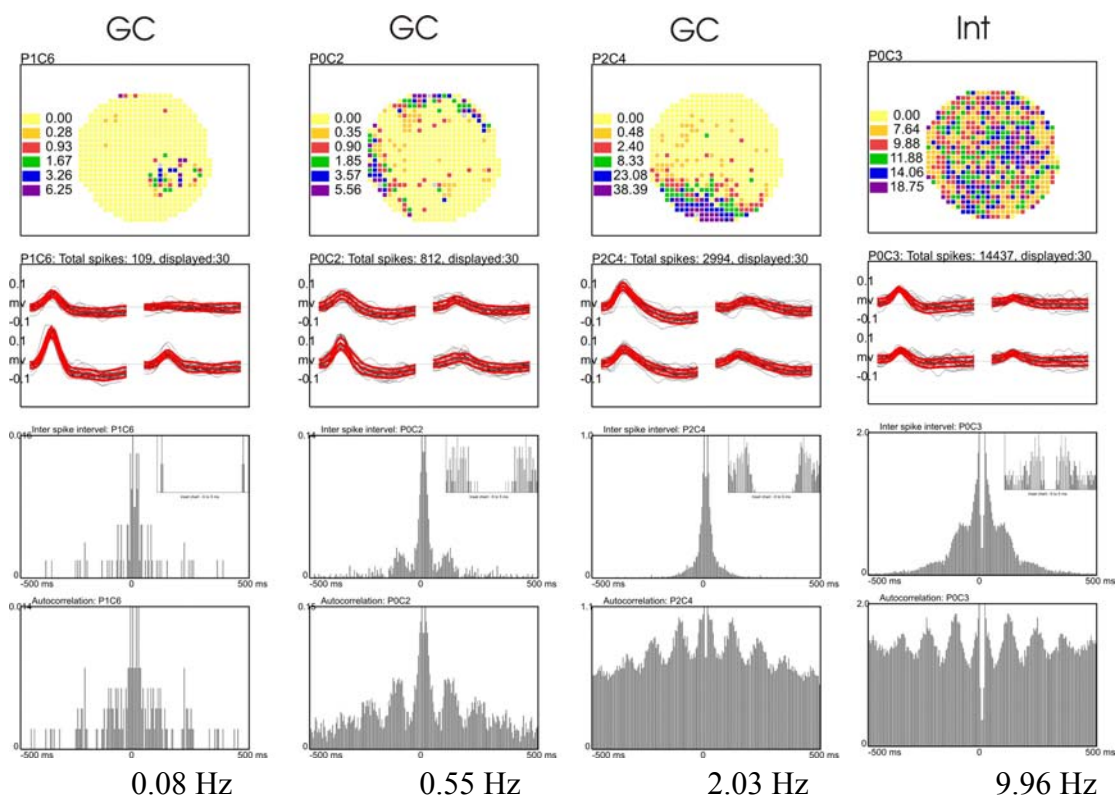
Axo-axo

PV basket

1.táblázat

Amint az 1.táblázatból látható, bár az SW korrelációk nem teljesen homogének, a theta fázissal együtt meglepően jól beazonosítják az egyes funkcionális interneuron osztályokat, a juxtacelluláris elvezetésekben anatómiaiailag identifikált interneuron csoportokhoz (Czurkó, et al., 2006).

A GD szemcsesejtjeinek aktivitását az állat viselkedésének tükrében is vizsgáltuk. Vizsgálatainkból úgy tűnik, hogy szemcsesejtek magatartással korrelált aktivitásának legjellegzetesebbike a helyhez kötött aktivitás. Az 5. ábra 3 GD szemcsesejt és egy interneuron place map-jét, akciós potenciál mintázatát, interspike intervallum histogramját (ISI) és autokorrelogramját mutatja. Amint azt az 5. ábra is mutatja, a GD szemcsesejtek place field-je elég kicsi (első oszlop), vagy többszörös (második oszlop). A többszörös place field felveti, hogy esetleg két vagy több alacsony frekvenciával tüzelő szemcsesejt jelenik meg azonos akciós potenciál mintázattal a tetrode elektródon.



5. ábra

Az 5. ábra harmadik oszlopa valamivel magasabb átlagos tüzelési frekvenciát mutat (2.03 Hz), homogén place field-et. Az 5 ms-os ISI megfelelő refrakteritást mutat az 500 ms autokorreláció fenntartott aktivitása azonban felveti, hogy esetleg több GD szemcsesejt együttes aktivitásáról lehet szó. A negyedik oszlopban egy interneuron látható. Mindezek felvetik, hogy GD-ba érkező helyi kapcsolatos információ mi módomban kerül feldolgozásra a GD szemcsesejtjein, hogy az igen alacsony frekvenciával tüzelő sejtek valódi place sejtek e, vannak e többszörös place field-ű ill. nagyobb place field-ű sejtek, vagy ezek több sejt együttes szinkron működéséből adódnak (Czurkó et al., in preparation).

A krónikus elvezetésekkel készült kísérletekben az elvezetett sejtek pontosabb szövettani identifikálása jelent nehézségeket, mert a konvencionális szövettannal az elektródok hegyének pontos elhelyezkedése nagyon nehezen állapítható meg. Ez különösen fontos a GD területéről végzet elvezetésekkel kapcsolatban, ahol a szemcsesejtek aktivitás mintázat alapján történő identifikálása bizonytalanabb. Az elektródák hegyének pontosabb lokalizálására ill. az elektróda hegye körül elhelyezkedő sejtek karakterizálására egy új megközelítést kezdtünk alkalmazni, a Gallyas-féle sötét sejt ezüstöző módszerrel. Az elképzelés lényege, hogy a

elvezetések befejezése után, a mikroelektródákra megfelelő ingerlő áramot adva az elektródák körüli sejtek sötét állapotba hozhatók (a cytoskeleton kollabál) és így a sötét idegsejt ezüstöző módszerrel megfesthetők. E módszer alkalmazása közelebb vihet minket a DG szemcsesejtek „téri viselkedésével” kapcsolatos bizonytalanságok tisztázásához (Czurkó et al., in preparation).

Mint a jelentésből látható, a pályázattal kapcsolatos jelentős eredményeink publikálása még folyamatban van, ezért kérjük, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa a 2 éven belül megjelent közlemények figyelembevételével.

Idézett irodalom

- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Mamiya A, Buzsaki G (1999) Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J Neurosci* 19:274-287.
- Klausberger T, Marton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P (2004) Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci* 7:41-47.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844-848.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P (2005) Complementary roles of cholecystinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25:9782-9793.

Kapcsolódó saját közlemények

Czurkó A, Tóth A, Hernádi I, Máthé K, Szabó I
Egyszerű microdrive megoldások viselkedő állatokon történő multiunit elvezetésekhez.
Neurobiology, (Bp.), MITT, 2001

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

Czurkó A; Huxter J; Tóth A; Muller RL
Identification of interneuron types and probable dentate granule cells in extracellular multiunit recordings from the dorsal hippocampus of behaving rats
MITT 2005

Szabó I, Máthé K, **Czurkó A**, Tóth A
Testing a digital swivel technology for multi-site recording of hippocampal field potentials and multiple unit activity
EBBS 2005

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, 2006, Submitted