

Hippocampalis principális sejtek és interneuronok szinaptikus kapcsolatrendszerének kvantitatív elemzése

Doktori értekezés

Tresóné Takács Virág

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Gulyás Attila, PhD, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Puskár Zita, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Wittner Lucia, PhD, tudományos főmunkatárs

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csillag András, PhD, az MTA doktora, egyetemi tanár,
intézetigazgató

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Halasy Katalin, PhD, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Kiss József, PhD, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Budapest, 2012

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. BEVEZETÉS	8
2.1. A HIPPOCAMPALIS FORMATIO FUNKCIÓI	8
2.2. A HIPPOCAMPALIS FORMATIO SZERKEZETE ÉS KAPCSOLATRENDSZERE	9
2.2.1. <i>A hippocampalis formatio rétegei és sejtípusai</i>	<i>9</i>
2.2.2. <i>A hippocampalis formatio és az entorhinalis kéreg kapcsolata.....</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>A gyrus dentatus és a CA3 régió kapcsolatrendszere</i>	<i>12</i>
2.2.4. <i>A CA1 régió kapcsolatrendszere</i>	<i>13</i>
2.3. A HIPPOCAMPUS INTERNEURONJAI.....	15
2.3.1. <i>A periszomatikus régiót beidegző interneuronok</i>	<i>15</i>
2.3.2. <i>A dendritikus régiót innerváló interneuronok.....</i>	<i>15</i>
2.3.3. <i>Projekciós interneuronok</i>	<i>17</i>
2.3.4. <i>Interneuron-szelektív sejtek.....</i>	<i>18</i>
2.4. KÜLÖNBÖZŐ INTERNEURON-TÍPUSOK ELTÉRŐ BEMENETI TULAJDONSÁGAI	19
2.5. HIPPOCAMPALIS AKTIVITÁSMINTÁZATOK.....	21
2.6. A HIPPOCAMPUS ÉS AZ MS-DB KAPCSOLATA	21
2.7. A HIPPOCAMPO-SEPTALIS SEJTEK TULAJDONSÁGAI.....	24
3. CÉLKITŰZÉSEK	29
4. MÓDSZEREK	31
4.1. HOZZÁJÁRULÁS	31
4.2. PÁLYAJELÖLŐ ANYAG BEADÁSA MŰTÉTI ELJÁRÁSSAL.....	31
4.2.1. <i>Vetítő sejtek jelölése sejtreakonstruksió céljából.....</i>	<i>32</i>
4.2.2. <i>Kettős retrográd sejt-, és anterográd pályajelölés.....</i>	<i>32</i>
4.2.3. <i>Anterográd pályajelölés</i>	<i>34</i>
4.3. <i>IN VITRO</i> INTRACELLULÁRIS SEJTJELÖLÉS.....	34
4.4. <i>IN VIVO</i> JUXTACELLULÁRIS SEJTJELÖLÉS	35
4.5. PERFÚZIÓ ÉS FIXÁLÁS	35
4.6. METSZÉS ÉS A METSZETEK ELŐKEZELÉSE	36
4.7. A JELÖLT SEJTEK MEGJELENÍTÉSE.....	36

4.7.1. Kettős fluoreszcens PHAL/mikrogyöngy jelölés.....	36
4.7.2. BDA-jelölt sejtek fluoreszcens megjelenítése	37
4.7.3. PHAL-jelölt rostok megjelenítése fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatra	37
4.7.4. A biocytin-, neurobiotin-, és BDA jelölt sejtek megjelenítése fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatra.....	38
4.8. A METSZETEK UTÓKEZELÉSE	38
4.9. BEÁGYAZÁS UTÁNI IMMUNARANY JELÖLÉS GABA ELLEN	39
4.10. BDA-JELÖLT SEJTEK FÉNYMIKROSZKÓPOS REKONSTRUKCIÓJA.....	40
4.11. BDA-JELÖLT SEJTEK BEMENETI TULAJDONSÁGAINAK ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA	41
4.12. HIPPOCAMPALIS PIRAMISSEJTEK ÉS HS SEJTEK CÉLELEM SZELEKTIVITÁSÁNAK ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA	43
4.13. ENTORHINALIS ROSTOK CÉLELEM SZELEKTIVITÁSÁNAK ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA	44
4.14. STATISZTIKA.....	45
5. EREDMÉNYEK.....	46
5.1. A CA1 RÉGIÓ GLUTAMÁTERG PÁLYÁINAK SZINAPTIKUS KAPCSOLATAI.....	46
5.1.1. A CA1 piramissejtek lokális rostjainak fő posztzinaptikus célelemei interneuronok	46
5.1.2. A Schaffer kollaterálisok túlnyomórészt piramissejteket idegeznek be	50
5.1.3. Az entorhinalis rostok különböző célelem-eloszlást mutatnak a str. lacunosum-moleculare területén és a rétegen kívül	52
5.1.4. A CA1 régió glutamáterg bemeneteinek statisztikai összehasonlítása.....	55
5.2. A HS SEJTEK SZINAPTIKUS KAPCSOLATAI.....	58
5.2.1. HS sejtek típusai és előfordulási helyük	58
5.2.1.1. A CA1 régió HS sejtjei ritkán-tüskések	58
5.2.1.2. A HS sejtek mindkét típusa előfordul a CA3 régióban	60
5.2.1.3. A hilaris HS sejtek csoportja heterogén	62
5.2.2. A HS sejtek reciprok kapcsolatban állnak a septo-hippocampalis sejtekkel 63	
5.2.2.1. Az MS-DB-ből érkező jelölt rostok végződési mintázata a hippocampus területén	63

5.2.2.2. A HS sejteket dúsan beidegzi a GABAerg septo-hippocampalis pálya	66
5.2.2.3. A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejteket septo-hippocampalis pálya különböző mértékben idegzi be	70
5.2.3. A HS sejtekre érkező serkentő és gátló bemenetek konvergenciája	70
5.2.3.1. A ritkán-tüskés HS sejtek bemeneteinek elektronmikroszkópos vizsgálata	71
5.2.3.1.1. A ritkán-tüskés HS sejtek dendritjeit beidegző bemenetek	71
5.2.3.1.2. A ritkán-tüskés HS sejtek szómáját beidegző bemenetek	73
5.2.3.2. A sűrűn-tüskés HS sejtek bemeneteinek elektronmikroszkópos vizsgálata	82
5.2.3.2.1. A sűrűn-tüskés HS sejtek dendritjeit és szómáját beidegző bemenetek	82
5.2.3.3. A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtek különböző mennyiségű és arányú serkentő és gátló bemenetet kapnak	85
5.2.4. A HS sejtek lokális axonjai és posztszinaptikus célelemei.....	86
5.2.4.1. A HS sejtek lokális axonfájának fénymikroszkópos jellemzői	87
5.2.4.2. A HS sejtek terminálisainak ultrastukturális jellemzői és posztszinaptikus célelemei	90
6. MEGBESZÉLÉS	92
6.1. A CA1 RÉGIÓBA ÉRKEZŐ SERKENTŐ PÁLYÁK KÜLÖNBÖZŐ CÉLELEM-SZELEKTIVITÁST MUTATNAK	92
6.1.1. A CA1 piramissejtek heterogén csoportot képeznek.....	93
6.1.2. A CA1 piramissejtek lokális kollaterálisai erős interneuron-szelektivitást mutatnak	94
6.1.3. A Schaffer kollaterálisok túlnyomórészt piramissejteket és egy nagyságrenddel kevesebb interneuront idegeznek be.....	97
6.1.4. Az entorhinalis rostok réteg-specifikus célelem-szelektivitást mutatnak.....	98
6.1.5. A CA3 és a CA1 régió külső és belső kapcsolatainak eltérő szerveződése	100
6.2. A HS SEJTEK KAPCSOLATRENDSZERE	101
6.2.1. A hippocampus és az MS-DB reciprok kapcsolata: a HS sejtek GABAerg bemeneteinek jelentős része az MS-DB-ből eredhet.....	102

<i>6.2.2. A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtekre érkező szinaptikus bemenetek denzitása és forrása</i>	104
6.2.2.1. Módszertani megfontolások	104
6.2.2.2. A ritkán-tüskés HS sejtek a lokális piramissejtek aktivitását mintavételezik.....	104
6.2.2.3. A sűrűn-tüskés HS sejtek fő bemenete a szemcsesejtektől ered	107
6.2.2.4. A hilaris HS sejtek.....	108
6.2.2.5. A HS sejtek lehetséges szerepe pathologicus folyamatokban	109
6.2.2.6 A ritkán-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumát beiddegző septalis rostok jelentősége	110
<i>6.2.3. A HS sejtek különböző célelem-szelektivitást mutathatnak</i>	111
<i>6.2.4. A CA1 HS sejtek kiterjedt, több agyterületre is vetítő axonfája</i>	113
7. KÖVETKEZTETÉSEK	115
8. ÖSSZEFOGLALÁS	118
9. SUMMARY	119
10. IRODALOMJEGYZÉK	120
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	143
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	144

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	avidin és biotinilált tormaperoxidáz komplexe
AIS	axon iniciális szegmentum
alv	alveus
BDA	biotinilált dextrán amin
BSA	bovine serum albumin (marha szérum albumin)
CA1 (2,3)	cornu ammonis (ammonszarv) 1 (2,3)-es régiója
CB	calbindin
CCK	cholecystokinin
CR	calretinin
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DABNi	3,3'-diaminobenzidin és nikkkel komplexe
GABA	gamma-aminovajsav
gr	granulosum
HIPP	hilaris perforáns pálya-asszociált (sejt)
HS	hippocampo-septalis
IPSC	gátló posztszinaptikus áram
IS-1 (2,3)	1-es (2-es, 3-as) típusú interneuron-szelektív (sejt)
l-m	lacunosum-moleculare
luc	lucidum
mGluR1α	metabotrop glutamát-receptor 1 α típusa
mol	moleculare
MOPP	molekuláris rétegben található perforáns pálya-asszociált (sejt)
MS-DB	a medialis septum és a Broca-féle diagonális köteg komplexuma
NPY	neuropeptid Y
O-LM	oriens- lacunosum-moleculare (sejt)
ori	oriens
PB	foszfát puffer (0,1 M; pH 7,4)
PHAL	<i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinin
PV	parvalbumin
pyr	pyramidale

rad	radiatum
S	stratum (réteg)
SD	standard deviation, standard szórás
str	stratum (réteg)
TB	Tris puffer (0,05 M; pH 7,6)
TBS	Tris-pufferelt fiziológias sóoldat (0,05 M; pH 7,4)

2. BEVEZETÉS

A hippocampalis formatio a limbikus rendszer részét képező agykérgi terület, amelynek két legfontosabb feladata az epizódikus memórianyomok létrehozása (Scoville és Milner, 1957) és a térbeli térképezés (O'Keefe és Nadel, 1978). Más agykérgi területekkel összehasonlítva viszonylag egyszerűbb felépítésének köszönhetően az egyik legideálisabb agyterület a struktúra és funkció közötti viszonyok, törvényszerűségek vizsgálatára. Ahhoz azonban, hogy ezeket az összefüggéseket megérthessük az anatómiai sajátságok minél részletesebb, kvantitatív ismeretére van szükség. Doktori munkám során a hippocampalis formatio principális sejtjeinek és interneuronjainak kapcsolatrendszerét tanulmányoztam kvantitatív neuroanatómiai módszerekkel. Részt vettem annak a kérdésnek a vizsgálatában, hogy a hippocampus CA1 régiójába érkező fő serkentő pályák mekkora arányban idegeznek be piramis sejteket és interneuronokat. Emellett meghatároztam egy hippocampalis GABAerg sejt típus, a hippocampo-septalis (HS) sejtek szinaptikus kapcsolatainak kvantitatív jellemzőit.

2.1. A hippocampalis formatio funkciói

A hippocampalis formatio ősi, archicorticalis eredű agykérgi terület, amely több alapvető kognitív feladatban részt vesz (Acsády és Káli, 2003). Amnéziás betegek vizsgálata világított rá nélkülözhetetlen szerepére a memóriefolyamatokban (Scoville és Milner, 1957). A terület léziója esetén a betegek anterográd-, és retrográd amnéziában szenvednek, amely elsősorban az epizódikus memóriát (személyes emlékek felidézése) érinti. A betegek a lézió előtt történt események egy részére jól emlékeznek, ami azt jelenti, hogy ezek az emlékek feltehetőleg már más agykérgi területeken tárolódnak és a hippocampusztól függetlenül is előhívhatóak. Ezek az emléknymokokon már lejátszódott az ún. memóriakonzolidáció folyamata, amelyhez feltehetőleg a hippocampusban kialakult aktivitásmintázatok többszöri újraaktiválódása szükséges (McClelland és mtai, 1995).

Az 1970-es években O'Keefe és Nadel szabadon mozgó patkányok hippocampusából egy-sejt aktivitást elvezetve olyan sejteket találtak, amelyek az állat

rendelkezésre álló terület egy körülhatárolható részén jóval nagyobb frekvenciával tüzeltek, mint máshol (O'Keefe és Nadel, 1978). A későbbi kísérletek során kiderült, hogy ezeknek az ún. helysejteknek a tüzelési frekvenciája, illetve a kisüléseik hippocampalis theta oszcillációhoz való viszonya egyaránt résztvesz az állat pontos térbeli helyzetének kódolásában (O'Keefe és Recce, 1993; Huxter és mtsai, 2003). Térbeli modulációt mutató sejteket azóta más agyterületeken is találtak (pl. az entorhinalis kéregben: Fyhn és mtsai, 2004), de mindezek alapján a hippocampus fontos szerepet tölt be a tájékozódásban is.

Az említett feladatokkal összefüggésben a hippocampus részt vesz a különböző modalitású ingerek egymáshoz társításában, az összetett reprezentációk egyedi kódolásában (Murray és Mishkin, 1984).

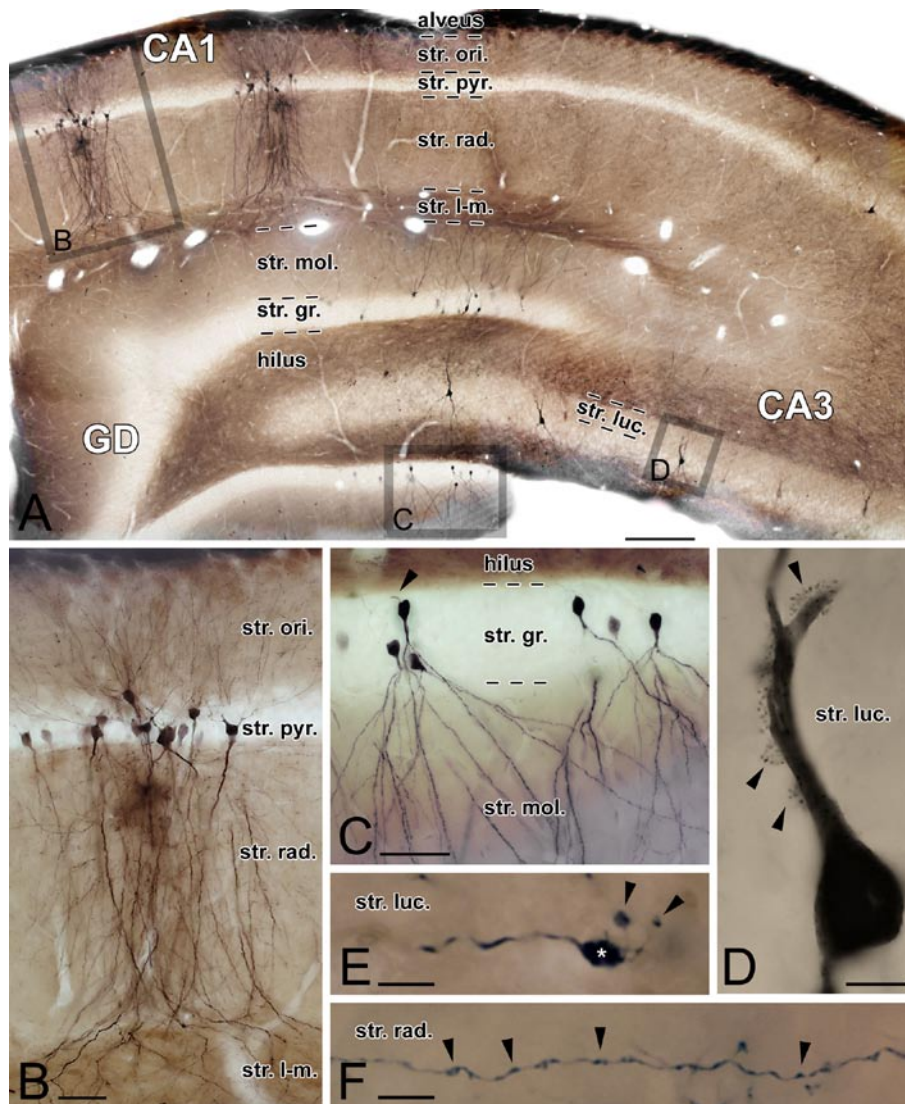
2.2. A hippocampalis formatio szerkezete és kapcsolatrendszere

2.2.1. A hippocampalis formatio rétegei és sejttípusai

A hippocampalis formatio jellegzetes lamináris szerkezetet mutat, amit a principális sejtek dendritfájának egymással párhuzamos elrendeződése valamint az afferens és efferens pályák különböző rétegekbe szerveződése eredményez (1. ábra). Idegsejtjeinek többsége glutamáterg principális sejt (~90%), kisebb része pedig GABAerg interneuron (~10%; Woodson és mtsai, 1989). Az alábbiakban a rágszálók hippocampalis formatiojának szerkezetét ismertetem, mivel a különböző idegsejtek kapcsolatrendszerét patkányok hippocampusában tanulmányoztuk.

A hippocampalis formatio részei a keresztmetszetben két egymásba forduló „U” alakot képező gyurus dentatus és ammonszarv. A gyurus dentatus principális sejtjei a szemcsesejtek (1.C ábra), amelyek szómája a szemcsesejtrétegbe [stratum (str.) granulosum] tömörül, dendritjei pedig a molekuláris rétegben (str. moleculare) ágaznak szét. A szóma másik pólusán kilépő axonok a hilus nevű területen áthaladva jutnak a hippocampus CA3 területére.

A hippocampus proper vagy ammonszarv (cornu Ammonis) területét citoarchitektonikus szerkezete és a kapcsolatrendszere alapján Lorente de No longitudinálisan egymás mellett elhelyezkedő régiókra osztotta (a gyurus dentatus felől



1. Ábra. A hippocampalis formatio réteges szerkezete és principális sejtjei

A: A hippocampus és a gyrus dentatus rétegei patkányban. A különböző principális sejteket BDA-mikroinjekcióval jelöltük meg. B: CA1 piramis sejtek. C: Szemcsesejtek a gyrus dentatusban. A nyílhegy egy szemcsesejt axon eredési pontjára mutat. D: Egy CA3 piramis sejt komplex tüskéi a str. lucidumban (nyílhegyek). E: Egy szemcsesejt nagy mohaterminálisa (csillag), és az abból kiágazó filopodiális nyúlványok kisebb terminálisokkal (nyílhegyek). F: Egy CA3 piramis sejt axonkollaterálisa kis boutonokkal (nyílhegyek). Rövidítések: GD: gyrus dentatus, str. gr.: stratum granulosum, str. l-m.: stratum lacunosum-moleculare, str. luc.: stratum lucidum, str. mol.: str. moleculare, str. ori.: stratum oriens, str. pyr.: stratum pyramidale, str. rad.: stratum radiatum. Skálák: A: 200 μm , B és C: 50 μm , D: 10 μm , E és F: 5 μm .

Forrás: nem publikált saját ábra.

haladva: CA3, CA2, CA1; Lorente de No, 1934). Az ammonszarv principális sejtjei a piramissejtek (1.B ábra), amelyek szómája a str. pyramidaléba rendeződik, dendritfája pedig két részre különül: a basalis dendritek a str. oriensben ágaznak sugárszerűen szét, míg a szóma másik pólusán kilépő vastag proximalis dendrit, és az ebből ferdén kiágazó vékonyabb dendritek a str. radiatumban, az apicalis dendritfa distalis része pedig az e felett található lacunosum-moleculare rétegben helyezkedik el. Az ammonszarv oldalkamrákkal határos külső (legalsó) rétegét az alveus nevű rostköteg képezi, amely főként afferens és efferens myelinizált axonokból áll.

2.2.2. A hippocampalis formatio és az entorhinalis kéreg kapcsolata

A hippocampalis formatio fő serkentő bemenete az entorhinalis kéregből érkező perforáns pálya. Az entorhinalis kéreg a temporális lebeny része, amely „interface” szerepet tölt be a hippocampus és a neocortex között: Elsősorban a különböző multimodális asszociációs kéregrészekből érkező információt dolgozza fel és továbbítja a hippocampus formatio felé, majd az itt kialakított memórianyomok a memóriakonzolidáció során szintén az entorhinalis kérgen keresztül kerülhetnek a neocortexbe hosszabb távú tárolás céljára (Amaral és Lavenex, 2006). A perforáns pályának több anatómiailag és funkcionálisan egyaránt elkülönülő komponense van, amelyek az entorhinalis kéreg jól körülhatárolható területeiről és rétegeiből erednek (van Strien és mtsai, 2009). Az entorhinalis kéreg II. rétegében lévő tüskés csillagsejtektől eredő pálya a gyrus dentatus molekuláris rétegének külső kétharmadában és a CA3 régió lacunosum-moleculare rétegében végződik. A III. rétegi piramissejtek axonjai az ún. temporo-ammonicus pályát képezve a CA1 régiót és a subiculumot idegezik be (Steward és Scoville, 1976). A hippocampus CA1 régiójában és a subiculumban található piramissejtek visszavetítenek az entorhinalis kéreg mélyebb rétegeibe, reciprok kapcsolatot teremtve a két agyterület között (Amaral és Lavenex, 2006).

2.2.3. A gyrus dentatus és a CA3 régió kapcsolatrendszere

A hippocampalis formatio területén az információáramlás alapvetően egyirányú, a gyrus dentatus felől a CA1 felé halad (Amaral és Lavenex, 2006). A gyrus dentatus szemcsesejtjei elsősorban a CA3 régió piramissejtjeit és interneuronjait idegezik be egyedülálló morfológiájú rostjaikkal. Ezek a str. lucidum nevű, csak a CA3 területén megtalálható rétegben végződő ún. moharostok. Három különböző típusú terminálist lehet rajtuk megfigyelni: óriás méretű moharostterminálisokat, amelyek akár 10 μ m átmérőjűek is lehetnek, jóval kisebb méretű, 0,5- 2 μ m átmérőjű *en passant* boutonokat és filopodiális nyúlványokon ülő terminálisokat (1.E ábra; Ramon y Cajal, 1911; Acsády és mtsai, 1998). Egy szemcsesejt óriás mohaterminálisainak száma 10-18 db a CA3 régió területén, és ezek mindegyike egy-egy CA3 piramissejtet idegez be, 30-40 szinapszist létesítve a sejt proximalis dendritjein ülő dúsán elágazó ún. komplex tüskékkel (1.D ábra; Blackstad és Kjaerheim, 1961; Chicurel és Harris, 1992). Jóval több kisméretű bouton van, amelyek kizárólag interneuronokat innerválnak, általában egy-egy szinapszist formálva velük (1.E ábra; Acsády és mtsai, 1998). Ez a hálózati elrendeződés azt eredményezi, hogy a szemcsesejtek nagy precizitással képesek továbbítani az információt a posztszinaptikus piramissejteknek (Henze és mtsai, 2002; Acsády és Káli, 2007). A szemcsesejtek a CA3 régió neuronjai mellett beidegzik a hilusban található glutamáterg mohasejteket és GABAerg interneuronokat is. A mohasejtek visszavetítenek a gyrus dentatusba, ahol a molekuláris rétegben a szemcsesejtek dendrittüskéivel szinaptizálnak (Amaral és Lavenex, 2006).

A CA3 piramissejtek rendkívül kiterjedt, szinte a teljes hippocampust behálózó (összességében akár fél méter hosszú) axonfával rendelkeznek (Sik és mtsai, 1993; Wittner és mtsai, 2007), amely több tízezer további piramissejttel formál szinaptikus kapcsolatot kisméretű boutonjaival (1.F ábra). A CA3 piramissejtek egyfelől nagy számú lokális rekurrens kapcsolatot létesítenek további CA3 piramissejtekkel, megalkotva a memóriefolyamatokban nagy jelentőségű auto-asszociációs hálózatot, másrészt Schaffer kollaterálisaikkal a CA1 radiatum és oriens rétegeibe vetítenek (Schaffer, 1892), ahol a str. radiatum és oriens területén a serkentő bemenetek túlnyomó többségét adják (Amaral és Witter, 1989).

2.2.4. A CA1 régió kapcsolatrendszere

A CA1 piramis sejtek lacunosum-moleculare rétegben található distalis dendritjeit a az entorhinalis kéreg III. rétegének piramis sejtjei innerválják. A CA1 régió proximális részére (a CA2 mellett található terület) a medialis entorhinalis kéreg vetít, míg a distalis CA1 területére (a subiculum melletti rész) a lateralis entorhinalis kéregből érkeznek rostok (Steward, 1976; van Strien és mtsai, 2009). Ennek funkcionális jelentősége lehet, ugyanis pl. a térbeli helyzettől függő tüzelést mutató sejtek elsősorban a medialis entorhinalis kéregben fordulnak elő (Sargolini és mtsai, 2006). Az entorhinalis rostok két különböző útvonalon érik el a CA1 str. lacunosum-moleculare-t: A legtöbb rost a subiculumon keresztül érkezik a CA1 lacunosum-moleculare rétegébe, míg kisebb számú axon az alveuson keresztül haladva jut el a CA1 régióig (alvearis pálya), ahol éles kanyart vesz, majd radiálisan áthalad az oriens, pyramidale és radiatum rétegeken és csatlakozik a többi entorhinalis rosthhoz a str. lacunosum-moleculare-ban (Deller és mtsai, 1996). A str. radiatumban az apicalis dendritből kiágazó vékonyabb dendritek és a str. oriensben lévő basalis dendritek fő bemenetét a CA3 piramis sejtjeiktől eredő Schaffer kollaterálisok rendszere adja (Amaral és Witter, 1989). A szinapszisok száma alapján a Schaffer kollaterálisok lehetnek a CA1 piramis sejtjelek legjelentősebb bemenetei, hiszen a CA1 piramis sejtjelek ~30 000 glutamáterg bemenetének kb. 94%-a a str. oriens és radiatum területén található, míg a maradék 6%-uk érkezik csak a str. lacunosum-moleculare-ba (Megias és mtsai, 2001). Az entorhinalis kérgi sejtek alapaktivitása viszont jóval magasabb a CA3 piramis sejtjelekénél (Sargolini és mtsai, 2006; Leutgeb és mtsai, 2007), így a pálya CA1 piramis sejtjelekre gyakorolt hatása akár jelentősebb is lehet (Ahmed és Mehta, 2009). Mindkét pálya léziója esetén megmarad a CA1 régió helysejtjeinek aktivitása (Brun és mtsai, 2002, 2008; Nakashiba és mtsai, 2008), de tüzelési tulajdonságaik változnak (a tüzelés diffúzabbá válik, a helymező nagyobb lesz), így a helymező kialakulása a két bemenet együttműködésének eredménye lehet. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy az perforáns pálya által kiváltott dendritikus spike-ok a velük egyidejűleg aktív Schaffer kollaterálisok kapuzó hatásának köszönhetően juthatnak el a szómáig, ahol akár akciós potenciált is kiválthatnak (Ahmed és Mehta, 2009).

A két fenn említett pálya mellett a CA1 régió glutamáterg bemenetet kaphat a thalamus reuniens magjából, amely a str. lacunosum-moleculare-ba vetít (Wouterlood és mtsai, 1990), a perirhinalis kéregből (Naber és mtsai, 1999) és az amygdalából is (Pikkarainen és mtsai, 1999). Nemrégiben a medialis septumban és a medialis raphe magvakban is kimutattak a CA1 régióba vetítő glutamáterg sejteket (Colom és mtsai, 2005; Varga és mtsai, 2009; Huh és mtsai, 2010). A CA1 régió glutamáterg bemeneteinek többségét adó Schaffer kollaterálisok és entorhinalis rostok a piramis sejtek mellett GABAerg interneuronokat is beidegeznek (Desmond és mtsai, 1994; Kiss és mtsai, 1996; Wittner és mtsai, 2006). Ennek köszönhetően aktivitójuk diszinaptikus feed-forward (előre csatoló) gátlást is kivált, amelynek nélkülözhetetlen szerepe van hálózati aktivitás szabályozásában (Buzsáki, 1984; Pouille és Scanziani, 2001; Ferrante és mtsai, 2009; Pouille és mtsai, 2009). A CA3 piramis sejtekkel ellentétben a CA1 piramis sejtek csak kisméretű lokális axonrendszerrel rendelkeznek (Knowles és Schwartzkroin, 1981b; Tamamaki és mtsai, 1987; Tamamaki és Nojyo, 1990), de egy sor egyéb kérgi és subcorticalis területre vetítenek, így a hippocampus fő kimenetéért felelősek (Cenquizca és Swanson, 2006, 2007). Kevés lokális axonkollaterálisuk az alveus és a str. oriens határán fut, ahol piramis sejteket és interneuronokat is beidegez (Buhl és mtsai, 1994; Deuchars és Thomson, 1996). Utóbbiak a felelősek a CA1 piramis sejtek ingerlés során bekövetkező erős feed-back (visszacsatoló) gátlásáért (Andersen és mtsai, 1963). Meglepő módon, *in vitro* szeletpreparátumban több sejtől történő elvezetés során preszinaptikus CA1 piramis sejtek posztzinaptikus célsejtjei között sokkal nagyobb arányban találtak interneuronokat mint lokális piramis sejteket az utóbbiak egy nagyságrenddel nagyobb száma ellenére (Knowles és Schwartzkroin, 1981a; Lacaille és mtsai, 1987; Deuchars és Thomson, 1996). Ez jelezheti azt, hogy a CA1 piramis sejtek axonjai preferenciálisan interneuronokat idegeznek be. A CA1 piramis sejt rostok keskeny végződési területén a str. oriens és alveus határán valóban sok olyan interneuron található, amely ebben a két rétegben húzódó horizontális dendritekkel rendelkezik (Maccaferri, 2005), és bemenetei többségét szelektív léziós kísérlet szerint a CA1 piramis sejtektől kapja (Blasco-Ibáñez és Freund, 1995). A CA1 régió intenzív kutatása ellenére korábban nem volt ismert pontos adat az ide érkező különböző glutamáterg pályák és a lokális piramis sejt axonok interneuronokat és piramis sejteket beidegző szinapszisainak arányáról.

2.3. A hippocampus interneuronjai

A fenn röviden bemutatott sejhálózatban változatos morfológiájú és viselkedésű interneuronok is vannak, amelyeket igen fontos szerepűek a hálózati működés szabályozásában, a különböző hippocampalis aktivitásmintázatok kialakításában. Ramon y Cajal és Lorente de No munkája nyomán vált ismerté ennek a sejtcsoportnak a morfológiai sokfélesége, amely megalapozza a különböző típusok eltérő kapcsolatrendszerét és funkcióját (Ramon y Cajal, 1911; Lorente de No, 1934). Ma az interneuronok osztályozása figyelembe veszi a csoportokra jellemző elektrofiziológiai tulajdonságokat és neurokémiai jellemzőket is (Freund és Buzsáki, 1996). A legújabb klasszifikáció csak a CA1 területén 21 különböző típusú interneuront tart számon (Klausberger és Somogyi, 2008; Somogyi, 2010), amelyek mind-mind különféle szerepre specializálódtak a hippocampus működésében. A következő részben azokat a hippocampalis interneuronokat mutatom be röviden, amelyek a dolgozatban később említésre kerülnek.

2.3.1. A periszomatikus régiót beidegző interneuronok

Ebbe a csoportba tartoznak a parvalbumin tartalmú axo-axonikus sejtek, amelyek a piramissejtek axon iniciális szegmentumát idegezik be (2. ábra; Somogyi és mtsai, 1983), valamint a szómát és a proximalis dendriteket innerváló parvalbumin- (Kawaguchi és Hama, 1987; Kosaka és mtsai, 1987), és CCK-tartalmú kosársejtek (Kosaka és mtsai, 1985).

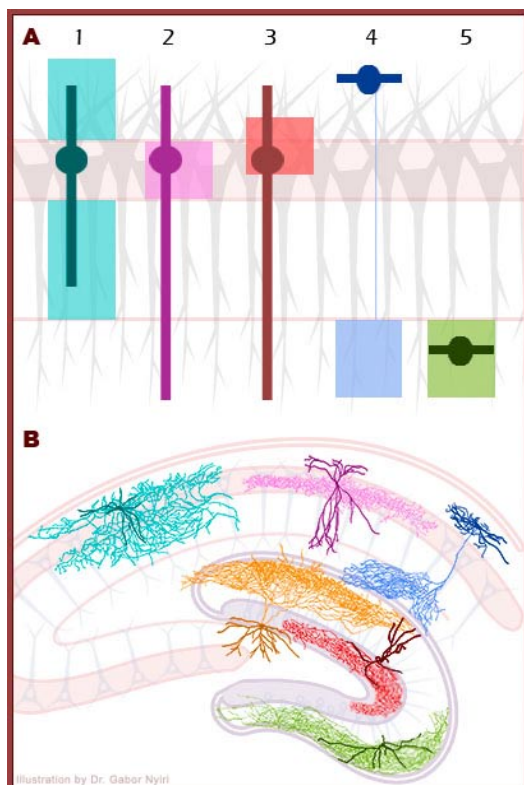
A két kosársejt populáció jellegzetes fiziológiai, morfológiai és neurokémiai különbségeket mutat, amelyek megalapozzák eltérő funkcionális jelentőségüket (Freund és Katona, 2007).

2.3.2. A dendritikus régiót innerváló interneuronok

A következő heterogén csoportba változatos sejtípusok tartoznak, amelyek közös jellemzője, hogy elsősorban a piramissejtek dendritjeit idegezik be (Klausberger, 2009). Többségük axonfája túlnyomó részben egy adott glutamaterg pálya végződési

területén helyezkedik el, így specifikusan ennek a pályának a bemeneteit szabályozza a posztszinaptikus piramissejteken (2. ábra).

Az *O-LM sejtek* (*oriens-lacunosum-moleculare*, 2. ábra) dendritfája horizontális elrendezésben a str. oriensben található a CA1 területén (McBain és mtsai, 1994; Maccaferri és McBain, 1995; Sik és mtsai, 1995), míg a CA3-ban a str. radiatumban is előfordulhat (Gulyás és mtsai, 1993). Ez arra utal, hogy glutamáterg bemeneteit mindkét területen túlnyomórészt a lokális piramissejtektől kapja, ami a CA1 területén közvetve bizonyítást is nyert (Blasco-Ibáñez és Freund, 1995). Axonfájuk az entorhinalis rostok végződési területén, a str. lacunosum moleculare-ban arborizál, ahol a distalis piramissejt dendriteket idegezi be (Katona és mtsai, 1999; Maccaferri és mtsai, 2000). Jellemző markereik a somatostatin (Naus és mtsai, 1988), az mGluR1 α receptor (Baude és mtsai, 1993), és kis mennyiségben parvalbumint is tartalmaznak (Klausberger és mtsai, 2003). A gyrus dentatusban funkcionálisan ennek a sejtípusnak feleltethető meg a *HIPP sejt* (*hilaris perforáns pálya-asszociált*, 2. ábra), amely dendritfája a hilusban, a szemcsesejtek lokális rostjaival egy rétegben helyezkedik el, axonjaival pedig a szemcsesejtek dendritjeit idegezi be a molekuláris réteg külső kétharmadában, vagyis a perforáns pálya végződési területén (Halasy és Somogyi, 1993; Han és mtsai, 1993).



2. Ábra. A hippocampalis interneuronok morfofunkcionális sokfélesége

A: Jellemzőes hippocampalis interneuronok sematikus illusztrációja. A különböző típusú interneuronok (különböző színekkel jelölve) dendritjei (színes vonalak) és szómái (körök) különböző rétegekben helyezkedhetnek el, így szinaptikus bemeneteik között más-más pályák dominálhatnak. Axonjaik szintén különböző területeken arborizálhatnak (átlátszó színes téglalapok), így a principális sejtek (szürke) más-más részeit innerválhatják. A bistratified sejtek (1) a str.

oriens és str. radiatum dendritikus rétegeket idegezik be, és elkerülik a periszomatikus régiót. A kosársejtek (2) a principális sejtek szómáját és proximalis dendritjeit innerválják. Az axo-axonikus sejtek (3) a principális sejtek axon iniciális szegmentumával létesítenek szinaptikus kapcsolatot. Az O-LM- (4, az ammonszarv területén), és HIPP (a gyrus dentatusban) sejtek a distalis dendriteket idegezik be, horizontális dendritfájuk pedig a lokális principális sejtek axonágaival azonos rétegben található (a CA1 területén a str. oriensben, a gyrus dentatusban a hilusban). A MOPP sejtek (5) szintén a szemcsesejtek distalis dendritjeit idegezik be a molekuláris rétegben, de dendritjeik is ezen a területen találhatóak. B: A fenn vázlatosan ábrázolt sejtípusok egy-egy képviselőjének elhelyezkedése a hippocampalis formatióban. A fentivel azonos színben, sötétebb árnyalatban látható a dendritfa, világosabb árnyalatban pedig az axonfa. A narancssárga sejt egy HIPP sejt, ami a CA1 területén lévő O-LM sejttel (kék) azonos funkciót tölt be a gyrus dentatusban.

Forrás: <http://www.scholarpedia.org/article/Interneurons>, Dr. Nyíri Gábor ábrája.

A *neurogliaform* sejtek gliasejtére emlékeztető, kis kiterjedésű, de sűrű dendritfája az axonfával együtt a lacunosum-moleculare és radiatum rétegben helyezkedik el (Khazipov és mtsai, 1995; Vida és mtsai, 1998; Price és mtsai, 2005). Ezek az axonok rendkívül sűrű hálózatot képeznek, és főleg nem-szinaptikus boutonokat hordoznak (Vida és mtsai, 1998).

2.3.3. Projekciós interneuronok

Ebbe a kategóriába olyan GABAerg sejtek tartoznak, amelyek nem szigorú értelemben vett interneuronok, ugyanis lokális axonágaik mellett olyan vastagabb rostokkal is rendelkeznek, amelyek elhagyják az adott alrégiót, és a hippocampalis formatio más részeire és/vagy távolabbi agyterületekre is vetítenek. Távoli kapcsolataik révén fontos szerepük lehet a különböző funkcionálisan összetartozó agyterületek aktivitásának összehangolásában (Jinno, 2009). Az alábbiakban Jinno és mtsai terminológiáját használom (2007), amely szerint a retrohippocampalis területek elnevezés a hippocampalis formatioval funkcionálisan szorosan összetartozó, attól

caudalisan elhelyezkedő agyterületeket (subiculum, presubiculum, parasubiculum, entorhinalis kéreg) valamint az indusium griseumot és retrosplenialis kérget takarja.

Az ún. *radiatum-retrohippocampalis sejtek* a radiatum és lacunosum-moleculare rétegekben találhatóak, kevés lokális axonkollaterálisukkal együtt, és beidegzik a subiculum, presubiculum, retrosplenialis kéreg valamint az indusium griseum területét (Jinno és mtsai, 2007; Miyashita és Rockland, 2007). Legalább négy különböző típusú távoli területre vetítő és horizontális dendritekkel rendelkező interneuront írtak le a CA1 str. oriensben: A *trilaminaris sejtek* a CA1 három rétege mellett (oriens, pyramidale és radiatum) a subiculumba is vetítenek (Sik és mtsai, 1995; Ferraguti és mtsai, 2005). A CA3 területére és a gyrus dentatusba vetítenek vissza a *back-projection* sejtek (Sik és mtsai, 1994). Az *oriens-retrohippocampalis sejtek* a subiculumba és más retrohippocampalis területekre vetítenek (Jinno és mtsai, 2007). A *hippocampo-septalis sejtek* a medialis septumba projiciálnak, illetve a subiculumot és a CA3 területét is beidegezzhetik. Utóbbi sejttypusról -amely vizsgálatunk fő tárgya volt- a bevezetés utolsó fejezetében lesz bővebben szó.

2.3.4. Interneuron-szelektív sejtek

Az eddig ismertetett interneuronok axonvégződése a különböző célsejtek előfordulási valószínűségének megfelelően túlnyomórészt piramissejteket idegeznek be, és sokkal ritkábban létesítenek szinapszist interneuronokkal. Ezzel szemben az interneuron-szelektív sejtek specifikusan interneuronokat innerválnak. Legalább három típusuk előfordul a hippocampusban (*IS-1-3; 1-3 típusú interneuron szelektív sejt*), amelyeket jellegzetes réteg- és posztszinaptikus sejt-szelektivitásuk, elhelyezkedésük és neurokémiai marker tartalmuk alapján határoztak meg (Freund és Buzsáki, 1996). Calretinint és/vagy vazokatív intestinalis polipeptidet (VIP) tartalmaznak, és axo-dendritikus valamint dendro-dendritikus kapcsolatokkal hálózatot képeznek egymással (Gulyás és mtsai, 1996). A három típus közül VIP-t és calretinint egyaránt kifejező *IS-3 sejteket* említtem a dolgozatban, amelyek szómája a radiatum- vagy a pyramidale rétegben található (Acsády és mtsai, 1996). Bipoláris dendritfájuk a str. lacunosum-moleculare-ban a leginkább kiterjedt, így fő bemenetüket az entorhinalis kéreg adhatja. Axonkollaterálisuk a str. oriens és alveus határán futnak, ahol mGluR1 és calbindin-

pozitív sejteket idegeznek be, így fő célelemeik az itt lévő horizontális sejtek (köztük az O-LM sejtek) lehetnek (Acsády és mtsai, 1996; Ferraguti és mtsai, 2004).

2.4. Különböző interneuron-típusok eltérő bemeneti tulajdonságai

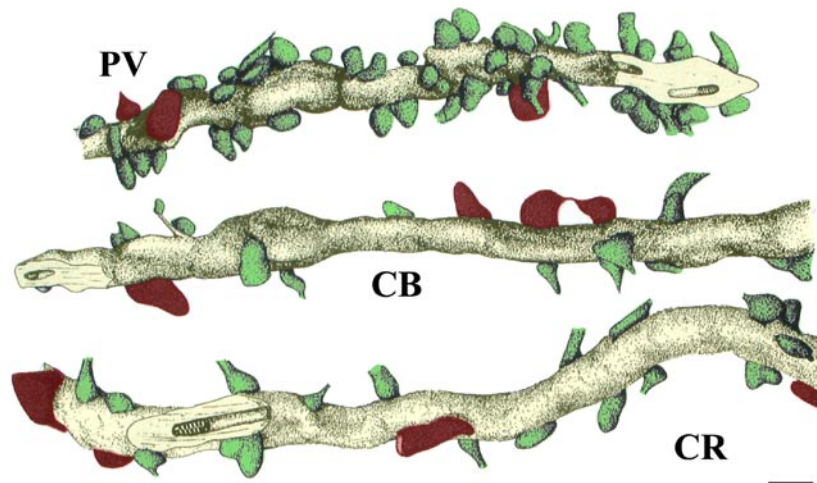
A hippocampus réteges szerkezetének köszönhetően egy adott interneuron szinaptikus bemeneteinek eredetét elsősorban a sejt szómájának és dendritfájának elhelyezkedése határozza meg (2. ábra; Freund és Buzsáki, 1996; Somogyi és Klausberger, 2005). Ez azonban nem kizárólagos érvényű, hiszen több hippocampalis bemenet célsejt-szelektív; bizonyos típusú sejteket szelektíven beidegez, míg másokat elkerül. A CA3 piramissejtek rostjairól például kimutatták, hogy az előfordulási valószínűségükhöz képest alacsony arányban idegezik be a tüskés, mGluR1 α -pozitív interneuronokat (Wittner és mtsai, 2006). Erős szelektivitást mutatnak a medialis raphe-ből érkező szerotonerg rostok is, amelyek míg mind a calbindin-, a CCK- vagy a NPY-tartalmú interneuronokat innerválják, nem létesítenek szinaptikus kapcsolatot a parvalbumin-pozitív sejtekkel (Freund és mtsai, 1990; Miettinen és Freund, 1992a, b). A hippocampalis interneuronok egymást is szelektíven idegezhetik be, gyakran preferálva az azonos típusú sejteket (Fukuda és mtsai, 1996; Gulyás és mtsai, 1996; Acsády és mtsai, 2000b). A bemeneti tulajdonságokban a dendritek morfológiája is eredményezhet különbségeket: bizonyos interneuronok tüskékkel rendelkeznek, amely nagymértékben megnövelheti a szinaptikus bemenetek fogadására rendelkezésre álló felületet (Gulyás és mtsai, 1992).

1. Táblázat. A különböző sejtcsoportok bemeneti tulajdonságai a CA1 régióban

Forrás: Gulyás és mtsai, 1999; Megias és mtsai, 2001; Mátyás és mtsai, 2004.

Sejttípus	Dendritfa hossza (μm)	Összes bemenet száma	GABAerg bemenetek aránya (%)
Piramissejt	12000	31700	5,3
PV-pozitív interneuron	4300	16300	6,4
CCK és VIP-pozitív kosársejt	6300	8200	35,9
CB-pozitív interneuron	3400	3800	29,4
CR-pozitív interneuron	2500	2200	20,7

CB: calbindin, CCK: cholecystokinin CR: calretinin, PV: parvalbumin, VIP: vazoaktív intestinalis polipeptid.



3. Ábra. A különböző típusú interneuronok eltérő bemeneti tulajdonságai

A különböző kalcium-kötő fehérjét (parvalbumin: PV, calbindin: CB és calretinin: CR) tartalmazó hippocampalis interneuronok dendritjeire (sárga) eltérő sűrűségben érkeznek a GABA-negatív (zöld) és GABA-pozitív (piros) bemenetek. A parvalbumin-pozitív dendrit felszínét sűrűn beborítják a vele szinaptizáló boutonok, míg a másik két típus ugyanolyan hosszúságú dendritszakaszra jóval kevesebb bemenetet kap. A GABA-pozitív bemenetek aránya a GABA-negatív terminálisokéhoz képest a calbindin, és calretinin tartalmú dendriteken magasabb, mint a parvalbumin-tartalmú dendriten. Skála: 1 μ m.

Forrás: Gulyás és mtsai, 1999, módosítva.

A fentiekből következhet az a Gulyás és mtsai által felfedezett jelenség, hogy különböző hippocampalis interneuronok dendritjeit eltérő sűrűségben borítják a rájuk konvergáló serkentő és gátló szinaptikus bemenetek (3. ábra, 1. táblázat; Gulyás és mtsai, 1999; Mátyás és mtsai, 2004). A bemenetek eltérő szerveződése jellegzetes különbségeket eredményezhet a sejtek integrációs képességeiben. Ezt a következő példával lehet bemutatni: A Schaffer kollaterálisok ingerlésével a CA1 piramisisejteken kiváltott diszinaptikus IPSC létrehozásában a PV-pozitív kosársejtek részt vesznek, míg a CCK-pozitív kosársejtek csak abban az esetben sülnek ki, ha az ingerlés elég nagy ahhoz, hogy a CA1 piramisisejtek is tüzeljenek (Glickfeld és Scanziani, 2006). Ez a

funkcionális különbség könnyen magyarázható azzal, hogy a PV-pozitív kosársejtek jóval kisebb mértékű gátlás mellett háromszor annyi serkentő bemenetet kapnak, mint a CCK-pozitív kosársejtek (1. táblázat; Gulyás és mtsai, 1999; Mátyás és mtsai, 2004), így kis számú rost ingerlése csak az előbbieket tudja aktiválni. Többek között ennek is köszönhető, hogy a CCK-pozitív kosársejtek nagyobb időablakban tudják integrálni bemeneteiket, aminek fontos jelentősége van a két kosársejttípus eltérő működésében (Freund és Katona, 2007). Ebből a példából is látható, hogy a különböző interneuronok bemeneti tulajdonságainak kvantitatív jellemzése elengedhetetlen a pontos neuronhálózati modellek létrehozásához, amelyek segítségével jobban megérthetjük az idegrendszer működését (Ascoli és Atkeson, 2005).

2.5. Hippocampalis aktivitásmintázatok

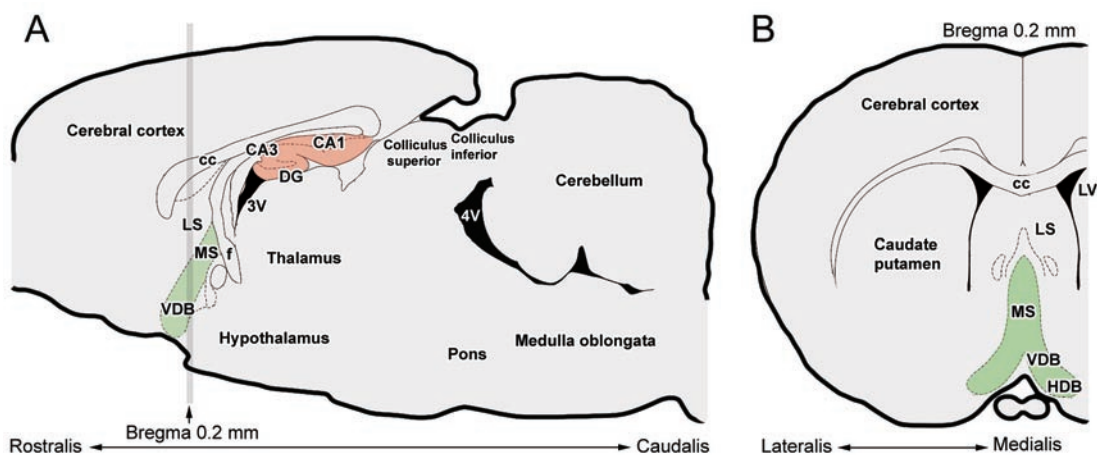
A principális sejtek párhuzamos elrendeződésének és bemeneteik rétegekbe való szerveződésének köszönhetően a hippocampusban a neuronok aktivitásának szinkron változásai lokális mezőpotenciálok formájában detektálhatók. Ezek jellege alapján két fő hippocampalis aktivitásmintázat különíthető el. Exploráció és REM alvás során 4-8 Hz frekvenciájú *theta aktivitás* figyelhető meg (Vanderwolf és mtsai, 1977; Buzsáki, 2002), amelybe magasabb frekvenciájú (40-100 Hz) gamma oszcilláció is ágyazódhat (Bragin és mtsai, 1995). Ezzel szemben táplálkozás, tisztálkodás és lassú hullámú alvás alatt nagy amplitúdójú *éleshullám aktivitás* detektálható, amelynek csúcsán 120-200 Hz frekvenciájú oszcilláció (ripples) jelenik meg (Ylinen és mtsai, 1995). A theta oszcilláció létrejötte valószínűleg az MS-DB működésének köszönhető (lásd a következő fejezetben), míg az éleshullám aktivitást feltehetőleg a CA3 piramissejtek generálják és közvetítik Schaffer kollaterálisaiakkal a CA1 régió felé (Csicsvari és mtsai, 2000). A hippocampalis oszcillációk kialakításáért elsősorban a hippocampusban található különböző interneuroncsoportok összehangolt működése felelős.

2.6. A hippocampus és az MS-DB kapcsolata

A septum a telencephalon elülső medialis része, amely lateralisán az oldalkamrákkal-, felülről pedig a corpus callosummal határos, hátul pedig a fornix

rostkötegen keresztül a hippocampushoz csatlakozik (4. ábra). Dorsalisabb része a lateralis septum, amely felülről és oldalról veszi körül a középvonalban elhelyezkedő területet, a medialis septumot (4. ábra). A medialis septumhoz csatlakozik ventralis irányban a Broca-féle diagonális köteg, amelynek vertikális és horizontális részével együtt a keresztmetszetben fordított „Y” alakú medialis septalis régiót alkotják (4.B ábra). A medialis septum és a diagonális Broca-köteg funkcionálisan összetartozó együttesét rövidíttem MS-DB-nek a dolgozatban.

A septum a limbikus rendszer részeként számos agyterülettel áll közvetlen kapcsolatban és így sokféle idegi hálózatnak fontos alkotórésze. Többek között a figyelemmel, az általános éberségi állapot beállításával, táplálékfelvétellel, agresszív és szexuális viselkedésekkel, thermoregulációval kapcsolatos működésekben játszik fontos szerepet (Risold, 2004). A továbbiakban a hippocampusszal való kétirányú kapcsolatára, valamint a theta oszillációban betöltött szerepére fókuszálok.



4. Ábra. A medialis septalis régió elhelyezkedése patkányagyban

A: A medialis septalis régió (zöld) és a hippocampalis formatio (piros) saggitalis metszeten. B: A medialis septalis régió (zöld) coronalis metszeten, az „A” ábrán szürke csikkal jelölt rostro-caudalis koordináta magasságában (A Bregma ponttól 0,2 mm-re rostralisan). Rövidítések: 3V: 3. agykamra, 4V: 4. agykamra, CA1-3: a cornu Ammonis 1-3 régiója, cc: corpus callosum, DG: gyrus dentatus, f: fornix, HDB: a Broca-féle diagonális köteg horizontális része, LS: lateralis septum, LV: oldalkamra, MS: medialis septum, VDB: a Broca-féle diagonális köteg vertikális része.

Forrás: Paxinos és Watson, 1998, módosítva.

A laterális septumba a CA1- és a CA3 piramissejtektől érkezik afferens bemenet, de sejtjei nem vetítenek a hippocampusba (Swanson és Cowan, 1977; Linke és mtsai, 1995), és csak gyengén projiciálnak az MS-DB területére (Leranth és mtsai, 1992). Az MS-DB reciprok kapcsolatban áll a hippocampusszal. Míg többféle, neurokémiaailag különböző sejtípus vetít az MS-DB-ből a hippocampusba, a visszafelé irányuló projekciót a hippocampalis GABAerg sejtek egy csoportja, a hippocampo-septalis (HS) sejtek hozzák létre (lásd később). Az MS-DB-ben a neurokémiaailag különböző sejtek hagymahéjszerűen rendeződnek el: a legkülső héjat calbindin-tartalmú sejtek alkotják, beljebb a calretinin-pozitív, majd a cholinerg sejtek rétege helyezkedik el, míg a középvonalban parvalbumin-immunreaktív sejtek találhatóak, amelyek intraseptalis konnektivitásuk alapján két további rétegre különülnek (Kiss és mtsai, 1990; Kiss és mtsai, 1997; Henderson és mtsai, 2004). A PV-pozitív sejtek GABAergiek és a hippocampusba vetítenek, ahol szelektíven interneuronokat idegeznek be az axonágaik mentén irregulárisan elhelyezkedő nagyméretű boutonjaikkal (Freund és Antal, 1988; Gulyás és mtsai, 1990). Az MS-DB cholinerg sejtjei szintén fontos részét képezik a septo-hippocampalis projekciónak (Lewis és Shute, 1967; Baisden és mtsai, 1984; Naumann és mtsai, 1992) a hippocampalis formatio cholinerg innervációjának túlnyomó többségét (80-90%) biztosítva (Wenk és mtsai, 1975). A hippocampusban található cholinerg terminálisok kisméretűek, gyakran nem formálnak szinapszisokat, és ha igen, akkor mind piramissejteket mind interneuronokat beidegezhetnek (Frotscher és Léránth, 1985; Umbriaco és mtsai, 1995).

In vivo az MS-DB cholinerg neuronjai ritkán tüzelnek, míg a PV-pozitív sejtek a hippocampalis theta oszcillációval fázis-kapcsolt ritmikus burst-tüzelést mutatnak (Borhegyi és mtsai, 2004; Simon és mtsai, 2006). Utóbbiak aktivitása *in vitro* kísérletek alapján a hippocampalis interneurok gátlásán keresztül hatva a hippocampalis piramissejtek diszinhibícióját idézheti elő (Tóth és mtsai, 1997). A legújabb közlemények szerint az MS-DB külső rétegei és caudalis része a hippocampusba vetítő glutamáterg sejteket is tartalmaz az előző két csoportnál kisebb számban (Sotty és mtsai, 2003; Colom és mtsai, 2005; Henderson és mtsai, 2010), amelyek *in vitro* serkentő hatást fejtenek ki a hippocampalis piramissejtekre (Huh és mtsai, 2010).

Régóta ismert, hogy a hippocampalis theta oszcilláció egyik fő generátora az MS-DB lehet, amely ezáltal fontos szerepet játszhat a memórianyomok létrehozásában,

a helyfelismerés folyamatában és a szenzomotoros integrációban (Winson, 1978; Bland és Oddie, 2001; Buzsáki, 2002). Bár a theta ritmus kialakulásának folyamata még nem tisztázott, a széles körben elfogadott modell szerint a theta oszcilláció során a cholinerg septo-hippocampalis sejtek hosszantartó depolarizáló hatást fejtenek ki a hippocampalis sejtekre, míg a GABAerg septo-hippocampalis sejtek ritmikusan gátolják a hippocampus interneuronjait, amelyek ritmikus diszinhíció révén a principális sejtek nagy csoportjának aktivitását ütemezik szinkron módon (Buzsáki, 2002). Ezt igazolja, hogy a theta oszcilláció alatt a PV-tartalmú pacemaker MS-DB sejtek aktivitásváltozásai megelőzik a hippocampalis interneuronok aktivitásváltozásait, valamint az utóbbiaknál is később megjelenő változásokat a hippocampalis mezőpotenciálokban (Hangya és mtsai, 2009). Az újonnan felfedezett glutamáterg septo-hippocampalis sejtek szintén szerepet játszhatnak a folyamatban, mert spontán ritmikus theta aktivitást mutathatnak *in vitro* (Huh és mtsai, 2010). A hippocampalis theta aktivitás kialakításáért és szabályozásáért további agyterületek, pl. az entorhinalis kéreg, nyúltvelői és diencephalicus területek (supramammilaris nucleus) is felelősek, de a ritmus létrehozása elsősorban valószínűleg az MS-DB pacemaker sejtjeinek köszönhető (Vertes és Kocsis, 1997; Buzsáki, 2002).

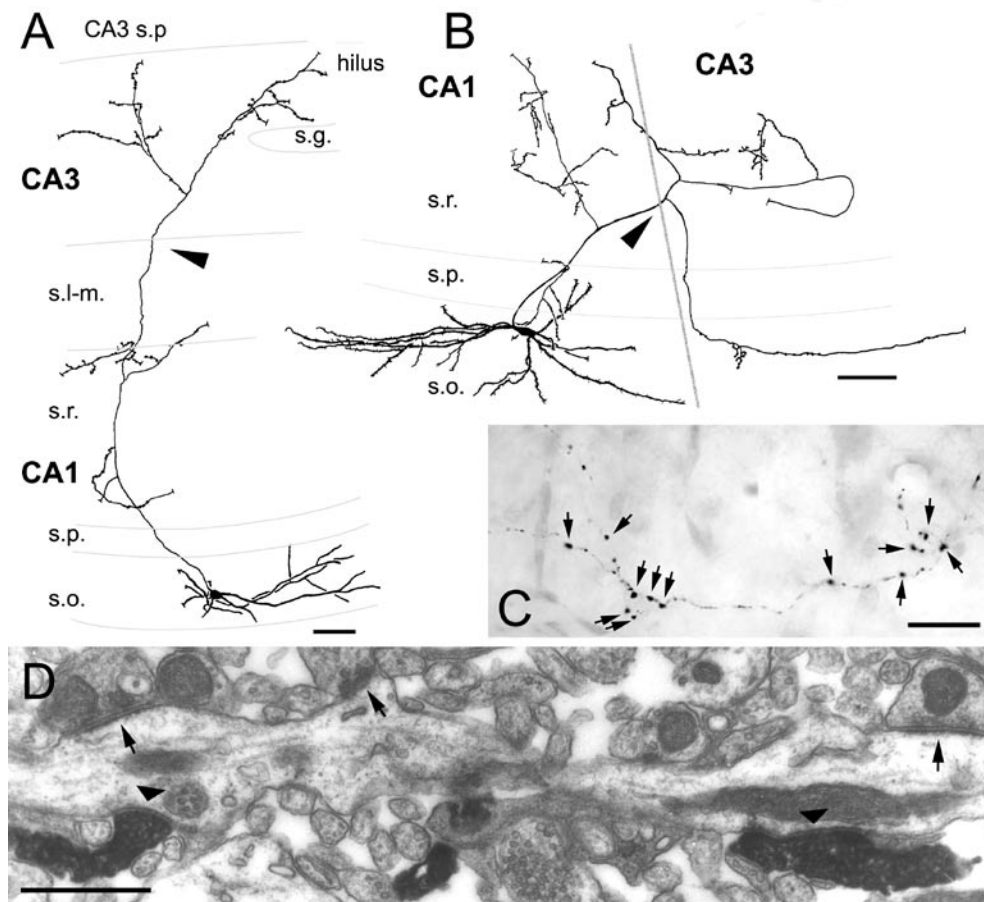
Az MS-DB és a hippocampus összehangolt aktivitásának szabályozásáért a hippocampo-septalis sejtek is felelősek (Manseau és mtsai, 2008), amelyekről a következő fejezetben írok bővebben.

2.7. A hippocampo-septalis sejtek tulajdonságai

Patkány medialis septumába történő retrográd tracer beadásával Alonso és Köhler azonosította először a hippocampo-septalis sejtek (HS) csoportját (Alonso és Köhler, 1982). Ezeket az MS-DB-be vetítő nem-principális sejteket a hippocampalis formatio minden régiójában megtalálták, de eloszlásuk réteg-specificitást mutatott: a CA1 területén főleg a str. oriensben-, a CA3 régióban több rétegben is-, míg a gyrus dentatusban kizárólag a hilusban fordultak elő. A sejtek a GABAerg interneuronokra jellemző ultrastrukturális bélyegekkkel rendelkeztek: sejtmagjuk membránján invaginációkat lehetett megfigyelni, szómáikat pedig aszimmetrikus szinapszisok borították (Totterdell és Hayes, 1987). Egérben a HS sejtek valóban glutaminsav

dekarboxiláz 67-pozitívnak bizonyultak (Jinno és Kosaka, 2002); patkányban pedig anterográdf tracerrel megjelölt septalis boutonjaikban sikerült kimutatni a GABA transzmitter jelenlétét (Tóth és mtsai, 1993). A medialis septum területén található terminálisaik szimmetrikus szinapszissal főleg parvalbumin-pozitív neuronokat és kisebb mértékben cholinerg sejteket idegeztek be (Gaykema és mtsai, 1991; Tóth és mtsai, 1993). Posztzinaptikus célelemeik között retrográdf tracerrel megjelölt, hippocampusba vetítő cholinerg és parvalbumin-pozitív sejteket is találtak, ezzel igazolva, hogy a medialis septum és hippocampus közötti kapcsolat ebben az irányban sejtpopuláció szinten is reciprok (Tóth és mtsai, 1993).

Különböző sejtjelölési módszerekkel egyedi HS sejtek dendrit- és axonfáját is sikerült megjeleníteni. Gulyás és mtsai (2003) fiatal patkányokban fluoreszcens mikrogyöngyöket injektáltak a MS-DB területére majd akut szeleteket készítettek a műtött patkányok hippocampusából. A CA1 területén, retrográdf úton feltöltődött, fluoreszcens mikrogyöngyöket tartalmazó sejtekből elektromos aktivitást vezettek el miközben biocytinnel töltötték fel őket. Az így megjelölt HS sejtek a horizontális interneuronok csoportjába tartoztak (Maccaferri, 2005), fuziform vagy ovális szómával és hosszú, a str. oriens és alveus területén húzódó dendritekkel rendelkeztek, amelyek ritkán ágaztak el (5.A és B ábra; Gulyás és mtsai, 2003). A dendritek elszórta tuskéket is hordoztak, és nagyszámú szinapszis borította őket. A sejtek hippocampalis axonágai a CA1 és a CA3 területén arborizáltak, ahol a korrelált elektronmikroszkópos vizsgálat alapján szelektíven GABAerg interneuronokat idegeztek be (5. ábra; Gulyás és mtsai, 2003). Ezzel szemben egy későbbi közlemény szerint felnőtt patkányban, a CA1 területén *in vivo* juxtacelluláris technikával feltöltött HS sejtek lokális célelemei között túlnyomórészt piramis sejtek vékony dendritjei voltak a str. oriens és radiatum területén (Jinno és mtsai, 2007). A Jinno és mtsai által megjelölt neuronok a septum irányába, rostralisán haladó axonág mellett rendelkeztek egy caudalis irányba tartó, a subiculumot innerváló kollaterálissal is, ezért ezek a sejtek a szerzőktől a „double projection cell” nevet kapták. Az extrahippocampalis területekre vetítő fő axon átmérője és myelinhüvelye jóval vastagabb volt, mint a piramis sejt axonoké (Jinno és mtsai, 2007). Ez a vastagabb myelinhüvelyű axonok gyorsabb vezetési képességének köszönhetően azt eredményezheti, hogy a double-projection sejtek által közvetített gátlás előbb érkezik meg a subiculumba mint a piramis sejt által közvetített serkentő szignál.



5. Ábra. A fiatal patkányokban *in vitro* megjelölt HS sejtek interneuron-szelektívek.

A, B: Két retrográd úton megjelölt majd biocytinnal feltöltött CA1 HS sejt dendrit-, és axonfája a hippocampus területén. A sejtek horizontális dendritfája a str. oriens területén található. Axonjaik nemcsak a CA1 régióban arborizálnak, hanem átlépnek a CA3 területére is a fissurán (A) vagy a CA2 régión (B) keresztül (nyílhegy). C: A boutonok (nyilak) nem egyenletesen, hanem egymástól szabálytalan távolságra helyezkednek el az axon mentén, és néhol kosárszerűen körülvesznek jelöletlen szómákat a piramisrétegen kívül, ami az interneuron-szelektív sejtek rostjainak jellegzetessége. D: A HS sejtek boutonjai interneuronokat idegeznek be. Az itt látható két biocytin-tartalmú axonterminális egy interneuron dendrittel létesít szinapszist (nyílhegyek). Az interneuront a további, dendritágra érkező szinapszisok alapján azonosították (nyilak). Rövidítések: s.g.: stratum granulosum,, s.l-m.: stratum lacunosum-moleculare, s.o.: stratum oriens, s.p.: stratum pyramidale, s.r.: stratum radiatum. Skálák: A és B: 100 μm , C: 10 μm , D: 1 μm .

Forrás: Gulyás és mtsai, 2003, módosítva.

Az *in vivo* megjelölt double-projection sejtek dendritfája nem különbözött az *in vitro* feltöltött HS sejtektől.

A HS sejtek csoportja a neurokémiai marker tartalom alapján is heterogénnek bizonyult (Jinno és Kosaka, 2002; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007). A HS sejtek neurokémiai karakterizálása során nemcsak regionális különbségeket figyeltek meg, hanem az azonos területen lévő sejtek is tartalmazhattak különböző markerkombinációkat (Jinno és mtsai, 2007). Specifikus HS sejt markert még nem sikerült találni, minden eddig vizsgált molekula más típusú, MS-DB-be nem vetítő interneuronokban is előfordult.

Szinte minden HS sejt somatostatin-pozitív [95%; (Zappone és Sloviter, 2001; Jinno és Kosaka, 2002; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007)], és nagy többségük a metabotrop glutamát receptorok 1 α típusát (mGluR1 α) is kifejezi [69% a CA1-, 84% a CA3 területén; (Jinno és mtsai, 2007)]. Egy csoportjuk a szomatodendritikus membránján M2 típusú muszkarinos acetilcholin receptorokat hordoz [~40%, (Hájos és mtsai, 1998; Jinno és mtsai, 2007)]. Acsády és mtsai *in situ* hibridizációval idegi növekedési faktor expresszióját mutatták ki a HS sejtek 60%-ban (Acsády és mtsai, 2000a). A HS sejtek a parvalbumin-pozitív interneuronokhoz hasonlóan az átlagosnál nagyobb mennyiségű citokróm c enzimmel rendelkeznek, amely magas metabolikus aktivitást jelezhet (Gulyás és mtsai, 2006). A neuropeptid Y (NPY) tartalom regionális különbségeket mutat: míg szinte minden HS sejtre jellemző a hilusban (92%), addig a sejtek 46% és 25%-ában mutatták ki a CA1 és a CA3 területén (Jinno és mtsai, 2007). A legelső HS sejtekben kimutatott neurokémiai marker a calbindin kalciumkötő fehérje volt (Tóth és Freund, 1992), ami az újabb közlemények szerint a sejtek körülbelül harmadában termelődik a CA1- és CA3 régióban, de nem fordul elő a hilus területén (Jinno és Kosaka, 2002; Jinno és mtsai, 2007). A CA3-ban és a hilusban a HS sejtek egy része calretinin kalcium-kötő fehérjét tartalmaz [49 és 34% (Gulyás és mtsai, 2003); 23 és 21% (Jinno és mtsai, 2007)]. A CA3 régióban calretinint kifejező HS sejtek szinte kizárólag a str. lucidumban fordulnak elő, és mind a hilusban mind a str. lucidumban a tüskés calretinin-pozitív sejtek csoportjába tartoznak (Gulyás és mtsai, 2003). Ezek a különleges interneuronok rendkívüli módon rétegspecifikus dendritfával rendelkeznek: összes dendritjük a moharostok végződési területén, a str. lucidumban vagy a hilusban található (Gulyás és mtsai, 1992). Nevüket a sűrűn-tüskés

szómájukról és dendritjeikről kapták, amelyeket nagyszámú aszimmetrikus szinapszis borít (Gulyás és mtsai, 1992). A str. lucidum tüskés sejtjeinek axonágai előfordulhatnak a CA3 minden területén, és a medialis septum mellett vetíthetnek a CA1 régióba és a gyrus dentatusba is (Spruston és mtsai, 1997; Martínez és mtsai, 1999; Szabadics és Soltesz, 2009).

A subiculumba is vetítő CA1 HS-sejtek (double-projection sejtek, lásd fenn) jellegzetes tüzelési mintázatot mutattak a különböző hippocampalis aktivitásmódok alatt *in vivo* (Jinno és mtsai, 2007). A theta aktivitás alatt, az oszcillációval fázis-kapcsoltan, alacsony frekvenciával ($0,7 \pm 0,6$ Hz) tüzeltek a piramisrétegben extracellularisan mért ciklus hullám völgyében. Ez a theta ritmus azon szakasza, amelyben a CA1 piramis sejtek aktivitása a legmagasabb a ciklus folyamán (Csicsvari és mtsai, 1999). Így a double-projection sejtekről elmondható, hogy a theta aktivitás alatt a CA1 területén valószínűleg nem a piramis sejtek lecsendesítése a fő feladatuk, hanem inkább azok serkentő bemeneteinek modulációjáért, skálázásáért lehetnek felelősek.

A double-projection sejtek az éleshullám alatt megfigyelhető ripple-aktivitás alatt erőteljesen növelték tüzelési frekvenciájukat ($40,2 \pm 20,5$ Hz), és akciós potenciáljaik a piramisrétegben extracellularisan mért ciklus felszálló ágára korlátozódtak (Jinno és mtsai, 2007).

A HS sejtek tehát egy igen heterogén csoportot képeznek, amelynek tagjai különbözhetnek egymástól mind elhelyezkedésükben a hippocampuson belül, mind a molekuláris markerek expressziójában, mind a posztszinaptikus célelemeikben. A lehetséges altípusok hálózati szerepének meghatározásához a sejtek szinaptikus bemeneteinek kvantitatív vizsgálatára is szükség van. Fontos információ ezen kívül az is, hogy az MS-DB-ből eredő rostok beidegzik-e ezeket a sejteket vagy a septo-hippocampalis bemenettől függetlenül működnek. Ezeknek a kérdéseknek a megvizsgálása segíthet a HS sejtek funkciójának megértésében.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Ahhoz, hogy egy idegi hálózat működését megértsük, minél részletesebben ismernünk kell a hálózat elemeinek, a különböző idegsejteknek a tulajdonságait és kapcsolatrendszerét. Bár a hippocampus az agy egyik legintenzívebben tanulmányozott része, meglepő módon sok alapvető anatómiai adat neuronhálózatának összeköttetéseiről még nem áll a rendelkezésünkre. Mindezekre az adatokra viszont feltétlenül szükség van a fiziológiai kísérletek eredményeinek értelmezéséhez és a hippocampus működését szimuláló neuronhálózati modellek létrehozásához. Kísérleteinkben kvantitatív neuroanatómiai módszereket felhasználva a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Ismert, hogy a CA1 régióba érkező fő glutamáterg pályák, az entorhinalis bemenet és a Schaffer kollaterálisok, valamint a CA1 piramissejtek lokális axonjai piramissejteket és interneuronokat egyaránt beidegeznek. Vajon az egyes pályák ezeket a sejteket egyszerűen az előfordulások arányában innerválják, vagy preferenciát mutatnak valamelyik célcsoport irányába? Mennyi az interneuronok és piramissejtek aránya a különböző glutamáterg pályák célelemei között?
2. A különböző hippocampalis interneuron csoportok rájuk jellemző bemeneti tulajdonságokkal rendelkeznek. Az egy sejtre érkező gátló és serkentő bemenetek száma és eloszlása a szómán és dendritfán jól ismert több különböző interneuron-típus esetében, de nem áll a rendelkezésünkre kvantitatív adat a medialis septum – Broca-féle diagonális köteg komplexumába (MS-DB) vetítő hippocampo-septalis (HS) sejtek heterogén csoportjáról. Mivel ezek a sejtek teremtik meg az MS-DB és a hippocampus közötti reciprok kapcsolat egyik ágát, fontosak lehetnek a két terület szinkronizációjában és a hippocampalis aktivitásmintázatok szabályozásában. Mennyi glutamáterg és GABAerg szinaptikus bemenettel rendelkeznek ezek a sejtek, hogyan mintavételezik a hippocampalis aktivitást? Milyen ezeknek a bemeneteknek az eloszlása sejtek különböző részein (szóma, dendritfa distalis vagy proximalis része)? Különbözik-e a bemenetek száma és eloszlása a HS sejtek típusai között?

3. Az MS-DB-ből cholinerg, glutamáterg és GABAerg rostok érkezik a hippocampusba, melyek közül az utóbbiak szelektíven beidegzik az eddig vizsgált GABAerg interneuronokat. Vajon a septalis rostok szinaptikus kapcsolatot létesítenek a MS-DB-be visszavetítő HS sejtekkel is? Ha igen, akkor milyen transzmitterrel rendelkező sejtek vesznek részt ebben? A sejtek mely részén alakítanak ki szinapszist? Ha van ilyen kapcsolat, akkor az különbözik-e az egyes HS sejt típusok között?
4. A kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a retrográdan feltöltött HS sejtek fiatal patkányokban interneuronokat idegeznek be a CA1 területén. Ezzel szemben a felnőtt patkányban juxtacellulárisan feltöltött, septum felé irányuló axonnal rendelkező sejtek lokális rostjai piramissejteket innerváltak. Vajon a felnőtt patkányban retrográdan feltöltött HS sejtek lokális axonjai milyen neuronokat idegeznek be? A célsejtek mely részén létesítenek szinapszist?

4. MÓDSZEREK

Kísérleteinket a MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottsága által elfogadott módon, a Budapest Fővárosi Állategészségügyi és Élelemiszer Ellenőrző Állomás állatkísérleti engedélyével végeztük el, az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvénynek (243/1998) 32. § (3) megfelelően.

4.1. Hozzájárulás

A CA1 régió glutamáterg bemeneteinek vizsgálatát kollaborációban végeztük Prof. Somogyi Péter csoportjával (Medical Research Council Anatomical Neuropharmacology Unit, Department of Pharmacology, University of Oxford). Az *in vitro* és *in vivo* sejtfeltöltést valamint az entorhinalis axonok megjelölését Prof. Somogyi Péter csoportja végezte. A munkában részt vettek: Dr. Thomas Klausberger, Dr. Txema Sanz, Dr. Eberhard Buhl, Dr. Catherine Bleasdale és Dr. John Tukker. Dr. Txema Sanz végezte az elektronmikroszkópos munka egy részét (*in vitro* jelölt sejtek és alvearis pálya vizsgálata), amely részét képezte DPhil téziseinek (The University of Oxford, 1997). Az *in vivo* jelölt sejtek és str. lacunosum-moleculare-ban jelölt entorhinalis axonok elektronmikroszkópos vizsgálatát én végeztem el.

A HS sejtek szinaptikus kapcsolatait vizsgáló projektben az MS-DB beadások egy része Dr. Gulyás Attila munkája, a többi műtetet, immunfestést, valamint a fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatokat én végeztem.

4.2. Pályajelölő anyag beadása műtéti eljárással

A különböző agyterületek között szinaptikus kapcsolatokat létesítő sejtek megjelenítése céljából három különböző műtetet végeztünk (2. táblázat). A műtéteket felnőtt (1 hónaposnál idősebb), 200-300 gr-os hím Wistar patkányokon hajtottuk végre (Charles-River, Budapest, az ettől való eltérést jelöltem). Az állatokat mélyen elaltattuk intraperitoneálisan beadott altatókeverékkel (0,2 mg/100 gr; 2,5% ketamin, 0,5% xylazin-hidroklorid, 0,25% promethazinium-klorid, 0,0025% benzetonium-klorid, és 0,002% hidrokchinonum; az ettől való eltérést jelöltem), majd fejüket sztereotaxiás készülékbe (Stoelting) helyeztük. A jelölőanyagokat üvegkapillárison keresztül juttattuk

be Paxinos és Watson patkányagy-atlasza segítségével megállapított koordináták szerint (Paxinos és Watson, 1998).

4.2.1. Vetítő sejtek jelölése sejtrekonstrukció céljából

A HS sejtek rekonstrukció céljából való megjelenítéshez biotinilált dextrán amint (BDA; 3 kDa; Molecular Probes, 10%, fiziológias sóoldatban oldva) juttatunk az MS-DB-be (n=8 állat). Ezt a pályajelölő anyagot a sejtek anterográd-, és retrográd módon is képesek szállítani, így egyaránt megjeleníti a beadási helyre vetítő sejteket és az innen kiinduló pályákat (Reiner és mtsai, 2000). Nagy mennyiségű BDA felvétele esetén a retrográdan jelölt neuronok teljes dendritfája, valamint axonfájának nagy része is feltölthető, így ezen sejtek rekonstruálhatóak. Ahhoz, hogy minél több HS sejtet megjelöljünk, az MS-DB területén több beadási pontra juttatunk nyomással 0,2- 0,3 µl BDA-t (a beadási koordinátákat lásd a 2. táblázatban).

4.2.2. Kettős retrográd sejt-, és anterográd pályajelölés

A hippocampusból az MS-DB-be axonokat küldő HS sejtek és a hippocampusba vetítő MS-DB sejtek rostjainak egyidejű, különböző markerrel való megjelenítése céljából egy anterográd és egy retrográd pályajelölő anyagot injektáltunk az MS-DB területére különböző beadási koordinátákra (2. táblázat, n=1 állat). Az anterográd pályajelölő anyag a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHAL, Vector Labs, 2,5% 0,01 M pH 8,0 foszfát pufferben) volt, amelyet 5 µA egyenáramú, 7 másodperces ki/be ciklusú, beadási pontonként 10 percig tartó iontoforézissal juttatunk az MS-DB-be. Retrográd jelölésre sárga-zöld fluoreszcens mikrogöngyöt (FluoSpheresR, 0,04 µm, Invitrogen) használtunk, amelyet nyomással adtunk be az MS-DB több pontjára (2. táblázat), beadási helyenként 0,2-0,3 µl-t.

2. Táblázat. A műtétek során alkalmazott beadási paraméterek

Beadási hely	Beadott anyag	Beadás módja, hossa/ beadott mennyiség	Beadás célja	Beadási koordináták (mm)*		
				Anteroposterior (a Bregma ponthoz viszonyítva)	Lateralis (a sutura sagittalisához viszonyítva)	Verticalis (a pia mater-től mérve)
MS-DB	BDA	Nyomás; 0,2-0,3 µl	HS sejtek teljes dendritfájának jelölése retrográd módon (septo- hippocampalis axonok is jelölődnek anterográd úton)	0 0,5 1	jobb és/vagy bal 0,2** jobb és/vagy bal 0,2** jobb és/vagy bal 0,2**	6,7 6,7 és 7,3** 7,3
MS-DB (kettős beadás)	PHAL	Iontoforézis; 5 µA, 7 s ki/be, 10 perc	Septo-hippocampalis axonok jelölése anterográd úton	0,3 0,9 0,5 0,7	jobb 0,2 jobb 0,2 bal 0,2 bal 0,2	6,7 és 7,2 7,2 6,7; 7,2 6,7; 7,2
	sárga-zöld fluoreszcens mikrogyöngy	Nyomás; 0,2-0,3 µl	HS sejtek jelölése retrográd módon	0,6 1,1 0,2	jobb 0,2 bal 0,2 bal, 02	6,7 és 7,3 7,6 6,7 és 7,3
Mediális entorhinalis kéreg	PHAL	Iontoforézis; 5 µA, 7 s ki/be, 15 perc	Perforáns pálya jelölése anterográd úton	-6,7 -8,3	bal 4,6 bal 4,6	7,6 5,8

*Paxinos és Watson (1998) patkányagy-atlasza szerint

**a különböző állatokban ezeknek a beadási helyeknek az eltérő kombinációit használtuk

4.2.3. Anterográd pályajelölés

A perforáns pálya megjelölése céljából nőstény Wistar patkányok (>110 gr-os, n=3) medialis entorhinalis kéregébe került beadásra az anterográd pályajelölő PHAL. Ezeket műtéteket Dr. Txema Sanz végezte Prof. Somogyi Péter témavezetése alatt. A műtét azonos módon zajlott, mint az MS-DB beadások esetében, kivéve, hogy az állatok altatása izoflurán inhaláció után, intramuscularisan beadott ketamin (0,1 mg/gr) és xylazin (0,01 mg/gr) keverékével történt. A PHAL beadások 15 percig tartottak 5 μ A egyenáramú, 7 másodperces ki/be ciklusú iontoforézissel. A beadási helyek a 2. táblázatban láthatóak.

4.3. *In vitro* intracelluláris sejtjelölés

A szeletkészítést és a sejtek feltöltését Dr. Txema Sanz és a néhai Dr. Eberhard Buhl végezte. Mély, ketamin (0,1 mg/gr) és xylazin (0,01 mg/gr) altatásban nőstény Wistar patkányokat (Charles River; >110 g, n=5) perfundáltak jéghideg mesterséges cerebrospinalis folyadékkal (tartalma mM-ban: 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 10 glukóz, és 256 szacharóz). A mérés és a sejtek feltöltése alatt alkalmazott mesterséges cerebrospinalis folyadék tartalma az előbbivel azonos volt, kivéve, hogy szacharóz helyett 126 mM NaCl-t tartalmazott. Az agyat kivették a koponyából, és jéghideg mesterséges cerebrospinalis folyadékban vibratómmal 450 μ m vastag horizontális szeleteket készítettek a hippocampalis formatio területéből. A szeleteket 1 óráig 33-35 °C-on műanyaghálón, oxigenizált mesterséges cerebrospinalis folyadék és 95% O₂ -al 5% CO₂ -al telített párás levegő határfelületén tartották. Ezt követően interface-típusú kamrában, biocytinnel töltött (Sigma, UK; 2%, 1,5 M KCH₃SO₄-ben) éles mikroelektrodák segítségével elektromos aktivitást vezettek el piramis sejtekből a CA1 (n=2) vagy a CA3 (n=4) területén. A piramis sejtek azonosítása jellemző elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján történt (széles akciós potenciálok, depolarizáló vagy késői hiperpolarizáló utó-potenciálok, tüske-frekvencia adaptáció).

4.4. *In vivo* juxtacelluláris sejtjelölés

Az *in vivo* elvezetés és sejtfeltöltés Dr. Thomas Klausberger és kollégái munkája volt. A sejtek feltöltése Sprague-Dawley patkányokban történt (250-350 gr, n=4) mély urethán (1,25 mg/gr) altatásban, amelyet szükség esetén ketamin (0,02 mg/gr) és xylazin (0,002 mg/gr) keverékével egészítettek ki a mérés folyamán. Az idegsejtek aktivitását extracellulárisan, 1,5% neurobiotinnel töltött (0,5 M NaCl oldatban) üveg elektródákkal mérték, majd a mérés után a sejteket pozitív árapulzusok injektálásával juxtacelluláris technikával töltötték fel (Pinault, 1996).

4.5. Perfúzió és fixálás

Az állatokat 2-4 órával az *in vivo* sejtfeltöltést követően, és 7-14 nappal pályajelölő anyag beadása után ketamin és xylazin tartalmú altatókeverékkel (összetételét és beadási módszerét lásd fenn) mélyen elaltattuk és szíven keresztül perfundáltuk először fiziológiás sóoldattal (1-2 perc) majd a következőkben leírt fixálókeverékek egyikével.

A négy patkány esetében, amelyekben *in vivo* sejtfeltöltés történt, és egy műtött állat esetében (entorhinalis kérgi PHAL beadás) 4% paraformaldehid (Sigma), 15% (v/v) telített pikrinsav és 0,05% glutáraldehid (TAAB) 0,1 M foszfát pufferben (PB) oldott keverékével folytatódott a perfúzió 20 percig (Somogyi és Takagi, 1982). Két további műtött állat esetében (entorhinalis kérgi PHAL beadás) ugyanezzel a módszerrel történt a perfúzió, csak esetükben a jobb ultrastukturális megőrzöttség érdekében a fixáló glutáraldehid tartalma magasabb, 2,5%-, paraformaldehid tartalma pedig alacsonyabb, 0,5% volt. A kettős PHAL/mikrogyöngy beadás után valamint két BDA beadás esetében 4% paraformaldehidet és 0,05% glutáraldehidet tartalmazó fixálót (PB-ben oldva) használtunk. A további állatokban, amelyekben BDA-beadást végeztünk kétkomponensű, beágyazás utáni GABA-elleni festésre optimalizált fixálót használtuk, mely a következőkből állt: 2% paraformaldehid, 1% glutáraldehid 0,1 M-os acetát pufferben (pH = 6,0) feloldva 2 percig, majd 2% paraformaldehid, 1% glutáraldehid 0,1M-os borát pufferben (pH = 8,5) feloldva 1 órán keresztül (Berod és mtsai, 1981; Sloviter és mtsai, 2001).

Az *in vitro* sejtfeltöltést követően a szeleteket két Millipore szűrőpapír közé helyeztük, hogy alakjuk ne deformálódjon a fixálás során, majd legalább egy éjszakán keresztül 2,5% paraformaldehid, 15% (v/v) telített pikrinsav, 1,25% glutáraldehid tartalmú (PB-ben oldva) fixálóban inkubáltuk.

4.6. Metszés és a metszetek előkezelése

Az agyakból coronális (MS-DB beadás esetében)-, vagy horizontális (entorhinalis kérgi beadás esetében) blokkokat vágunk a hippocampalis formatio-, és a beadási helyek területéről. Ezt követően PB-ben 50-80 µm vastag metszeteket készítettünk Leica vibratome-mal.

A metszeteket és az *in vitro* töltött sejteket tartalmazó szeleteket 10% majd 20-, vagy 30% szacharózban (PB-ben oldva) inkubáltuk, és folyékony nitrogén felett többször megfagyasztottuk a reagensek penetrációjának elősegítése érdekében (Somogyi és Takagi, 1982). Ezután az *in vitro* töltött sejteket tartalmazó szeleteket többször PB-vel mostuk, 10% zselatinba ágyasztuk, majd PB-ben vibratome-mal 60 µm vastag metszeteket készítettünk belőlük.

Az 1%-os vagy annál magasabb glutáraldehid tartalmú oldattal fixált metszeteket 1%-os nátrium-borohidriddel (Sigma) kezeltük (15 perc, PB-ben), hogy a fixálás során keletkezett keresztkötéseket fellazítsuk és blokkoljuk a szabad aldehidgyököket (Weber és mtsai, 1978; Eldred és mtsai, 1983). Az avidin-biotinilált rendszert tartalmazó megjelenítés esetén bizonyos metszeteket 1% H₂O₂-dal [Merck, Tris-pufferelt fiziológiás sóoldatban (TBS, 0,05 M, pH=7,4)] is előkezeljük az endogén peroxidázok kimerítése érdekében.

4.7. A jelölt sejtek megjelenítése

4.7.1. Kettős fluoreszcens PHAL/mikrogyöngy jelölés

A metszeteket az aspecifikus kötőhelyek csökkentése érdekében 2% marha szérum albuminnal blokkoltuk (BSA, TBS-ben Sigma) 1 órán át, majd nyúl anti-PHAL primer ellenanyagot használtunk (Vector, 1:8000, TBS-ben, 2 nap 4 °C-on). Többszöri

TBS mosás után Alexa-594 kecske anti-nyúl secunder antitestet alkalmaztunk (Molecular Probes, 1:300, 2 h). Intenzív TBS mosás után a metszeteket tárgylemezre fektettük, és Vectashield-ben (Vector Laboratories) lefedtük. Az immunreakció eredményeképpen a PHAL-tartalmú anterográd úton feltöltődött septalis rostok piros színben voltak láthatóak, míg a MS-DB-be vetítő retrográdan jelölt sejtek sárga-zöld színű fluoreszcens mikrogyöngyöket tartalmaztak. A kiértékelés egy Zeiss Axioplan2 fluoreszcens mikroszkóp segítségével történt.

4.7.2. BDA-jelölt sejtek fluoreszcens megjelenítése

BSA-val való blokkolás (2% TBS-ben) után az alacsony glutáraldehid tartalmú fixálóval perfundált állatból származó metszeteket Alexa-594-Streptavidin (Molecular Probes, 1:2000, 2 nap) TBS oldatában inkubáltuk. Intenzív mosás után a metszeteket tárgylemezen, Vectashield-ben lefedtük. A kiértékeléshez Olympus Fluoview FV1000 Konfokális Mikroszkópot használtunk.

4.7.3. PHAL-jelölt rostok megjelenítése fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatra

20% normál kecske szérummal (NGS, Vector, TBS-ben, 1 óra) való blokkolás után biotinilált kecske anti-PHAL antitestet (Vector, 1: 1000, TBS-ben, 2 nap) alkalmaztunk. Intenzív TBS mosást követően a metszeteket avidin és biotinilált tormaperoxidáz komplexét (elite ABC, Vector Laboratories, 1%) tartalmazó oldatban inkubáltuk (3 óra). Ismételt TBS-el majd Tris-pufferrel (TB, pH=7,6) történő mosás után a metszeteket 3,3'-diaminobenzidin (DAB)-4HCl [Sigma; 0,025% (pH=7,6)] TB oldatában előinkubáltuk (20 perc), majd az immunperoxidáz reakcióhoz szubsztrátként 0,01% H₂O₂-t alkalmaztunk.

4.7.4. A biocytin-, neurobiotin-, és BDA jelölt sejtek megjelenítése fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatra

A biocytin vagy neurobiotin-jelölt sejteket tartalmazó metszeteket többszöri TBS mosás után elite ABC-oldatban inkubáltuk (1%; TBS-ben, 2-3 óra szobahőmérsékleten vagy egy éjszaka 4 °C-on). TBS majd TB mosást követően a sejteket immunperoxidáz reakcióval hívtuk elő DAB (0,05%, TB-ben) kromogént és H₂O₂ szubsztrátot (0,01%) alkalmazva.

A BDA jelölés esetén a metszeteket BSA-val blokkoltuk (2% TBS-ben), majd elite ABC-ben inkubáltuk (1:300, 2h szobahőmérsékleten; vagy 1:400, egy éjszaka 4 °C-on). Az alacsony glutáraldehid tartalmú fixálóval perfundált, beágyazás utáni GABA-elleni festésre nem használt állatok esetében a DAB reakciót felerősítettük nikkkel-szulfáttal (0,028% DAB és 0,13% nikkkel PB-ben), így segítve a jelölt sejtek dendritfájának és axon arborizációjának minél teljesebb megjelenítését. Ha beágyazás utáni immunarany GABA-elleni festést kívánunk végezni a későbbiekben, ez az erősítés nem alkalmazható, mert az arany szemcsék aspecifikusan a DABNi komplexhez kötődhetnek. Emiatt a hívás DAB-al (0,05%, TB-ben) történt a magas glutáraldehid tartalmú fixálóval perfundált állatok esetében, amelyeknél az anyagot később beágyazás utáni GABA-elleni festésre használtuk.

4.8. A metszetek utókezelése

Az MS-DB-t tartalmazó metszeteket krómzselatinban (Sigma) tárgylemezre fektettük, kiszárítottuk, majd xylollal víztelenítettük és Depex-ben lefedtük.

A hippocampust tartalmazó metszeteket ozmiummal kezeltük (1% OsO₄ PB-ben 30 percig a bemenetek elektronmikroszkópos analízisére szánt metszetek esetében, 0,3% OsO₄ PB-ben 10 percig a fénymikroszkópos sejtrekonstrukcióra szánt metszetek esetében). Ezt követően a metszeteket felszálló alkoholsorban dehidráltuk. A 70% alkohol 1% uranyl acetátot tartalmazott, amit 40 percig hagytunk az elektronmikroszkópos analízisére szánt metszeteken, és 20 percig a fénymikroszkópos sejtrekonstrukcióra szánt metszeteken. Végül a dehidrállást propilénoxidral fejeztük be, és a metszeteket Durcupan műgyantába (ACM, Fluka) ágyasztuk. A fénymikroszkópos

sejtrekonstrukcióra szánt metszetek esetében azért volt szükség gyengébb kontrasztosító lépésekre, hogy az alveus a kontrasztosítás során ne sötétedjen be olyan mértékben, amely már akadályozná HS sejtek itt található nyúlványainak rekonstrukcióját.

4.9. Beágyazás utáni immunarany jelölés GABA ellen

A beágyazás utáni GABA elleni festést Somogyi és mtsai protokollja alapján (Somogyi és Hodgson, 1985; Somogyi és mtsai, 1985), kisebb változtatásokkal végeztük el egy poliklonális, GABA ellen nyúlban termeltetett antitesttel (Hodgson és mtsai, 1985). A Durcupan blokkba átgázolt metszetekből Leica ultramikrotómmal 60 nm-es sorozatmetszetek készítettünk, amelyeket Formvar hártás nikkal gridre vettünk fel. A reakciót ezeken a metszeteken Millipore-szűrővel szűrt cseppek felületén, nedves Petri-csészében végeztük el, a következők szerint:

- 1%-os perjódsvav (H_5IO_6 , Sigma; 5 perc), ami a műgyantát távolítja el;
- 3×3 perces desztillált vizes mosás;
- 3 perc TBS mosás;
- 30 perc 1% ovalbumin oldattal (Sigma; TBS-ben) blokkolás;
- 2×10 perc TBS mosás;
- primer ellenanyag: nyúl anti-GABA (9-es kódszámú, 1:5000; 90 perc);
- 2×10 perc TBS mosás;
- szekunder előtti blokkolás: 0,5% Tween 20 (Sigma), 1% BSA 0,05M-os TB-ben (pH=7,4), 10 perc;
- szekunder: kecske anti-nyúl arany-konjugált-IgG (15 nm, 1:20; Amersham; az előző blokkoló oldatban feloldva), 90 perc;
- 3×5 perces desztillált vizes mosás;
- kontrasztosítás uranil-acetáttal 20 perc;
- 4× gyors mosás desztillált vízben;
- kontrasztosítás ólom-citráttal (Ultrostain, Leica, 1%) 2 perc;
- desztillált vizes mosás.

Az elektronmikroszkópos analízis során azokat a terminálisokat tekintettük GABA-pozitívnak, amelyeken az arany szemcsék száma egymást követő legalább három metszeten keresztül legalább ötször annyi volt, mint a háttérfestődés. Háttérfestődésnek

az aszimmetrikus szinapszisokat képező terminálisokon megfigyelt jelölést tekintettük, kivéve a str. lucidum területét, ahol az aszimmetrikus szinapszisok nagy részét képező moharostok GABÁT is tartalmaznak (Sandler és Smith, 1991; Sloviter és mtsai, 1996; Bergersen és mtsai, 2003). Ebben a rétegben a proximalis piramisajt dendritek jelölését tekintettük háttérfestődésnek. DAB-tartalmú profilok esetén a kiértékelést a mitochondriumok felett található aranyszemcsék alapján végeztük, ugyanis a DAB reakció végterméke kitöltve a citoplazmát maszkírozhatja az itt található epitópokat, míg a mitochondriumokba általában nem jut be. A mitochondriumokba a GABA a fixálás során bekövetkező ozmotikus változások hatására juthat be, vagy elképzelhető, hogy jelenléte a belső mátrixában elhelyezkedő GABA-oxoglutársav transzamináznak köszönhető (GABA-T; Schousboe és mtsai, 1977).

4.10. BDA-jelölt sejtek fénymikroszkópos rekonstrukciója

Az MS-DB-be történő BDA beadás után alacsony glutáraldehid tartalmú fixálóval perfundált állatokban a jelölés a HS sejtek egy része esetében elég erős volt a sejtek teljes dendritfájának rekonstrukciójához. Ezekben az állatokban a jelölt HS sejtek axonkollaterálisait is követni tudtuk, amit a magas glutáraldehid tartalmú fixálóval perfundált állatokban csak az axon iniciális szakaszig tudtunk megtenni a DAB elhalványulása miatt. A jelölt sejtek dendritfáját (n=3 a CA1 str. oriensben és n=1 a CA3 str. lucidumban) 100x-os immerziós olajos objektívet használva, camera lucida segítségével papírra rajzoltuk, a rajzon jelölve azokat a pontokat, ahol a dendritek a szomszédos metszetbe lépnek át. A dendritek elágazódásainak magasságát a metszet z tengelyén belül megbecsültük egy 0-9 tartó skálán. A rajzon jelöltük az adott dendritszakasz vastagságát is (vékony, közepes, vastag kategóriákat különítettünk el). Ezután az adatokat digitalizáltuk egy tablet, és a Pomaházi Sándor által kifejlesztett és Gulyás Attila által módosított (1999) ARBOR program segítségével (Wolf és mtsai, 1995). A program az általunk megadott, metszetsugorodással korrigált skála és a metszetvastagság (80 μm) alapján, a 2-dimenziós rajz (x-y tengely) valamint a z tengelyen jelölt elágazódások és metszetátlépési pontok adatait felhasználva 3-dimenziós rekonstrukciót készít, és kiszámítja a dendritek hosszát. A program által megadott adatokat Gulyás és mtsai korábban összehasonlították a NeuroLucida

programmal mért értékekkel és a két különböző módszerrel kapott 3-dimenziós hosszak különbsége kisebb volt, mint 3% (Gulyás és mtsai, 1999). A metszetek zsugorodását korigáltuk az x-y tengelyen a következő módon: Előzőleg megjelölt metszeteket kirajzoltunk, és területüket megmértük közvetlenül az agy lemetszés után, majd ezt megismételtük a műgyantába ágyazást követően. A 3-dimenziós rekonstrukcióhoz használt skálát a két érték hányadosából kapott korrekciós faktorról (1,15 és 1,07 a két állatban) szoroztuk meg.

A HS sejtek szómafelszínének meghatározásához jelölt szómákat a műgyantába ágyazott metszetekből átágyaztunk. Ezt követően 2 μm vastag sorozatmetszeteket készítettünk ultramikrotómmal, amelyeket tárgylemezre fektettünk, és Depexben lefedtünk. Fénymikroszkópban a sorozat minden tagjáról fényképet készítettünk, majd a szóma-metszetek területét a NIH ImageJ program segítségével megmértük. A kapott értékeket megszoroztuk a metszetvastagsággal az adott metszetben található szóma-részlet felszínének meghatározásához. Végül ezeket a szorzatokat összeadtuk a teljes felszín meghatározásához. Mivel a str. lucidumban található sűrűn-tüskés HS sejtek megfeleltethetőek a tüskés calretinin-tartalmú sejteknek (Gulyás és mtsai, 2003), ezek átlagos szóma-méretét ritka előfordulásuk miatt a metszeteinkkel azonos módon fixált és dehidrált calretinin- ellen festett metszetekből határoztuk meg (n=11 szóma). A CA1 HS sejtek esetén 10 db sejt méretét határoztuk meg a fenn ismertetett módon, öt további fluoreszcensen jelölt HS sejt felszínét pedig konfokális mikroszkópban készített szelet-felvételek felhasználásával adtuk meg.

4.11. BDA-jelölt sejtek bemeneti tulajdonságainak elektronmikroszkópos vizsgálata

A HS sejtek jellegzetes dendritszakaszait tartalmazó részleteket a metszetekből szikével kivágtunk, majd Durcupan blokkokba ágyaztunk. A blokkot a megfelelő alakra faragtuk, majd camera lucida segítségével kirajzoltuk a benne található dendriteket. Leica ultramikrotómmal 60 nm vastag sorozatmetszeteket készítettünk (> 200 metszet), amelyeket Formvar hártás nikkal gridekre vettünk fel. A sorozat lemetszése után a blokkot újra megvizsgáltuk, és a camera lucida felhasználásával az előzőleg elkészített rajzon jelöltük azt a dendritszakaszt, ami a metszés során elfogyott a blokkból. A

lemetszett szakasz rajzon mért hossza, valamint az ultravékony metszetek vastagságának (60 nm) és a metszetek számának szorzatából adódó z tengely érték alapján, a Pitagorasz tétel segítségével megbecsültük a lemetszett szakasz hosszát (13-57 μm , $n=36$, 2 állatból). Az ultravékony sorozatmetszeteken beágyazás utáni GABA elleni immunarany festést végeztünk, majd Hitachi 7100 típusú elektronmikroszkópban a blokk rajza alapján megkerestük a lemetszett dendriteket. A dendriteket a teljes sorozaton keresztül követtük, miközben a velük szinaptizáló GABA-pozitív, és negatív boutonokat papírra rajzoltuk. A str. lucidumban külön jelöltük az erősen GABA-pozitív terminálisokat és a gyengén GABA-pozitív, moharostoktól eredő boutonokat. Egy rajzon a sorozat öt metszetét ábrázoltuk, jelölve az újonnan megjelenő illetve az eltűnő boutonokat; majd folytattuk a következő öt metszetet ábrázoló rajzzal a sorozat végéig. A dendrittel a fénymikroszkópban is látható BDA-jelölt axonok által létesített szinapszisokat korreláltan vizsgáltuk, és külön jelöltük. A sorozatmetszetekből való rekonstrukció sztereológiai szabályai szerint a legelső metszetén szinapszisokat létesítő boutonokat felhasználtuk, míg a legutolsó metszeten még látható szinapszissal rendelkező boutonokat nem vettük a mintába (Coggeshall és Lekan, 1996). Az input-denzitás meghatározásához az adott dendritszakasszal szinaptizáló boutonokat összeszámoltuk (61-326 db) és elosztottuk a szakasz hosszával (13-57 μm); majd megszoroztuk 100-al, hogy megkapjuk az input/100 μm értéket. A hippocampus különböző területein található, adott vastagsági kategóriába tartozó dendritek átlagos input-denzitásának megadásához összeadtuk az adott osztályba tartozó dendriteken ($n=3-7$) mért bemenetek számát ($n=285-994$), és elosztottuk az összeadott hosszukkal (47,2-230 μm), majd megszoroztuk 100-al.

Illusztráció céljából egy jellegzetes dendritszakaszt és a vele szinaptizáló boutonokat 3-dimenzióban ábrázoltuk a Reconstruct program segítségével (15. ábra; Fiala, 2005). Az ábra elkészítéséhez az összes metszetről digitális fotót készítettünk 30 000-szeres nagyítással, ezeket a program segítségével egymáshoz igazítottunk, a profilokat körberajzoltuk, majd 3-dimenzióban megjelenítettük.

A szómák bementeinak rekonstrukciója hasonlóképpen történt a dendritekéhez, de esetükben a bemenet számot területegységre (input/100 μm^2) adtuk meg. A vizsgált szómafelszín méretének meghatározásához a szómákról elektronmikroszkópban fényképet készítettünk öt metszetenként, majd kerületüket a NIH ImageJ program

segítségével megmértük. Az így kapott kerület értéket megszoroztuk a metszetvastagság (60 nm) ötszörösével (kivéve az utolsó metszetet), majd a szorzatokat összeadtuk a teljes vizsgált felszín megadásához.

A teljes dendritfára érkező bemenetek számának megbecsléséhez megszoroztuk az adott sejttípus ARBOR programmal meghatározott összes dendrit hosszát (μm -ben) az elektronmikroszkópban mért, $1 \mu\text{m}$ -re jutó input-denzitási értékekkel, külön a vékony és közepes vastagságú dendritek esetében. A HS sejteknek csak nagyon rövid „vastag” kategóriába eső dendritszakasza volt (10. ábra), ezért ezeket elektronmikroszkópban nem mintavételeztük, hanem esetükben is a közepes dendriteken mért input-denzitást használtuk fel.

Itt szeretném felhívni a figyelmet arra, hogy a dolgozatban az egyszerűség kedvéért néhol a „serkentő” és „gátló” bemenet elnevezést használom a GABA-negatív és az erősen GABA-pozitív bemenetek szinonímájaként (a gyengén GABA-pozitív moharost bemeneteket a str. lucidumban és hilusban szintén a „serkentő” csoportba soroltam), annak ellenére, hogy bizonyos esetekben a GABA serkentő hatású is lehet (Gullledge és Stuart, 2003; Szabadics és mtsai, 2006). A GABA-negatív bemenetek többsége glutamát transzmitterrel rendelkezhetett, de a hippocampus előbbieknél jóval kisebb számú cholinerg, szerotonerg stb. bemenetei is ebbe a csoportba (GABA-negatív vagy „serkentő”) kerültek.

4.12. Hippocampalis piramissejtek és HS sejtek célelem szelektivitásának elektronmikroszkópos vizsgálata

Az *in vitro*-, és *in vivo* jelölt hippocampalis piramissejteknek, és a retrográdan feltöltődött HS sejteknek viszonylag kevés kollaterális volt egy-egy metszetben, és ezek a HS sejtek esetében más sejtektől származó jelölt rostokkal lehettek egy térben, ezért célelemeiket korrelált fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálattal határoztuk meg. A jelölt rostokat camera lucidával kirajzoltuk, majd jellegzetes szakaszokat választottunk, amelyeket lefotóztunk és átágyasztunk. Ultravékony sorozatmetszeteket készítettünk, majd elektronmikroszkópban a blokk rajza és fényképe alapján megkerestük a fénymikroszkópban előzőleg kiválasztott axonokat. Ezeket sorozatmetszeteken keresztül követtük, és az általuk létesített összes szinapszist

lefotóztuk. A posztszinaptikus célelemeket sorozatmetszeteken keresztül követtük és az interneuron-, és piramisajt dendritek korábban leírt ultrastrukturális tulajdonságai alapján azonosítottuk (Gulyás és mtsai, 1999; Megías és mtsai, 2001). Az azonosításhoz használt kritériumok a következők voltak: A str. oriens, pyramidale és radiatum területén aszimmetrikus bemenet piramisajt esetében szinte kizárólag csak a tüskékre érkezhethet, míg az interneuronok nagy számú aszimmetrikus bemenetet kaphatnak a dendritágaikra (shaft) is. A piramisajt dendritáigaira ezzel szemben szinte csak szimmetrikus bemenet érkezhethet. Mindezek alapján, a beidegzett dendritágakat interneuronként osztályoztuk, amennyiben legalább egy további aszimmetrikus szinapszist kaptak a vizsgált szakaszon (≥ 10 metszet). A piramisajt tüskék jellegzetes alakúak, általában megvastagodott fej és vékonyabb nyak résszel rendelkeznek, és csak egy aszimmetrikus bemenetet kaphatnak (Megías és mtsai, 2001). Ezzel szemben az interneuronok tüskéinek sokszor nincs feji része, és egyszerre több aszimmetrikus szinapszis is beidegezheti őket (Gulyás és mtsai, 1992). Bár a hippocampalis interneuronok túlnyomó többsége nem rendelkezik tüskékkel (Seress és Ribak, 1985; Freund és Buzsáki, 1996), a str. oriens és alveus határán sok tüskés képviselőjük is ismert (Baude és mtsai, 1993). Emiatt ezen a területen minden beidegzett tüskét, ami csak egy aszimmetrikus bemenetet kapott követtünk a dendritáig, amelyet az előbb részletezett kritériumok alapján felhasználtunk a posztszinaptikus célelem azonosítására. A több aszimmetrikus szinapszist fogadó tüskéket interneuron-tüskéknek tekintettük. A célelemek egy részét a nem megfelelően megőrzött ultrastruktúra miatt nem tudtuk az azonosításhoz elégséges távolsáig követni, és ezek a „nem azonosított” kategóriába kerültek.

4.13. Entorhinalis rostok célelem szelektivitásának elektronmikroszkópos vizsgálata

A jelölt entorhinalis axonoknak két csoportját lehetett elkülöníteni, amelyeket eltérő mennyiségük miatt különböző módszerrel vizsgáltunk. Kevés, az ún. „alvearis pályához” (Deller és mtsai, 1996) tartozó entorhinalis axon jelölődött az alveus, str. oriens, pyramidale és radiatum területén, amelyek analízise korrelált fény-, és elektronmikroszkópos módszerrel történt (ennek részleteit lásd az előző fejezetben).

Sokkal nagyobb mennyiségű rost jelölődött a str. lacunosum-moleculare-ban, amelyeken szisztematikus random mintavételt hajtottunk végre a disector módszer alapján (Sterio, 1984; Coggeshall és Lekan, 1996). A CA1 str. lacunosum-moleculare területéből blokkokat ágyasztuk át, amelyekből 60 nm vastag ultravékony sorozatmetszeteket készítettünk. Egymás után következő sorozatmetszet-párokat választottunk, amelyeknek az első tagját (referenciametszet) szisztematikusán átnéztük, és a rajta talált, jelölt terminálisok által létesített szinapszisokat megkerestük a metszet-pár másik tagján („look-up” metszet). A disector módszer lényege alapján (Sterio, 1984), amennyiben az adott szinapszis látható volt a második metszeten is, akkor nem vettük a mintába. Ha a szinapszis már eltűnt a második metszeten, akkor a mintába került. Mivel így csak azokat a szinapszisokat számoltuk, amelyek a referenciametszetben kezdődtek (és minden szinapszis esetében csak egy ilyen metszet lehetséges), elkerültük, hogy a mintavételünk a nagyobb szinapszissal rendelkező boutonokat preferálva torz legyen.

4.14. Statisztika

A különböző glutamáterg pályák (CA1 és CA3 piramissejtek axonjai és entorhinalis rostok) különböző posztzinaptikus célelemeinek (piramissejt, interneuron) gyakoriságát X^2 teszttel hasonlítottuk össze. A statisztikai elemzéshez a túske és dendritág célelemeket összevontuk mind a piramissejt mind az interneuron kategóriában. A nem azonosított célelemeket kizártuk az analízisből. A null-hipotézist akkor vettük el, ha a P értéke 0,05 alatt volt, és ilyenkor a különbséget szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai teszteket a STATISTICA (Statsoft) software csomag segítségével végeztük el. A HS sejtek bemeneti denzitásának elemzése során nem végeztünk statisztikai teszteket, mivel az egy csoportba tartozó mintavételezett dendritek és szómák száma a 3-dimenziós elektronmikroszkópos mintavétel időigénye miatt alacsony volt (n=3-7 dendrit/csoport; n=2-4 szóma/csoport; 5. és 6. táblázat).

5. EREDMÉNYEK

5.1. A CA1 régió glutamáterg pályáinak szinaptikus kapcsolatai

In vivo és *in vitro* sejtjelölési módszerek és korrelált elektronmikroszkópos vizsgálat társításával meghatároztuk a CA1 régióba érkező három fő serkentő bemenet (a Schaffer kollaterálisok, az entorhinalis axonok és a CA1 piramisisejtek lokális rostjai) által beidegzett piramisisejt-, és interneuron célelemek egymáshoz viszonyított arányát. A megjelölt glutamáterg pályák posztszinaptikus célelemeit sorozatmetszeteken keresztül követtük, és korábban publikált kritériumok alapján, ultrastrukturális morfológiájuk alapján azonosítottuk (lásd a Módszerek fejezetben; Gulyás és mtsai, 1999; Megiás és mtsai, 2001). A módszer validálása céljából kilenc, ultrastrukturális bélyegei alapján interneuronnak azonosított dendriten beágyazás utáni GABA-elleni festést hajtottunk végre, majd összehasonlítottuk az egységnyi felületre jutó arany szemcsék számát az ugyanazon metszeten található piramisisejt dendritnek azonosított profilokéval. Az arany szemcsék denzitása szignifikánsan magasabb volt a kilenc dendriten mint a piramisisejt dendriteken (Mann-Whitney U teszt; $P < 0,0005$), ami igazolta a morfológiai kritériumok alapján történő azonosítás alkalmazhatóságát.

5.1.1. A CA1 piramisisejtek lokális rostjainak fő posztszinaptikus célelemei interneuronok

A CA1 piramisrétegében egyedi sejteket töltöttünk fel akut szeletben *in vitro*, vagy altatott állatban *in vivo* juxtacelluláris technikával. Korábbi leírásoknak megfelelően a jelölt piramisisejtek axonágait a subiculum területén-, valamint a CA1 str. oriensben lehetett megfigyelni, ahol többségük az alveussal határos szakaszon, a réteghatárral párhuzamosan futott (6.A ábra; Ramon y Cajal, 1911; Lorente de No, 1934, Knowles és Schwartzkroin, 1981b; Tamamaki és mtsai, 1987; Tamamaki és Nojyo, 1990). A posztszinaptikus interneuronok-, és piramisisejtek arányának meghatározása céljából a CA1 régióban talált jelölt axonokon korrelált fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatot hajtottunk végre.

Az *in vitro*, biocytinnel töltött sejtek (n=41 szinapszis, n=2 állat és sejt) boutonjainak többsége, (a szinapszisok 65,9%-a) interneuronokat idegezett be (3. táblázat, 6. ábra). Ezen belül a célelemek főleg az interneuronok dendritágai (63,4%; 6.B ábra), ritkábban azok tüskéi (2,4%); voltak. A megvizsgált szinapszisok 29,3%-a esetében a jelölt terminálisok piramisisejtek tüskéivel létesítettek szinaptikus kapcsolatot (6.C ábra). 4,9%-t a posztszinaptikus célelemeknek nem sikerült azonosítanunk.

Korábbi közlemények szerint a szeletkészítés során megváltozott körülmények [a hypoxia következményei (Siklós és mtsai, 1997), a szinaptikus kapcsolatok egy részének elvesztése stb.] módosíthatják az egységnyi agyterületre jutó tüskék és szinapszisok számát (Kirov és mtsai, 1999; Fiala és mtsai, 2003; Kirov és mtsai, 2004; Bourne és mtsai, 2007). Mivel ez együtt járhat a szeletben található axonok célelem-szelektivitásának változásával, az *in vitro* jelölt sejtek analíziséből kapott eredmények ellenőrzése céljából a vizsgálatot megismételtük *in vivo* töltött CA1 piramisisejtek kollaterálisan (n=130 szinapszis, n=4 állat, n=1, 1, 2 és 4 sejt/állat). A kapott eredmények hasonlóak voltak a szeletekben mért értékekhez ($X^2=1,159$; $P=0,259$): a jelölt terminálisok nagy része interneuronokkal létesített szinapszist (53,8%-a az összes szinapszisnak). A célelemek 46,2%-ban interneuronok dendritágai és 7,7%-ban interneuron tüskéi voltak (6.D ábra). A szinapszisok 39,2%-a esetén piramisisejt volt a posztszinaptikus partner. Utóbbi terminálisok piramisisejt tüskékkel szinaptizáltak egyetlen bouton kivételével, amely egy piramisisejt vékony dendritágát idegezte be (1,5%). Az *in vivo* mintánkban a posztszinaptikus célelemek 6,9%-t nem tudtuk azonosítani. A 125 vizsgált boutonból öt (4%) két célelemmel is rendelkezett, amely két esetben két interneuron dendritágnak bizonyult, egy-egy esetben pedig két piramisisejt tüske, egy piramisisejt tüske és egy interneuron dendritág továbbá egy piramisisejt tüske és egy nem azonosított posztszinaptikus elem volt.

A beidegezett interneuronok ultrastrukturális morfológiája a horizontális interneuronokéra (köztük a HS sejtekére, lásd később) emlékeztetett: dendritágaikra nagy számú aszimmetrikus szinapszis érkezett, és gyakran rendelkeztek tüskékkel is, amelyeket szintén aszimmetrikus szinapszist formáló terminálisok borítottak (6.D ábra).

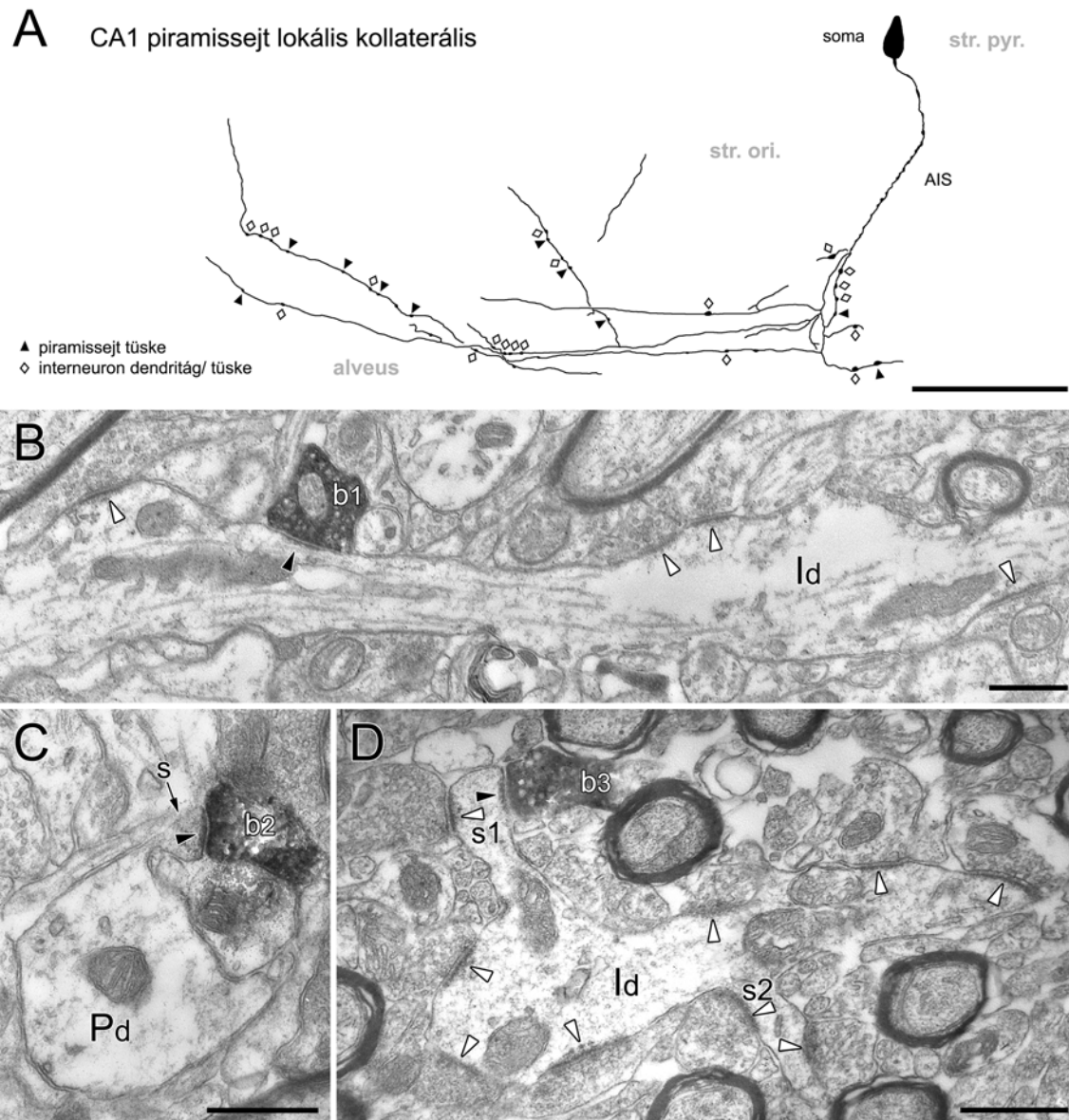
Fontos megjegyezni, hogy a vizsgált *in vivo* jelölt sejtek a célelemek eloszlása alapján heterogén csoportot képeztek (3. táblázat; $X^2=27,965$; $P<0,0001$).

3. Táblázat. A CA1 régió glutamáterg bemeneteinek posztzinaptikus célelemei – az összes mintavételezett szinapszis összefoglaló táblázata

Forrás: Takács és mtsai, in press, módosítva.

Pálya (jelölés)	Állat azonosító száma (sejtek száma/ állat)	Réteg(ek)	Vizsgált szinapszi- sok száma	Posztzinaptikus célelemek						Nem azonosí- tott n (%)
				Piramissejt			Interneuron			
				shaft	tüske	shaft + tüske (%)	shaft	tüske	shaft + tüske (%)	
CA1 piramis- sejt lokális kollaterá- lis (<i>in vitro</i>)	11/07/95 (1)	s.o./alveus	31	1	8	9 (29)	21	0	21 (67,7)	1 (3,2)
	14/01/93 (1)	s.o./alveus	10	0	3	3 (30)	5	1	6 (60)	1 (10)
CA1 piramis- sejt lokális kollaterá- lis (<i>in vivo</i>)	C13 (2)	s.o./alveus	34	1	6	7 (20,6)	20	5	25 (73,5)	2 (5,9)
	C14 (4)	s.o./alveus	58	0	34	34 (58,6)	17	1	18 (31)	6 (10,3)
	J82 (1)	s.o./alveus	19	0	1	1 (5,3)	15	3	18 (94,7)	0
	J68 (1)	s.o./alveus	19	1	8	9 (47,4)	8	1	9 (47,4)	1 (5,3)
Schaffer kollaterá- lis (<i>in vitro</i>)	11/07/96 (1)	s.o.	37	0	35	35 (94,6)	2	0	2 (5,4)	0
	21/08/96 (1)	s.o.	6	0	6	6 (100)	0	0	0	0
	07/08/96 (1)	s.o./alveus	3	0	2	2	1	0	1	0
	26/02/97 (1)	s.r.	24	1	21	22 (91,7)	2	0	2 (8,3)	0
Entorhi- nális axonok a s.l.-m- ban (<i>in vivo</i>)	animal1*	s.l.-m.	48	1	44	45 (93,8)	3	0	3 (6,3)	0
	animal2*	s.l.-m.	46	2	41	43 (93,5)	3	0	3 (6,5)	0
	animal3*	s.l.-m.	36	0	30	30 (83,3)	5	0	5 (13,9)	1 (2,8)
Entorhi- nális axonok - Alvearis pálya (<i>in vivo</i>)	animal1*	s.r.	5	0	5	5 (100)	0	0	0	0
		s.p.	14	0	14	14 (100)	0	0	0	0
		s.o./alveus	30	0	21	21 (70)	9	0	9 (30)	0
		Minden réteg	49	0	40	40 (81,6)	9	0	9 (18,4)	0
	animal2*	s.r.	18	0	13	13 (72,2)	5	0	5 (27,8)	0
		s.p.	16	0	16	16 (100)	0	0	0	0
		s.o./alveus	19	0	12	12 (63,2)	6	1	7 (36,8)	0
		Minden réteg	53	0	41	41 (77,4)	11	1	12 (22,6)	0
	animal3*	s.r.	18	0	14	14 (77,8)	4	0	4 (22,2)	0
		s.o./alveus	7	0	5	5 (71,4)	2	0	2 (28,6)	0
	Minden réteg	25	0	19	19 (76)	6	0	6 (24)	0	

*: Tömeges jelölés PHAL pályajelölő anyaggal, s.l.-m.: stratum lacunosum-moleculare, s.o.: stratum oriens, s.p.: stratum pyramidale, s.r.: stratum radiatum



6. Ábra. A CA1 piramisajtak rekurrens kollaterálisai elsősorban interneuronokat idegeznek be.

A: Egy in vitro jelölt CA1 piramisajt axonfájának elektronmikroszkópban tanulmányozott részlete. A piramisajttüskékkel szinapszist létesítő boutonokat nyílhegyekkel jelöltük. A gyémánt (◇) szimbólumok az interneuron dendritágakat vagy tüskéket beidegző terminálisokat jelölik. Látható, hogy az elektronmikroszkópban megvizsgált boutonok többsége interneuron célelemmel rendelkezik. B: Egy biocytinnel jelölt CA1 piramisajt axonterminálisa (b1) a CA1 oriens rétegében aszimmetrikus szinapszist létesít (fekete nyílhegy) egy interneuron dendritággal (ld). A posztzinaptikus dendritet a dendritágra érkező nagyszámú aszimmetrikus szinapszis

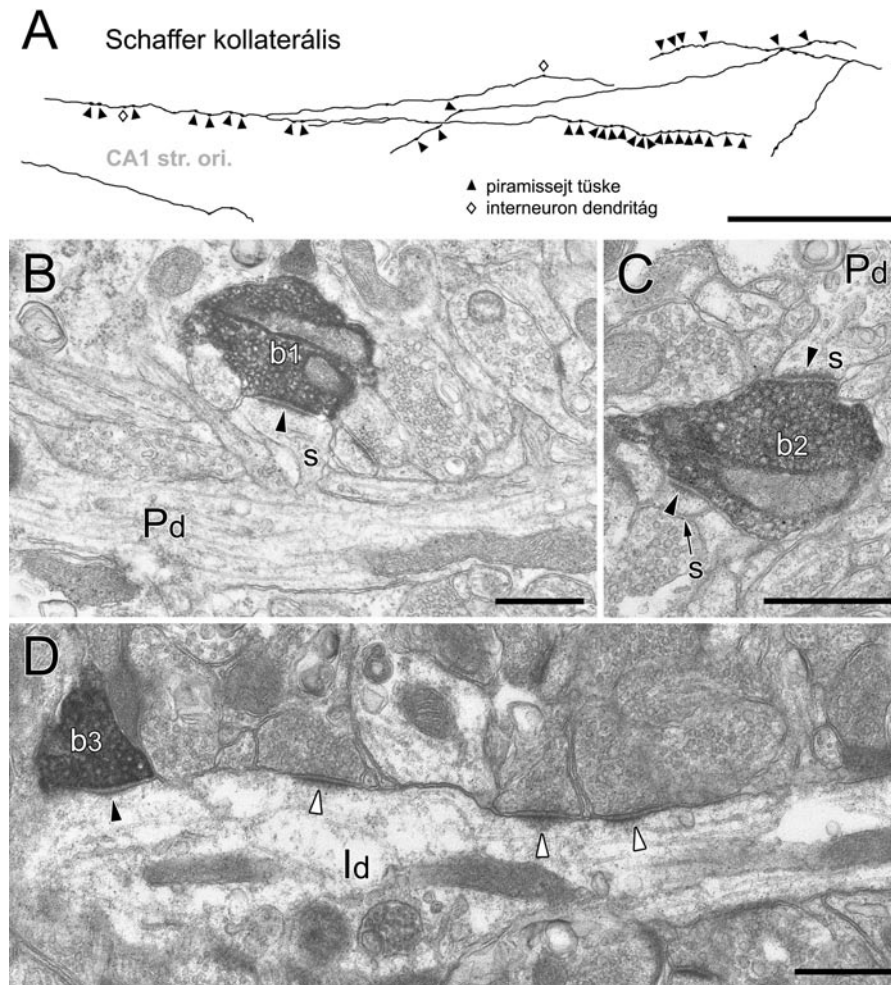
(fehér nyílhegyek) alapján azonosítottuk interneuronként. C: Egy biocytin-tartalmú bouton (b2) beidegez (nyílhegy) egy piramisestüskét (s, nyíl). A túske vékony nyaki résszel csatlakozik a dendritághoz, amely a piramisestekre jellemzően nem kap aszimmetrikus bemenetet. D: A CA1 piramisestek célelemei között interneuron-tüskéket is találtunk. Egy neurobiotinnal *in vivo* megjelölt CA1 piramisest terminálisa (b3) aszimmetrikus szinapszist formál (fekete nyílhegy) egy aszimmetrikus szinapszissal sűrűn beborított (fehér nyílhegyek) interneuron dendrit (Id) tüskéjével (s1). Az interneuron mindkét látható tüskéje (s1, s2) több aszimmetrikus szinapszist is fogad (nyílhegyek), amely nem jellemző a CA1 piramisestek tüskéire. AIS: axon iniciális szegmentum, str. pyr.: stratum pyramidale, str. ori.: stratum oriens. Skálák: A: 100 μ m; B, C, D: 0,5 μ m.

Forrás: Takács és mtsai, in press, módosítva.

5.1.2. A Schaffer kollaterálisok túlnyomórészt piramisesteket idegeznek be

Az *in vitro* jelölt CA3 piramisestek (n=4) axonjai a CA3 területén adtak boutonokat hordozó rekurrens axonágakat, és Schaffer kollaterálisikkal a CA1 régió oriens és radiatum rétegébe vetítettek (Schaffer, 1892, Ishizuka és mtsai, 1990; Li és mtsai, 1994).

A korrelált fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálat szerint a Schaffer kollaterálisok posztszinaptikus célelemei (n=70 szinapszis, 46 a str. oriensből és a 24 a str. radiatumból) túlnyomó többségben, 92,9%-ban piramisest tüskék voltak (7.A-C ábra, 3. táblázat). A szinapszisek 7,1%-a esetében interneuron dendritág volt a posztszinaptikus partner (7.A és D ábra). Hét esetben (11,1%) a jelölt boutonok két szinapszist is létesítettek, két különböző tüskével (7.C ábra). A vizsgált CA3 piramisestek a célelem-eloszlás alapján homogén populációt képeztek (3. táblázat; $X^2=3,02$; $P<0,2209$).



7. Ábra. A Schaffer kollaterálisok fő célelemei piramisajték.

A: Egy in vitro jelölt CA3 piramisajt axon elektronmikroszkópban tanulmányozott részlete. A piramisajtűskékkel szinapszist létesítő boutonokat nyílhegyekkel-, az interneuron dendritágakat beidegző terminálisokat gyémánt (◇) szimbólumokkal jelöltük. B: Egy biocytinnel jelölt CA3 piramisajt terminálisa (b1) aszimmetrikus szinapszist létesít (nyílhegy) egy piramisajt túskejével (s). A túske nyaki része kapcsolódik a piramisajt dendritághoz (Pd), amelyre a CA1 piramisajték dendritjeire jellemzően nem érkezik aszimmetrikus szinapszis. C: Egy biocytinnel jelölt bouton (b2) két piramisajt túske-t is beidegez (s), amelyek közül az egyik ezen a metszeten csatlakozik egy piramisajt dendritághoz (Pd). Az aszimmetrikus szinapszisok posztszinaptikus denzitásaira nyílhegyek mutatnak. D: A képen látható biocytinnel jelölt bouton (b3) posztszinaptikus céleleme egy interneuron dendrit (Id), amelynek dendritágát az interneuronokra jellemzően sűrűn beborítják aszimmetrikus

szinapszisokat formáló terminálisok (fehér nyílhegyek). Skálák: A: 100 μm , B-D: 0,5 μm .

Forrás: Takács és mtsai, in press, módosítva.

5.1.3. Az entorhinalis rostok különböző célelem-eloszlást mutatnak a str. lacunosum-moleculare területén és a rétegen kívül

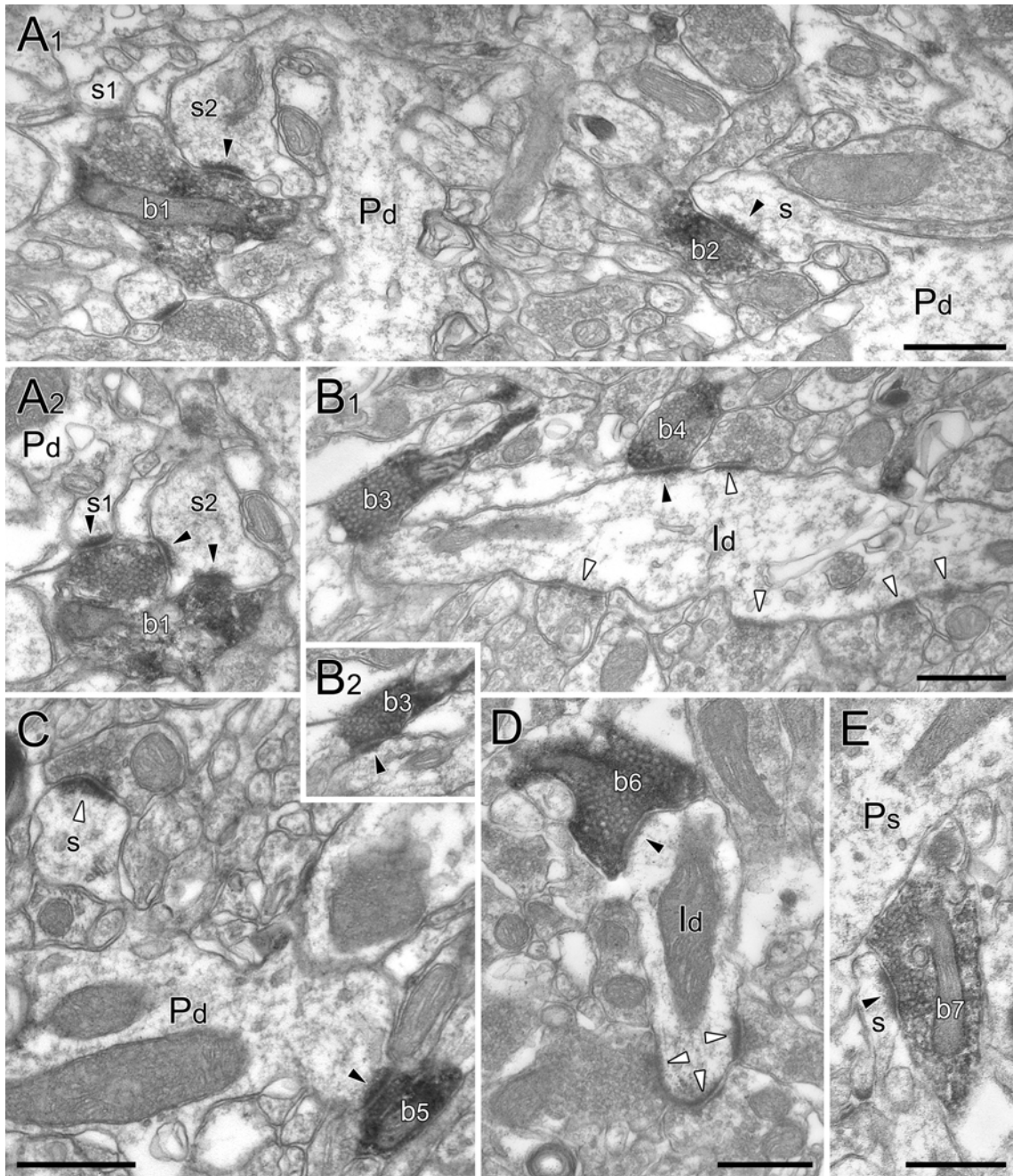
A perforáns pálya CA1 régiót beidegző temporo-ammonicus rostjainak jelölése céljából anterográd pályajelölő anyagot, PHAL-t juttatunk a medialis entorhinalis kéregbe. A beadási területen a DAB csapadék főleg a medialis entorhinalis kéreg felszíni rétegeit töltötte be.

A perforáns pálya több, anatómiailag és funkcionálisan is elkülönülő részből áll, amelyek az entorhinalis kéreg jól körülhatárolható területeiről és rétegeiből erednek (Steward és Scoville, 1976; Amaral és Witter, 1989; Witter és mtsai, 2000; van Strien és mtsai, 2009). A műtött állatokban a medialis entorhinalis kéregből kiinduló pályák jelölésével kapott hippocampalis rostfestés megegyezett a fenti közleményekben található adatokkal. A rostok többsége a gyrus dentatus molekuláris rétegének középső harmadában, a CA3 str. lacunosum-moleculare belső felében, és a proximalis CA1 (a CA1 régió CA2 melletti része) lacunosum-moleculare rétegének teljes mélységében volt megfigyelhető.

Deller és mtsai (1996) közleményével összhangban a CA1 régióba tartó entorhinalis axonoknak két útvonalát lehetett megfigyelni: (i) A rostok többsége a subiculumon áthaladva lépett a CA1 területére, és sűrű axonfelhőt képezett a proximalis CA1 str. lacunosum-moleculare-ban. (ii) Sokkal kevesebb axon érkezett egy másik irányból. Ezek az angularis köteg (angular bundle) területén bekanyarodtak a hippocampus felé, majd az alveuson keresztül futottak, amíg elérkeztek a proximalis CA1 területére. Itt éles kanyart vettek, és radiális irányban áthaladtak a str. oriens, str. pyramidale és str. radiatum rétegeken, majd csatlakoztak a str. lacunosum-moleculare-ban található nagyszámú jelölt axonhoz. Ezek az ún. alvearis pályához (alvear pathway; Deller és mtsai, 1996) tartozó axonok boutonokat hordoztak az alveus, a str. oriens, str. pyramidale és str. radiatum területén is.

A str. lacunosum-moleculare-ban jelölt boutonok, illetve az alvearis pálya célsejt-szelektivitásának meghatározása céljából elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk. A str. lacunosum-moleculare-ban random módon, a disector módszerrel mintavételezett szinapszisok (n=130, 3 állatból) túlnyomó többsége, 90,8%-a piramis sejtekkel létesített kapcsolatot, míg 8,5%-a interneuronokat innervált (3. táblázat). A beidegzett piramis sejtek 88,5%-a esetében tüske volt a célelem (8.A ábra), míg 2,3%-a a szinapszisoknak piramis sejt dendritágakon volt megfigyelhető (8.C ábra). Az interneuronok esetében csak dendritágakon találtunk jelölt szinapszist (8.B ábra). Desmond és mtsai (1994) közleményével egyezően mintánkban a temporo-ammonicus axonok kizárólag aszimmetrikus szinapszisokat képeztek (8. ábra). A három állat nem volt különböző a str. lacunosum-moleculare-ban vizsgált entorhinalis rostok célelemeinek eloszlása alapján (3. táblázat; $X^2=2,044$; $P=0,3598$).

Az alvearis axonok jelölt terminálisait (n=127 szinapszis) az alveusban, a str. oriensben (n=52), str. pyramidale-ban (n=30) és str. radiatumban (n=41) kis számuk miatt korrelált fény-, és elektronmikroszkópos módon vizsgáltuk. A fénymikroszkópos vizsgálat során előre kiválasztott jelölt axonokat rekonstruáltunk az elektronmikroszkópban, sorozatmetszetek felhasználásával. A beidegzett profilok nagy része esetükben is piramis sejtek tüskéjének bizonyult (78,7%; 8.E ábra), de sokkal magasabb százalékban innerváltak interneuronokat (21,3%; 8.D ábra) mint a str. lacunosum-moleculare-ban jelölt rostok (3. és 4. táblázat; $X^2=7,232$; $P=0,0048$). A szinapszisok főleg az interneuronok dendritágain helyezkedtek el (20,5%; 8.D ábra), de egy esetben (0,8%) interneuron-tüskét is találtunk a posztzinaptikus célelemek között. Az alvearis pálya célelem-eloszlása alapján a három állat nem volt különböző (3. táblázat; $X^2=0,417$; $P<0,8116$).



8. Ábra. Az entorhinalis axonok különböző arányban idegezik be a piramis sejteket és interneuronokat a CA1 str. lacunosum-moleculare területén és a rétegen kívül.

A1 és A2: A str. lacunosum moleculare-ban a poszt-szinaptikus elemek túlnyomó része piramis sejt tüske. A1: Két PHAL-jelölt bouton (b1 és b2) aszimmetrikus szinapszisokat létesít (nyílhegyek) piramis sejt tüskékkel (s és s2). A két tüske ebben a metszetben csatlakozik egy-egy dendritághoz (Pd). Az A2 ábrán megfigyelhetjük, hogy az A1 részen bemutatott b1 bouton egy további szinapszist létesít egy kisebb méretű tüskével (s1), amely ebben a metszetben csatlakozik egy dendritághoz (Pd). Emellett az is látható,

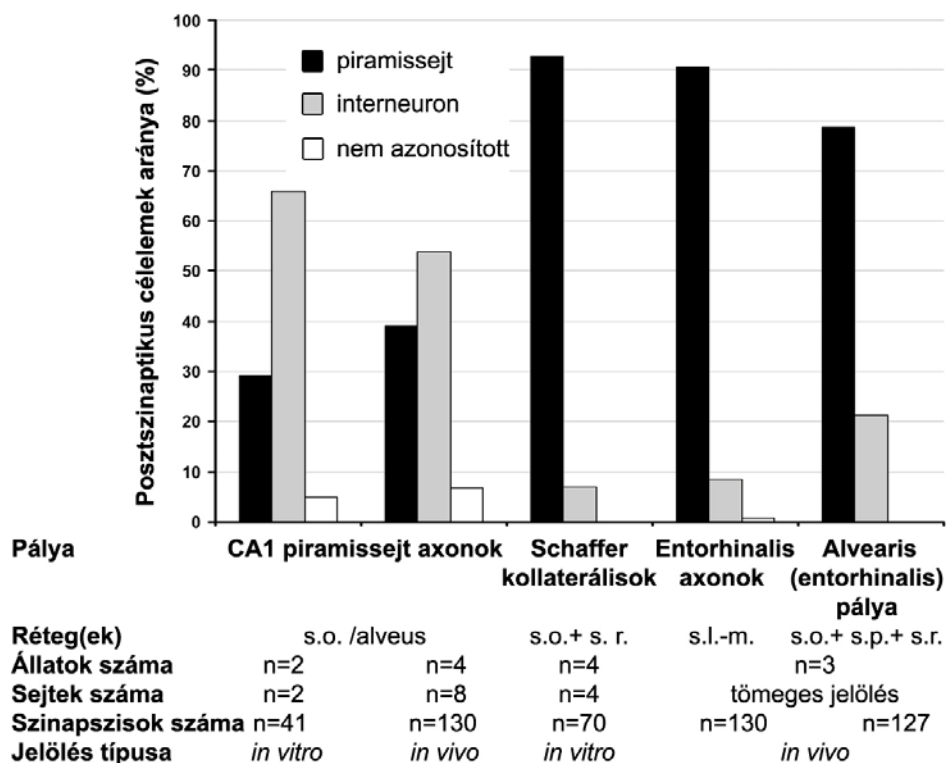
hogy s2 tüskével létesített szinapszis perforált (a posztszinaptikus denzitás két, nyílhegyekkel jelzett, különállónak tűnő részre válik szét). B1: Egy interneuron dendritággal (Id) két PHAL-jelölt bouton létesít kapcsolatot (b3 és b4). A b4 bouton aszimmetrikus szinapszist formál (fekete nyílhegy) az interneuron dendritággal, amelyre több további (köztük sok aszimmetrikus) bemenet érkezik (fehér nyílhegyek). B2: A b3 bouton a sorozat következő metszetén formál szinapszist (nyílhegy) a B1 ábrán bemutatott interneuron dendrittel. C: A str. lacunosum moleculare-ban ritkán piramisajt dendritágakat is találtunk az entorhinalis axonok célelemei között. Egy PHAL-jelölt bouton (b5) aszimmetrikus szinapszist formál a tüskéi alapján piramisajtként azonosított dendritággal (fekete nyílhegy). Az ábrán megfigyelhetünk egy, a jelölt bouton által beidegzett dendritághoz csatlakozó tüskét is, amellyel egy jelöletlen bouton létesít aszimmetrikus szinapszist (fehér nyílhegy). D-E: Az alvearis pálya str. lacunosum-moleculare-n kívüli rétegekben megvizsgált rostjai gyakrabban innerválnak interneuronokat a str. lacunosum moleculare-ban tanulmányozott axonoknál. D. Egy PHAL-al jelölt alvearis axon boutonja (b6) aszimmetrikus szinapszist képez (fekete nyílhegy) egy interneuron dendritággal (Id) a str. oriensben. A dendritágra további aszimmetrikus bemenetek érkezik nem jelölt boutonoktól (fehér nyílhegyek). E: Egy jelölt alvearis axon terminálisa (b7) egy piramisajtüskét (s) idegez be aszimmetrikus szinapszissal (nyílhegy). A bouton mellett egy piramisajt szómájának részlete (Ps) látható. Skálák: 0,5 μ m.

Forrás: Takács és mtsai, in press, módosítva.

5.1.4. A CA1 régió glutamáterg bemeneteinek statisztikai összehasonlítása

A statisztikai elemzés kimutatta, hogy a CA1 piramisajték lokális célelemei között szignifikánsan nagyobb arányban találtunk interneuronokat (az összes célelem 56,7%-a), mint a három másik vizsgált pálya esetében (Schaffer kollaterálisok, entorhinalis rostok a str. lacunosum-moleculare-ban és alvearis pálya), amelyek főleg piramisajtéket idegeztek be (4. táblázat, 9. ábra). Az entorhinalis rostok két különböző útvonalon érkező csoportja szignifikánsan különbözött egymástól (4. táblázat, 9. ábra): az alvearis pálya str. lacunosum-molecularen kívül mintavételezett axonjai nagyobb százalékban idegeztek be interneuronokat (21,3%) mint a str. lacunosum-moleculare-

ban mintavételezett entorhinalis rostok (8,5%). Az alvearis pálya a Schaffer kollaterálisokkal összehasonlítva szintén szignifikánsan nagyobb százalékban innervált interneuronokat (21,3% vs. 7,1%, 4. táblázat, 9. ábra). A Schaffer kollaterálisok nem különböztek szignifikánsan a posztszinaptikus piramissejtek és interneuronok arányában a str. lacunosum-moleculare entorhinalis rostjaitól (4. táblázat, 9. ábra).



9. Ábra. A CA1 régió három fő glutamaterg bementének célelem eloszlása

Az oszlopdigram az adott *in vivo* vagy *in vitro* jelölt pálya összes megvizsgált szinapszisának arányában mutatja a piramissejteket beidegző szinapszisok százalékos arányát fekete-, az interneuronokat innerváló szinapszisokét pedig szürke színnel. A fehér oszlopok azon szinapszisok arányát jelölik, amelyek posztszinaptikus célelemeit nem tudtuk azonosítani. Rövidítések: s.o.: stratum oriens, s.r.: stratum radiatum, s. l-m: stratum lacunosum-moleculare.

Forrás: Takács és mtsai, *in press*, módosítva.

4. Táblázat. A CA1 régió különböző glutamáterg pályáinak statisztikai összehasonlítása posztszinaptikus célelem-szelektivitás alapján

Forrás: Takács és mtsai, in press, módosítva.

Glutamáterg pálya	CA1 piramissejt lokális kollaterálisok	Schaffer kollaterálisok	Entorhinalis axonok (s. l.-m.)
Schaffer kollaterálisok	$X^2=54,289$; $P<0,0001$		
Entorhinalis axonok (s. l.-m.)	$X^2=80,619$; $P<0,0001$	$X^2=0,9431$; $P= 0,7928$	
Entorhinalis axonok (alvearis pálya)	$X^2=43,127$; $P<0,0001$	$X^2=5,618$; $P=0,0092$	$X^2=7,232$; $P=0,0048$

A statisztikailag szignifikáns különbséget vastagon szedett betűkkel jeleztük. S. l.-m.: stratum lacunosum-moleculare.

5.2. A HS sejtek szinaptikus kapcsolatai

5.2.1. HS sejtek típusai és előfordulási helyük

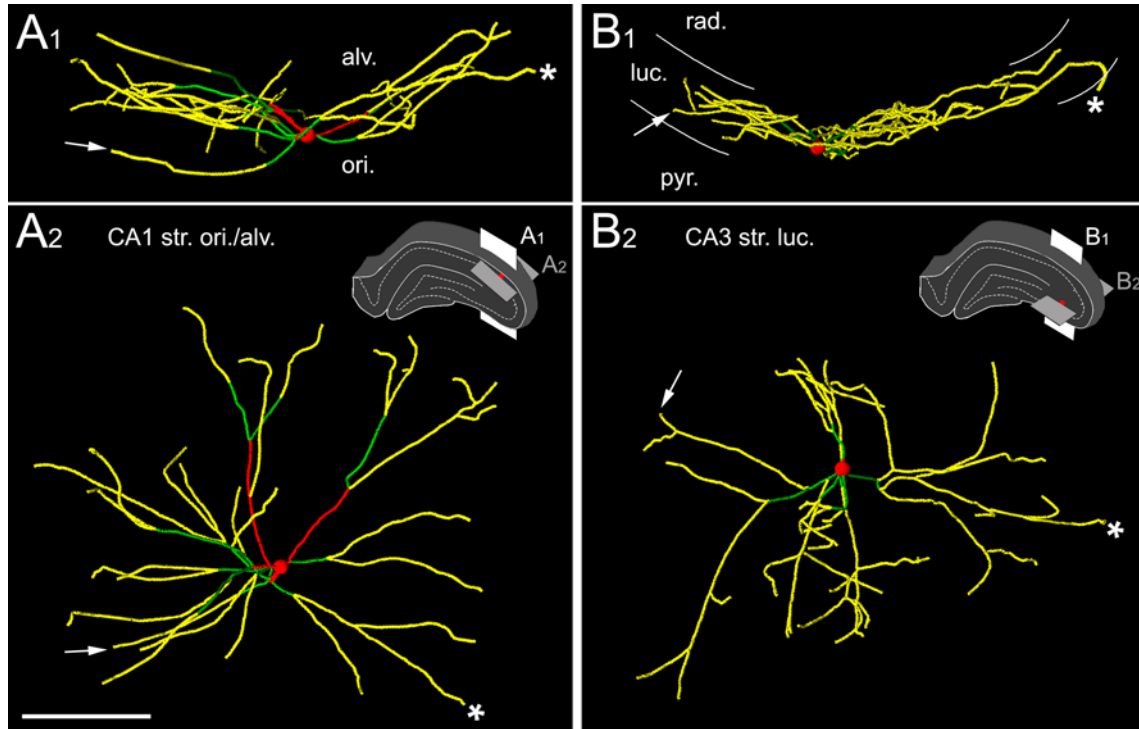
A HS sejtek morfológiai vizsgálata céljából BDA-t juttatunk a MS-DB-be (n=8 patkány), amely retrográd úton megjelölte az erre a területre vetítő sejteket. A jelölt sejtek előfordulási területe megegyezett az irodalmi adatokkal (13.D ábra; Alonso és Köhler, 1982; Tóth és Freund, 1992; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007). A fenti közleményekkel összhangban HS sejteket a CA1-3 régió oriens- és alveus rétegeiben, a CA3 str. radiatum területén és a hilusban, ritkábban pedig a str. lucidumban találtunk. Nagyon ritkán a CA3 piramisrétegében is lehetett látni jelölt sejteket.

A felvett BDA mennyiségétől függően a HS sejtek különböző mértékben jelölődtek. Bizonyos sejtekben csak BDA-t tartalmazó lizoszómákat lehetett megfigyelni, amelyek granuláris jelölést adtak a szómában és a proximalis dendritekben (13.B ábra), míg más sejteknek a teljes dendritfája kirajzolódott (pl. 11.C ábra). Az utóbbi sejteknek fénymikroszkópban láthatóak voltak a tüskéi is (11.C és 12.C ábra). Az erősen feltöltött sejtek alapján két morfológiai típust határoztunk meg, a sűrűn-tüskés- (densely-spiny), és a ritkán-tüskés (sparsely-spiny) HS sejtek csoportját, amelyek elhelyezkedésük alapján is elkülönültek.

5.2.1.1. A CA1 régió HS sejtjei ritkán-tüskések

Korábbi közleményekkel összhangban a jelölt HS sejtek a CA1 területén belül kizárólag a str. oriensben és az alveusban fordultak elő, leggyakrabban a két réteg határán (10.A, 13.D és 17.A ábra; Alonso és Köhler, 1982; Tóth és Freund, 1992; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007). Többségüknek nagyméretű [203 ± 57 (SD) μm^2 átmetszeti terület], hosszúkás alakú, horizontális irányban elnyúlt szómája volt, amelyből 3-6 ($4.4 \pm 0,8$) különböző átmérőjű dendrit eredt (10.A, 14.B, és 17.A ábra). A sejtek teljes dendritfája a str. oriens és az alveus területére korlátozódott, további rétegekbe átlépő dendritágakat nem lehetett megfigyelni. A hosszú, horizontális irányban elnyúló dendritek ritkán ágaztak el, és a dendritfa 3-dimenziós rekonstrukció

(n=3, 10.A és 17.A ábra) alapján azonos távolságra (700-800 μm) terjedt a septo-temporalis és medio-lateralis irányokban. A proximalis dendriték mindig simák voltak, míg a distalis ágakon elkülönülő fej és nyak résszel nem rendelkező rövid tüskéket lehetett elszórtan megfigyelni.



10. Ábra. Különböző típusú HS sejtek réteg-specifikus horizontális dendritfája

A1-2: Egy BDA-jelölt CA1 str. oriensben elhelyezkedő ritkán-tüskés HS sejt dendritfájának 3-dimenziós rekonstrukciója két különböző nézetből. B1-B2: Egy a CA3 str. lucidumban található BDA-jelölt sűrűn-tüskés HS sejt 3-dimenziós rekonstrukciója két különböző nézetből. Az A2 és B2 inzertjén megfigyelhető a két sík, amelyből a két nézet készült. Az A1 és B1 síkot fehér téglalappal, az ezekre merőleges A2 és B2 síkot pedig szürke téglalappal jelöltük. A szómák elhelyezkedését az inzerten piros pöttyel jelöltük. A tüskéket nem ábrázoltuk. Látható, hogy mindkét sejt dendritfája szigorú réteg-specifitást mutat: a CA1 ritkán-tüskés HS sejt összes dendritje kizárólag a str. oriens/alveus rétegekben található, míg a CA3 sűrűn-tüskés HS sejt teljes dendritfája a str. lucidumban helyezkedik el. Emiatt a dendritfa a rétegre merőleges síkban (A1 és B1) „Y irányban” keskeny, az azzal párhuzamos síkban viszont mind X mind Y irányba kiterjed. A hippocampalis glutamáterg pályák réteg szerinti elhelyezkedésének köszönhetően a sejtek jellegzetes dendritfája meghatározza bemeneti tulajdonságaikat:

míg a CA1 str. oriens/alveus határon található ritkán-tüskés HS sejt szinaptikus bemeneteinek többségét valószínűleg a CA1 piramissejtektől kapja addig a str. lucidumban található sűrűn-tüskés HS sejtet szinte kizárólag a szemcses sejtek moharost terminálisai idegezik be. A 3-dimenziós rekonstrukció az ARBOR program segítségével készült. A dendritfák helyzetének különböző síkokban való könnyebb azonosítása kedvéért egy-egy dendritet csillaggal és nyíllal jelöltünk mindkét sejt esetében. A dendritek különböző színei a vastagságukat jelölik (piros: vastag, zöld: közepesen vastag, sárga vékony). Rövidítések: alv.: alveus; luc.: lucidum; ori: oriens; p: pyramidale; str.: stratum. Skála: 100 μm .

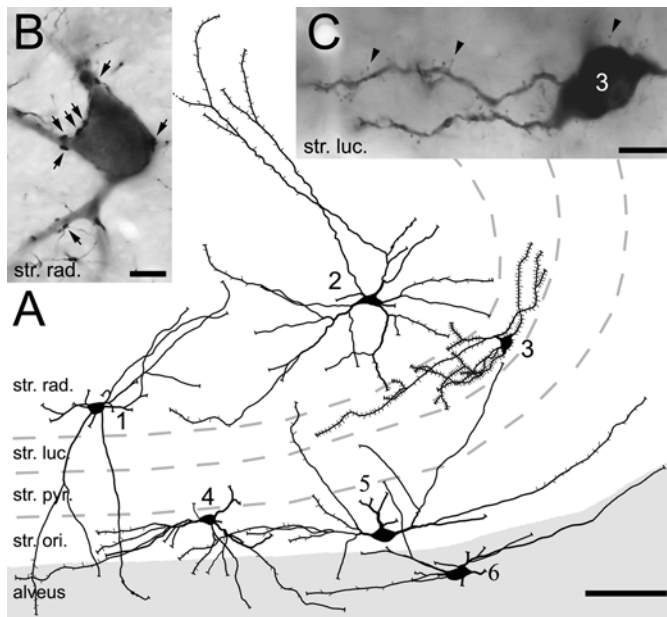
Forrás: nem publikált saját ábra.

5.2.1.2. A HS sejtek mindkét típusa előfordul a CA3 régióban

A CA3 területén a str. lacunosum-moleculare-t kivéve minden rétegben találtuk a MS-DB-be vetítő sejtet, amelyek morfológiája jellemző volt az adott rétegre (11. ábra).

A str. oriensben és alveusban található HS sejtek morfológiája hasonló volt a CA1 HS sejtekéhez, de kisebb eltéréseket megfigyelhetünk a két terület sejtjei között. A CA3 str. oriens/alveus területén található HS sejtek mérete valamivel nagyobb volt, mint a CA1 HS sejteké [299 \pm 83 (SD) μm^2 átmetszeti terület; két-mintás t-teszt, P=0,0005]. Bár dendritjeik többsége horizontális irányú volt, a CA1 HS sejtekével ellentétben átléphetek a str. pyramidale-ba és lucidumba, és elérhették a str. radiatumot is.

A str. radiatumban lévő sejtek többsége nagy szómával rendelkezett [343 \pm 96 (SD) μm^2 átmetszeti terület], amely a str. lucidum határához közel helyezkedett el. A dendritfájuk multipoláros volt, 2-6 (4.7 \pm 1) sima felszínű proximalis dendrittel, amelyek általában rögtön a szóma mellett ágaztak el, és minden irányba futhattak (11.A ábra). Gyakran keresztezték a str. lucidum és pyramidale területét is, majd elágaztak a str. oriensben, és akár az alveusba is beléphetek. Distalis dendritjeik általában ritkásan elszórt tüskéket hordoztak, de lehettek simák és varikózusak is. A különböző típusú distalis dendritek egyazon sejt esetében is előfordulhattak. A tüskék sűrűségének megfelelően ezeket a sejteket a CA1-3 str. oriensben található HS sejtekkel együtt a ritkán-tüskés HS sejtek csoportjába soroltuk.



11. Ábra. A HS sejtek morfológiailag heterogén csoportot alkotnak CA3 területén.

A: A CA3 régió különböző típusú HS sejtjeinek camera lucida rajza. A str. oriensben (4. és 5. sejt) és alveusban (6. sejt) található HS sejtek a CA1 HS sejtjeihez hasonlítanak: horizontális tüskét nem hordozó proximalis-, és ritkán-tüskés distalis dendritekkel

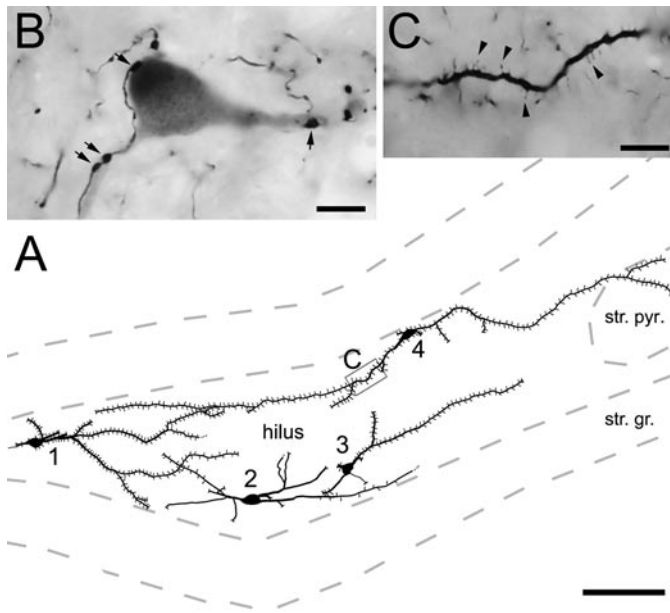
rendelkeznek, amelyek főleg az oriens és alveus rétegben húzódnak. A CA3 területén a CA1 régióval ellentétben a str. radiatumban is vannak HS sejtek (1. és 2. sejt), amelyek dendritjei az oriens és alveus rétegben található HS sejtekéhez hasonlóak (tüske-mentes proximalis-, ritkán-tüskés vagy varikóz distalis dendritek). Ellentétben viszont az oriens és alveus HS sejtjeivel dendritfájuk nem horizontális, hanem minden irányban kiterjed és eléri az összes réteget. A str. lucidumban figyelhető meg a sokkal ritkábban előforduló sűrűn-tüskés HS sejtek csoportja (3. sejt), amelyeknek összes dendritje és szómája is hosszú tüskéket visel (C, nyílhegyek). A sejteket különböző 80 μm -vastag metszetekből rajzoltuk ki (egy-egy metszet/sejt), majd a rajzokat egymásra vetítettük. Az ábrán a dendritek vastagságát és a tüskék hosszát megnöveltük, a tüskék sűrűségét pedig csökkentettük a jobban láthatóság kedvéért. B: A fénymikroszkópos felvételen egy CA3 str. radiatumban elhelyezkedő HS sejt látható, amelynek szómáját és proximalis dendritjeit nagy, BDA-jelölt (valószínűleg septo-hippocampalis) boutonok veszik körül. A nyíllal jelölt terminálisokat elektronmikroszkópban ellenőriztük. Mind a hét bouton szinapszist létesített a HS sejtrel és GABA-pozitív volt. C: A camera lucida rajzon ábrázolt sűrűn-tüskés sejt (3.) fénymikroszkópos képe. Hosszú tüskék borítják a sejt str. lucidumban elhelyezkedő teljes dendritfáját és szómáját (nyílhegyek). Ugyanezen sejt 3-dimenziós rekonstrukciója a 10. B ábrán látható. Rövidítések: str. luc.: stratum lucidum, str. ori.: stratum oriens, str. pyr.: stratum pyramidale, str. rad: stratum radiatum. Skálák: A: 100 μm ; B és C: 10 μm .

Forrás: Takács és mtsai, 2008.

Egy ezektől teljesen eltérő sejttípust találtunk a CA3 str. lucidum területén, amely teljes dendritfáját és szómáját hosszú, néhol elágazó tüskék borították (11.A és C ábra). Ennek megfelelően sűrűn-tüskés HS sejteknek neveztük őket. Ez a típus horizontális dendritfával rendelkezett, amely néhány vastag proximalis-, és ezekből elágazó, kanyargós vékonyabb dendritekből állt, melyek sűrű hálózatot képeztek a str. lucidumon belül (10.B ábra). További rétegekbe ezek a dendritek nem léptek át, így a dendritfa emlékeztetett a CA1 oriens HS sejteinek dendritfájára (10. ábra). A mintánkban ennek a típusnak a képviselői sokkal ritkábban fordultak elő, mint a ritkán-tüskés HS sejtek.

5.2.1.3. A hilaris HS sejtek csoportja heterogén

A hilaris HS sejtek dendritjei általában a hilus területére korlátozódtak, és csak ritkán léptek át a CA3c alrégióba (12. ábra). A hilusban a ritkán-tüskés, és sűrűn-tüskés sejtek csoportja nem vált el olyan élesen mit az ammonszarv területén. A két típus egyikébe egyértelműen besorolható sejteket is találtunk, de a sejtek többsége köztes bélyegeket mutatott: változó mértékben tüskés proximalis és distalis dendritekkel rendelkezett (12.C ábra), de a szómáján nem voltak tüskék (12.B ábra). A CA3c területén a hilus sejteihez hasonló morfológiájú sejteket találtunk. A hilaris sejtek szómájából $3,6 \pm 0,9$ (SD) dendrit eredt, szóma- keresztmetszetük területe pedig 262 ± 67 μm^2 (SD) volt.



12. Ábra. A gyrus dentatus hilusában található HS sejtek

A: A hilaris HS sejtek dendritjei szinte kizárólag a hilus területére korlátozódnak, és csak ritkán lépnek be a CA3c területére (4. sejt). A sűrűn-tüskés HS sejtek (1. és 4. sejt) tüskés szómával és dendritekkel rendelkeznek. A hilaris HS sejtek többségének tüske-mentes szómája és tüskés dendritjei vannak (3. sejt). A hilus

területén kevésbé gyakoriak a ritkán-tüskés HS sejtek. Ezeknek csak a distalis dendritjein lehet találni ritkán elszórt tüskéket. A ritkán-tüskés sejteket tipikusan BDA-jelölt (valószínűleg septo-hippocampalis) boutonok fedték (B). A sűrűn-tüskés sejteken sokkal ritkábban találni BDA-jelölt boutonokat. A sejteket különböző 60- (1-3 sejt), vagy 80 μm -vastag (4 sejt) metszetekből rajzoltuk ki (egy-egy metszet/sejt), majd a rajzokat egymásra vetítettük. Az ábrán a dendritek vastagságát és a tüskék hosszát megnöveltük a tüskét denzitását pedig csökkentettük a jobban láthatóság kedvéért. B: BDA-jelölt, valószínűleg septo-hippocampalis boutonok egy ritkán-tüskés HS sejt szómáján és proximalis dendritjein (nyilak). C: A camera lucida rajzon 4. jelzésű sejt bekeretezett dendritszakaszának fénymikroszkópos fotója. A dendritet hosszú tüskék (nyílhegyek) borítják. Rövidítések: str. gr.: stratum granulosum, str. pyr.: str. pyramidale. Skálák: A: 100 μm ; B és C: 10 μm .

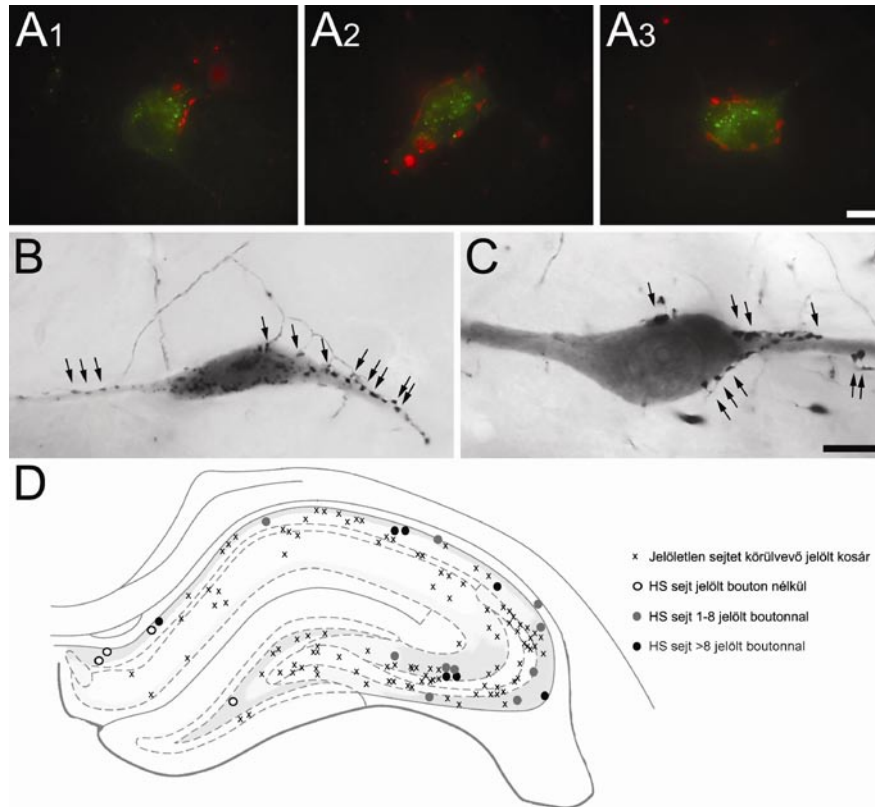
Forrás: Takács és mtsai, 2008.

5.2.2. A HS sejtek reciprok kapcsolatban állnak a septo-hippocampalis sejtekkel

5.2.2.1. Az MS-DB-ból érkező jelölt rostok végződési mintázata a hippocampus területén

A HS sejtek jelölése céljából az MS-DB területére juttatott BDA-t az axonok nemcsak retrográd módon szállították, hanem anterográd úton is. Ennek következtében

a műtött patkányokban a HS sejtek mellett anterográd úton megjelölődött a septo-hippocampalis pálya is. Az ily módon a hippocampusban BDA-val feltöltött axonok rétegenkénti eloszlása és végződési mintázata megegyezett korábbi közlemények adataival, amelyekben a septalis axonokat anterográd pályajelölő anyaggal, PHAL-al jelölték meg (Nyakas és mtsai, 1987; Freund és Antal, 1988). A legerősebb axonfestést a hilusban és a CA3 oriens és radiatum rétegeiben, valamint a CA1 str. oriens alveushoz közel eső harmadában kaptuk (13.D ábra). A legtöbb jelölt axon nagy, a kollaterális mentén szabálytalanul, csoportokban elhelyezkedő boutonokkal rendelkezett, és gyakran kúszórost-szerűen körbevette jelöletlen (vagy jelölt, lásd később) sejtek szómáit és proximalis dendritjeit, szinte teljesen kirajzolva egyedi sejteket [„1-es típusú axon” Nyakas és mtsai közleményében, (1987); 13.A és B ábra]. Egy sokkal kevésbé sűrű rostköteget lehetett megfigyelni a str. lacunosum-moleculare és a str. radiatum határán, ami csak nagyon ritkán formált periszomatikus kosarakat. A CA1 str. radiatumban, CA1-3 str. pyramidale-ban és a CA1 str. oriens belső kétharmadában gyengébb axonfestést kaptunk, de itt is sok jelölt kosarat találtunk, amelyek egy-egy (a korábbi közlemények alapján GABAerg) sejtet fontak körül (13.D ábra; Freund és Antal, 1988; Gulyás és mtsai, 1990; Freund, 1992). A str. lacunosum-moleculare-ban csak nagyon ritkán találtunk jelölt rostokat. Közvetlenül a gyrus dentatus szemcsesejtrétege fölött és molekuláris rétegében, valamint sokkal ritkábban az ammonszarv különböző területein is apró boutonokkal rendelkező axonokat is találtunk. Ez a morfológia a cholinerg boutonokra jellemző („2-es típusú axonok” Nyakas és mtsai közleményében (1987); Frotscher és Léránth, 1985).



13. Ábra. Az MS-DB és a hippocampus sejtpopuláció-szintű reciprok kapcsolatban állnak egymással: a retrográd úton feltöltődött MS-DB-be vetítő interneuronokat beidegzik az anterográd tracerrel jelölt septo-hippocampalis axonok.

A1-3: A sárga-zöld fluoreszcens mikrogyöngyöket tartalmazó retrográd pályajelölő anyaggal feltöltődött HS sejteket körülfonják az anterográd pályajelölő anyaggal (PHAL, piros) jelölt septo-hippocampalis boutonok (CA3, str. radiatum). B és C: A BDA MS-DB-be történő beadásával retrográd úton jelölt HS sejteket BDA-jelölt, valószínűleg septalis eredetű terminálisok idegeznek be. Míg a fluoreszcens mikrogyöngyök csak a szómában láthatóak, a BDA a felvett mennyiségtől függően különböző mértékben kirajzolja a jelölt sejtek dendritfáját is (B és C, valamint 10. ábra) D: A retrográd módon BDA-jelölt HS sejtek (körök), BDA-jelölt, valószínűleg septalis eredetű rostok (szürke terület) és BDA-jelölt periszomatikus kosarak (x) eloszlása a hippocampusban. A septo-hippocampalis boutonokkal körbevett HS sejteket nyolcnál kevesebb bouton esetében szürkével, annál több terminális esetében feketével jelöltük. A ábra három állat egy-egy metszetének egymásra rajzolásával és egy Paxinos és Watson atlaszából származó ábra felhasználásával (1998) készült. Látható, hogy pericelluláris septo-hippocampalis kosarakat a hippocampus szinte minden területén találni,

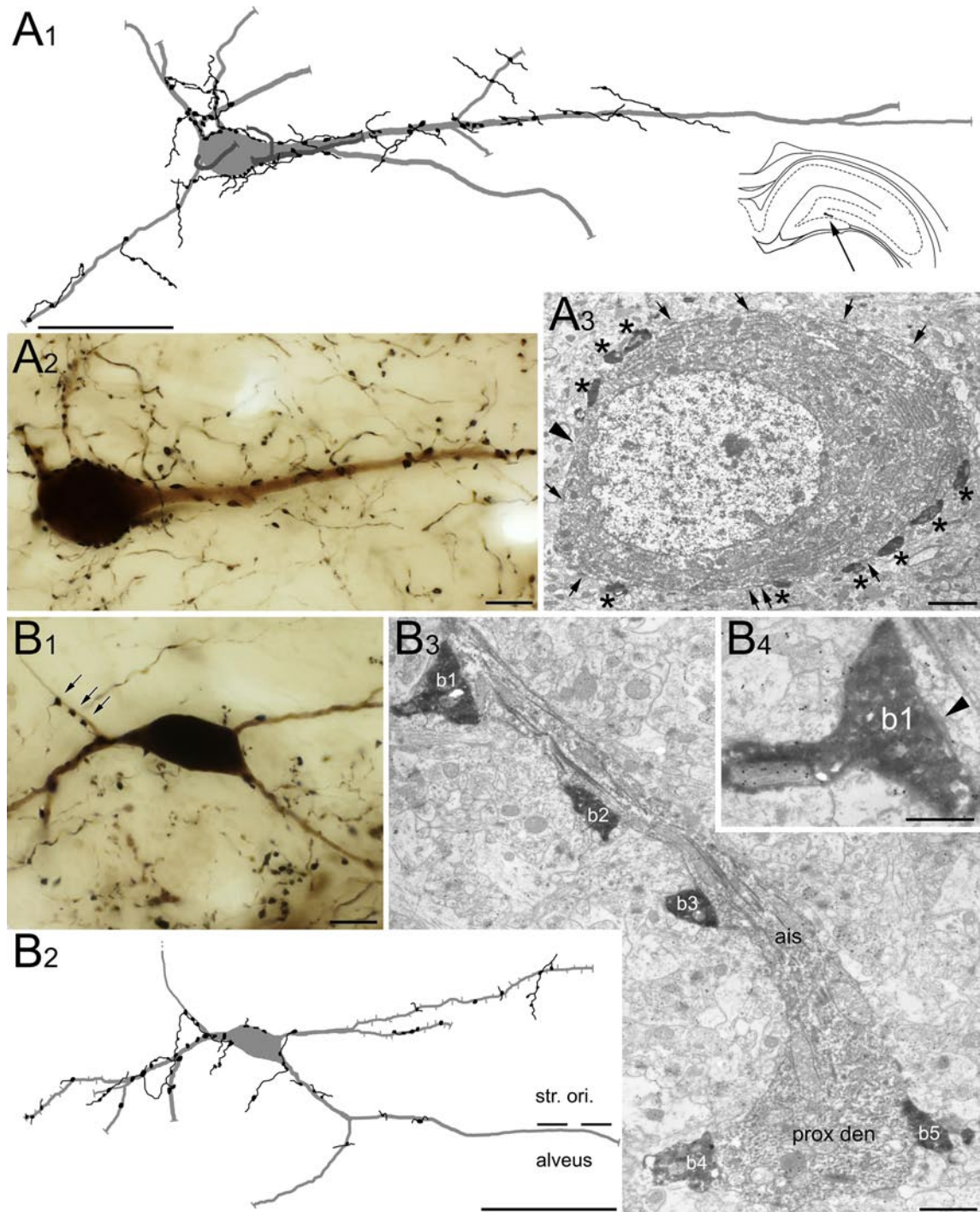
valamint, hogy szinte az összes jelölt HS sejt beidegzést kap jelölt, valószínűleg septo-hippocampalis axonoktól. Skálák: 10 μ m.

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

5.2.2.2. A HS sejteket dúsan beidegzi a GABAerg septo-hippocampalis pálya

A jelöletlen interneuronok mellett a BDA-jelölt rostok boutonjai sok esetben körbevették a jelölt HS sejtek szómáit és dendritjeit is (13.B-D és 14. ábra). Esetükben a retrográd sejtjelölésnek köszönhetően a distalis dendriteket beidegző boutonokat is meg lehetett figyelni. Mivel a BDA anterográd út mellett retrográd módon is transzportálódik, nem állíthatjuk, hogy az összes jelölt bouton az MS-DB-ben elhelyezkedő sejtől eredt. Irodalmi adatok szerint legalább három további eredete is lehetett a jelölt axonoknak. i) A rostok lehetnek a retrográdan megjelölt HS sejtek lokális kollaterálisai (Gulyás és mtsai, 2003). ii) és iii) Az axonok lehetnek a supramammillaris nucleusban vagy a medialis raphe magban található sejtek hippocampusba vetítő axonjai is, hiszen erről a két területről ismert, hogy olyan sejteket tartalmaz, amelyek a hippocampusba és az MS-DB területére egyaránt vetítenek (Borhegyi és mtsai, 1998; McKenna és Vertes, 2001).

Emiatt két különböző, egy kizárólag anterográd (PHAL)-, és egy csak retrográd irányba szállítódó (sárga-zöld fluoreszcens mikrogyöngy) pályajelölő anyagot adtunk be az MS-DB-be (n=1), különböző beadási pontokra. A kísérlet eredményeképpen retrográdan megjelölődött sejtek és anterográd úton megjelölődött axonok eloszlási mintázata megegyezett a fenn leírtakkal. A mikrogyöngy felhasználásával csak a vetítő sejtek szómái jelölhetők, a dendritfába ez a jelölő anyag nem terjed szét. A mikrogyöngyöt tartalmazó HS sejt szómák az ammonszarv és a hilus területén is körbe voltak véve PHAL-lal jelölt septo-hippocampalis boutonokkal (13.A ábra), megerősítve a BDA jelöléssel kapott eredményt.



14. Ábra. A ritkán-tüskés HS sejtek septalis beidegzése rendkívül erős: gátló bemeneteik többsége az MS-DB-ből eredhet.

A1 és A2: Egy hiliaris ritkán-tüskés retrográdan jelölt HS sejt és a rajta található BDA-jelölt, valószínűleg septalis eredetű terminálisok camera lucida rajza (A1) és fénymikroszkópos felvétele (A2). Az A1 inzertje a sejt elhelyezkedését mutatja (nyíl). A3: Az előbbi sejt szómájának elektronmikroszkópos képe, amelyen látható, hogy gátló

bemeneteinek többsége BDA-jelölt. Ezen a metszeten a számára kilenc BDA-jelölt (GABA-pozitív) bouton (csillagok) mellett csak egyetlen jelöletlen GABA-pozitív terminális érkezik (nyílhegy). A nyilak a sejtestre érkező GABA-negatív bemeneteket jelölik. Fontos megjegyezni, hogy utóbbi bemenetek aránya a GABA-pozitív terminálisokéhoz képest jóval nagyobb, mint amit a kép sugall, mert a GABA-negatív boutonok mérete kisebb a pozitívaknál (Gulyas és mtsai, 1999), így egy-egy GABA-negatív bouton kevesebb metszetben látható. B1-3: Egy a CA1 str. oriensben elhelyezkedő, retrográdan jelölt ritkán-tüskés HS sejt számáját, proximalis dendritjeit és axon iniciális szegmentumát BDA-jelölt boutonok idegezik be. A fénymikroszkopós fotó (B1), a camera lucida rajz (B2) és az elektronmikroszkopos felvételek (B3 és 4) bemutatják, hogy egy BDA-jelölt axon három boutonja (nyilak, b1,2,3) innerválja a HS sejt axon iniciális szegmentumát (ais). Ugyanez az axon beidegzi a sejt számáját és proximalis dendritjét („prox den” a B3 ábrán) is, ahogy az a B2 rajzon megfigyelhető. B4: A nagy nagyítású elektronmikroszkopos képen megfigyelhető, hogy a b1 bouton GABAerg (a pozitívítást aranyzemcsék igazolják a bouton mitochondriuma felett), és szinapszist létesít az axon iniciális szegmentummal (nyílhegy). Az axon iniciális szegmentumot elektronmikroszkopos sorozatmetszeteken keresztül az axon kezdeti szakaszát borító myelinhüvely kezdetéig követtük. Az A3 és B3 ábrán látható minden BDA-jelölt bouton GABA-pozitív volt és a szomszédos metszeteken szinapszist formált a vele érintkező HS sejttel. Skálák: A1, B2: 50 μm ; A2 és B1: 10 μm ; A3: 2 μm , B3: 1 μm ; B4: 0,5 μm .

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

A septo-hippocampalis pálya főleg cholinerg és GABAerg sejtek rostjaiból áll (Wenk és mtsai, 1975; Köhler és mtsai, 1984; Amaral és Kurz, 1985; Frotscher és Léránth, 1985; Freund és Antal, 1988; Naumann és mtsai, 1992; Wainer és mtsai, 1993; Sotty és mtsai, 2003), és újabb közlemények alapján kisebb arányban glutamáterg axonokat is tartalmaz (Sotty és mtsai, 2003; Colom és mtsai, 2005; Colom, 2006; Henderson és mtsai, 2010; Huh és mtsai, 2010). Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a HS sejteket beidegző septalis boutonok milyen transzmitterrel rendelkeznek, beágyazás utáni GABA-elleni immunarany festést végeztünk a HS sejteket beidegző BDA-jelölt terminálisokon. A különböző hippocampalis régiókban és rétegekben fénymikroszkopos szinten talált 74 kapcsolatot létesítő BDA-jelölt bouton közül az elektronmikroszkopos

vizsgálat alapján mind szinapszist létesített a jelölt HS sejtekkel (n=36 dendriten, n=32 szómán, n=6 axon iniciális szegmentumon), és öt kivételével mind GABA pozitív volt (93%; 14.B4, 16.A2 és C ábra). Ez utóbbiak lehetnek álnegatívak is, mivel a DAB csapadék maszkírozhatja a GABA epitópokat. Egy másik lehetőség, hogy a GABA-negatív boutonok a septo-hippocampalis pálya cholinerg vagy glutamáterg axonjaitól eredtek. Az öt negatív bouton közül három dendritet idegezett be (egy a CA1 str. oriensben, egy a CA3 str. oriensben és egy a CA3 str. lucidumban), kettő pedig szómával szinaptizált (egy a str. lucidumban és egy a hilusban, sűrűn-tüskés sejttel).

A HS sejteket beidegző BDA-jelölt boutonok túlnyomó többségének GABA pozitivitása miatt kizárhattuk azt a lehetőséget, hogy supramammilaris eredetűek lennének, hiszen utóbbiak a hippocampusban GABA-negatív- (Maglóczy és mtsai, 1994), glutamáterg/aszpartáterg axonok (Kiss és mtsai, 2000). Ezen kívül irodalmi adatok szerint a supramammilo-hippocampalis rostok elhelyezkedése csak az ammonszarv CA2 és CA3a oriens rétegére valamint a gyrus dentatus supragranuláris régiójára korlátozódik, ahol csak principális sejteket idegeznek be (Wyss és mtsai, 1979; Haglund és mtsai, 1984; Stanfield és Cowan, 1984; Vertes, 1992; Maglóczy és mtsai, 1994). A medialis raphe területéről érkező rostok szintén GABA-negatívak, és szerotonin- és/vagy glutamát transzmittert tartalmaznak (Varga és mtsai, 2009), így ezektől sem eredhet a mintánkban lévő BDA-jelölt (93%-ban GABA-pozitív) boutonok többsége. A HS sejtek axonjai viszont elvileg lehetnek a BDA-val jelölt rostok között, mert ezek a neuronok GABAergek (Tóth és mtsai, 1993), és fiatal patkányokban a septo-hippocampalis axonokhoz hasonló módon (Freund és Antal, 1988), szelektíven interneuronokat idegeznek be (Gulyás és mtsai, 2003). Előfordulásuk esélye a mintánkban viszont valószínűleg alacsony, mert a magas glutáraldehid tartalmú fixálóval perfundált állatokban (amelyekben a HS sejtek bemeneteit vizsgáltuk) a feltöltődött HS sejtek axonjait csak nagyon rövid szakaszon tudtuk követni a jelölés elhalványodása miatt, míg az ugyanazon állatban a feltehetőleg anterográd úton jelölődött rostok erősen jelöltek voltak. Ezenkívül a jelölt boutonok többségének nagy mérete is septalis eredetre utal (Eyre és mtsai, 2007).

5.2.2.3. *A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejteket septo-hippocampalis pálya különböző mértékben idegezi be*

A BDA-val erősen jelölt HS sejtek septo-hippocampalis boutonokkal létesített kapcsolatait vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a jelölt boutonok sűrűn körbevették a ritkán-tüskés HS sejteket, minden rétegben, ahol azok előfordultak (13. és 14. ábra). A jelölt boutonok száma egyetlen beidegzett sejten egy 60 μm vastag metszeten belül akár 90 db is lehetett, amit egy str. radiatumban elhelyezkedő ritkán-tüskés HS sejten találtunk. A boutonok nagy része főleg a szómát és a proximalis dendriteket idegezte be, de viszonylag gyakoriak voltak a distalis dendriteken is (11.B, 12.B, 13.A-C és 14. ábra). Több esetben a sejtek feltételezett axon iniciális szegmentumán is láttunk jelölt terminálisokat (részletesebben később, 14. B ábra).

Ezzel szemben, a sűrűn-tüskés HS sejteken, a hilus és a lucidum területén egyaránt csak elvétve lehetett megfigyelni jelölt boutonokat. A maximális boutonszám 60 μm vastag metszeten belül esetükben nyolc volt, amit egy str. lucidumban elhelyezkedő sűrűn-tüskés sejten figyeltünk meg.

5.2.3. A HS sejtekre érkező serkentő és gátló bemenetek konvergenciája

A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtek jellemzése és összehasonlítása céljából, a csoport korábbi közleményeiben alkalmazott módszerrel (Gulyás és mtsai, 1999; Megías és mtsai, 2001; Mátyás és mtsai, 2004), GABA-ellen festett sorozatmetszeteken alkalmazott elektronmikroszkópos rekonstrukcióval meghatároztuk a különböző rétegekben található HS sejtekre érkező GABA-pozitív-, és negatív bemenetek denzitását. Ezeket az értékeket és a sejtek általunk megmért dendritfahosszát és szómafelszínét felhasználva megbecsültük a két típus egy-egy jellegzetes képviselőjének, a ritkán-tüskés CA1 str. oriensben található HS sejt-, illetve a sűrűn-tüskés CA3 str. lucidumban található HS sejt összes bemeneteinek számát.

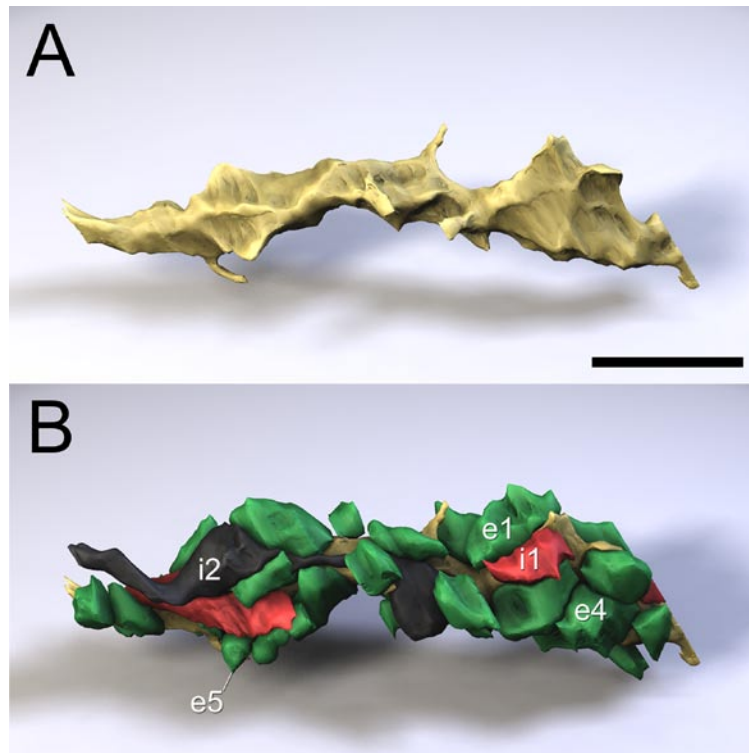
5.2.3.1. A ritkán-tüskés HS sejtek bemeneteinek elektronmikroszkópos vizsgálata

5.2.3.1.1. A ritkán-tüskés HS sejtek dendritjeit beidegző bemenetek

Elektronmikroszkóp segítségével rekonstruáltunk és megszámloltunk ismert hosszúságú dendritszakaszokon szinapszist létesítő GABA-pozitív és negatív boutonokat (5. összefoglaló-, és 7. részletes táblázat). Ezek alapján kiszámoltuk a ritkán-tüskés HS sejtek 100 μm dendrithosszára jutó input-denzitását (5. táblázat), ami összehasonlítva a korábban vizsgált, CA1 régióban található interneuron-típusok adataival (1. táblázat; Gulyás és mtsai, 1999; Mátyás és mtsai, 2004) nagyon magas volt a hippocampus teljes területén (248-437 bemenet/ 100 μm ; összehasonlításként: az átlagos input denzitás 92, 105, 125 és 326 a calretinin-, calbindin-, CCK-, és parvalbumin-pozitív interneuronok dendritjein a fenti két közleményben). Ahogy jól megfigyelhető a 15. ábrán, a dendritek teljes felszínét beborították a rájuk konvergáló terminálisok. A 3-dimenziós rekonstrukción azt is láthatjuk, hogy vékony HS dendritek nem szabályos kör keresztmetszetűek, hanem kisebb-nagyobb kiemelkedéseket, nyúlványokat hordoznak, amelyek nagy számú terminálissal való kapcsolatot tesznek lehetővé (~330/ 100 μm). A hosszabb kiemelkedések látszódnak tüskének a fénymikroszkópban. Ezekre a csupán egy glutamáterg bemenetet fogadó piramissejt tüskékkel ellentétben (Megias és mtsai, 2001) két GABA-negatív (ritkábban egy GABA-pozitív) bemenet is érkezhett. A közepes vastagságú dendritek keresztmetszete szabályosabb, kör alakú volt, de esetükben is magas input-denzitást mértünk (248-437/ 100 μm).

A CA3 str. radiatumban található HS sejteken valamivel alacsonyabb input-denzitást találtunk, mint a CA1 HS sejteken (5. táblázat). Esetükben ez az érték réteg-specifikus volt, ami azt jelentette, hogy a dendriteket sűrűbben borították a terminálisok a str. radiatumban (367 és 319 bemenet/ 100 μm a közepesen vastag és vékony dendriteken) mint a str. lucidumban (248 bemenet/ 100 μm közepesen vastag dendriteken).

A GABA-pozitív bemenetek százaléka az összes, dendritre érkező bemenet arányában hasonló volt a különböző rétegekben vizsgált ritkán-tüskés HS sejteknél (12,7-15,3%), és nem tapasztaltunk különbséget a vékony-, és közepesen vastag dendritek esetében (5. és 7. táblázat). A str. lucidumban található, gyengén GABA-



15. Ábra. A HS sejtek dendritjeit teljesen beborítják a rájuk érkező szinaptikus bemenetek.

Az ábrán egy ritkán-tüskés CA1 HS sejt vékony distalis dendritszakaszának 3-dimenziós rekonstrukciója látható. A: A dendrit morfológiája: számos rövid tüskeszerű kiemelkedés nyúlik ki a dendritágból, amelyet a rá érkező bemenetek szabálytalan alakúra formálnak. B: Ugyanaz a dendritszakasz a vele szinaptikus kapcsolatot létesítő GABA-negatív (zöld), GABA-pozitív (piros) és BDA-jelölt (GABA-pozitív, fekete) boutonokkal. A képen látható dendritszakaszt sorozatmetszetekből rekonstruáltam a Reconstruct program segítségével (Lásd a Módszerek fejezetet). A 16. A1 és A2 ábrán két elektronmikroszkópos felvétel látható erről a dendritről, amelyeken az itt feltüntetett boutonokat azonos számokkal jelöltem. Az ábra összevethető a Bevezetés fejezet 3. ábrájával, amely további három interneuron csoport bemeneti tulajdonságait mutatja be. Skála: 2 μ m.

Forrás: Takács és mtsai, 2008.

pozitív moharostokat a serkentő bemenetek (GABA-negatív) kategóriájába soroltuk. A „GABA-pozitív” kategóriába sorolt boutonok jóval több aranyzemcsét tartalmaztak. A

moharostok főleg a kisméretű filopodiális nyúlványaikkal vagy *en passant* varikozitásaikkal idegezték be az itt található HS dendriteket (Acsády és mtsai, 1998). Nagy mohaterminálisokat csak nagyon ritkán figyelhettünk meg a HS sejtek bemenetei között (Ramón y Cajal, 1911; Claiborne és mtsai, 1986). Ez utóbbiak az egy vagy két szinapszissal beidegzett HS sejt mellett mindig több, további szinapszis(oka)t létesítettek további nem jelölt profilokkal is, amelyeket a CA3 piramissejtek proximalis dendritjeinek komplex tüskerendszerével azonosítottunk (Blackstad és Kjaerheim, 1961; Chicurel és Harris, 1992).

Az elektronmikroszkópos analízis során korreláltan megkerestük a fénymikroszkópban azonosított BDA-jelölt, feltételezhetően septalis eredetű boutonokat. Ezek a vizsgált vékony és közepesen vastag dendritekkel egyaránt szinaptizáltak, és GABA-pozitívnak bizonyultak (lásd fenn, 7. táblázat). A BDA-jelölt boutonok aránya az összes GABAerg bemenet között akár 27,6% is lehetett (8 BDA-jelölt 29 GABAerg boutonból), amit egy közepesen vastag dendriten találtunk a CA1 str. oriensben.

5.2.3.1.2. A ritkán-tüskés HS sejtek szómáját beidegző bemenetek

A ritkán-tüskés HS sejtek az interneuronokra jellemző szóma-morfológiával rendelkeztek: sok mitochondrium, nagy mennyiségű durva felszínű endoplazmatikus retikulum, és invaginált mag volt jellemző rájuk (16.B1 és C ábra). A szómák felszínén hosszabb kiemelkedések, tüskék nem voltak két esetet kivéve: egy str. oriensben és egy str. radiatumban lévő sejt vizsgált szóma-részletén egy-egy csillót találtunk.

A $100 \mu\text{m}^2$ felszínére jutó input-denzitás jóval magasabb volt (64-90 bement) az eddig vizsgált interneuronok esetében kapott értékeknél [16. C ábra, 6. összefoglaló-, és 8. részletes táblázat, összehasonlításképpen: 20, 26, 31 és 59 a bemenetek átlagos száma a CCK-, calretinin-, calbindin-, és parvalbumin-pozitív sejtek szómáján (Gulyás és mtsai, 1999; Mátyás és mtsai, 2004)]. Ez alól csak az alveusban található HS sejtek képeztek kivételt, amelyek input-denzitása $34/100 \mu\text{m}^2$ volt (6. táblázat).

A GABAerg terminálisok aránya 13,5% és 33,3% között változott, de átlagosan magasabb volt, mint a dendritek esetében (6. összefoglaló-, és 8. részletes táblázat).

Két ritkán-tüskés HS sejt tüske-mentes szómáját megvizsgáltunk a hilusban is. Egyikükön az ammonszarvban található ritkán-tüskés HS sejtekhez hasonló input-

denzitást és GABAerg bemenet-arányt mértünk, míg a másikon alacsonyabb GABAerg bemenet-arányt (9,1%) találtunk (6. összefoglaló-, és 8. részletes táblázat). Ez megfelel korábbi fénymikroszkópos megfigyeléseinknek, amelyek során a hilaris sejtek heterogénnek bizonyultak, és nem tudtuk mindegyiküket a ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés csoportokba egyértelműen besorolni.

A számára érkező GABAerg bemeneteknek viszonylag nagy részét képezték a BDA-jelölt, feltehetőleg septalis eredetű boutonok. A mintánkban mért maximális érték 54,5% volt (6 BDA-jelölt 11 GABAerg boutonból), amit egy CA1 alveusban található szómán mértünk (6. összefoglaló, és 8. részletes táblázat).

5. Táblázat. A különböző HS sejt típusok dendritjeire érkező szinaptikus bemenetek denzitásának összefoglaló táblázata

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

Sejt típus	Szóma elhelyezkedése	Dendrit elhelyezkedése	Dendrit átmérő-osztálya	Dendrit átmérője (μm)	Dendrit típusa (tüske sűrűség)	Dendrit száma	A			Input denzitás (db/100 μm)	A gátló terminálok aránya (%)								
							Megvizsgált dendritek száma	Megvizsgált dendritek összeadott hosszúsága (μm)	Megvizsgált terminálok száma										
CA1 ori			vékony	0,36-0,58	ritkán-tüskés	4	4	93,1	304	326,5	13,2								
												közepes	0,75-1,16	ritkán-tüskés/sima	7	230	994	432,2	14,4
												közepes	0,64-0,67	ritkán-tüskés	3	98,8	424	337,1	14,4
CA3 ori			vékony	0,70-1,13	ritkán-tüskés	4	4	89,9	288	437,3	12,7								
												közepes	0,51-0,68	ritkán-tüskés/sima/ varikóz	4	118,4	378	319,3	14,6
												közepes	0,79-0,88	sima	3	77,7	285	366,6	14,4
CA3 rad, CA3 luc/rad határ			közepes	0,87-1,27	sima	4	4	147,6	366	248	15,3								
												közepes	0,54-0,61	sűrűn-tüskés	4	95,5	640	663,4	2,1
												közepes	0,89-1,22	sűrűn-tüskés	3	47,2	572	1213,1	2,3

7. Táblázat. A különböző HS sejt típusok dendritjeire érkező szinaptikus bemenetek denzitásának részletes táblázata

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

Szóma elhelyezkedése, sejt típusa	Dendrit elhelyezkedése	Dendrit átmérő-osztálya	Dendrit típusa (tüske sűrűség)	Átmérő (µm)	Dendrit hossza (µm)	Gátló bemenetek száma	Serkentő bemenetek száma*	Összes bemenetek száma	BDA jelölt bemenetek száma**	Input denzitás (db/100 µm)	A gátló bemenetek aránya (%)
CA1 ori, Ritkán-tüskés HS sejt	CA1 ori	vékony	ritkán	0,36	19,9	8	53	61	1	307,2	13,1
	CA1 ori	vékony	ritkán	0,58	12,7	9	53	62	1	488,6	14,5
	CA1 ori	vékony	ritkán	0,54	27,4	10	77	87	3	317,8	11,5
	CA1 ori	vékony	ritkán	0,48	33,2	13	81	94	1	283,2	13,8
	Σ				93,1	40	264	304	6	326,5	13,2
	CA1 ori	közepes	ritkán	1,16	24,2	15	74	89	1	367,8	16,9
	CA1 ori	közepes	ritkán	1,13	56,5	33	293	326	2 (+1)	577,1	10,1
	CA1 ori	közepes	ritkán	0,85	45,9	29	156	185	8	403,5	15,7
	CA1 ori	közepes	ritkán	0,91	29,5	19	115	134	0	454,4	14,2
	CA1 alv/ori határ	közepes	ritkán	0,78	24,3	15	76	91	0	374,2	16,5
CA1 alv/ori határ	közepes	sima	0,75	28,2	18	52	70	1	248,1	25,7	
CA1 alv	közepes	ritkán	0,88	21,4	***	***	99	99	1	462,6	***
Σ				230,0	129	766	994	13 (+1)	432,2	14,4	
CA3 ori, Ritkán-tüskés HS sejt	CA3 ori	vékony	ritkán	0,64	37,5	23	115	138	1	367,9	16,7
	CA3 ori***	vékony	ritkán	0,67	21,8	23	159	183 [92]	(1)	423,0	12,6
	CA3 ori	vékony	ritkán	0,64	39,5	15	88	103	0	260,6	14,6
	Σ				98,8	61	362	424	1 (+1)	337,1	14,4
	CA3 ori	közepes	ritkán	0,70	19,0	9	87	96	0	505,3	9,4
	CA3 ori	közepes	ritkán	0,97	17,6	11	75	86	1	490,0	12,8
	CA3 ori	közepes	ritkán	1,13	23,2	12	94	106	2	459,7	11,3
	CA3 ori	közepes	ritkán	0,81	30,2	18	87	105	1	348,3	17,1
	Σ				89,9	50	343	393	4	437,3	12,7

CA3 rad	vékony	ritkán	0,51	26,22	12	64	76	0	289,9	15,8
CA3 rad	vékony	varikóz	0,57	36,02	9	88	97	2	269,3	9,3
CA3 rad	vékony	ritkán	0,68	29,12	19	87	106	3	364,0	17,9
CA3 rad	vékony	sima	0,60	27,04	15	84	99	1	366,1	15,2
Σ				118,4	55	323	378	6	319,3	14,6
CA3 rad/ luc-rad	közepes	sima	0,88	31,5	13	97	110	2	349,5	11,8
CA3 rad	közepes	sima	0,79	30,2	15	90	105	0	347,3	14,3
CA3 rad	közepes	sima	0,86	16,0	13	57	70	0	436,4	18,6
Σ				77,7	41	244	285	2	366,6	14,4
CA3 luc	közepes	sima	0,87	43,0	12	66	78	1	181,4	15,4
CA3 luc	közepes	sima	0,93	27,6	10	62	72	0	250,8	13,8
CA3 luc	közepes	sima		30,2	16	100	116	0	384,6	13,8
CA3 luc	közepes	sima	1,27	46,8	18	82	100	0	213,9	18,0
Σ				147,6	56	310	366	1	248,0	15,3
CA3 luc	vékony	sűrűn	0,61	18,7	***	***	104	0	556,5	***
CA3 luc	vékony	sűrűn	0,61	26,6	6	245	251	0	942,9	2,4
CA3 luc	vékony	sűrűn	0,54	26,3	3	135	138	0	523,9	2,2
CA3c luc	vékony	sűrűn	0,55	24,8	2	145	147	0	592,3	1,4
Σ				96,5	11	525	640	0	663,4	2,1
CA3 luc	közepes	sűrűn	1,22	17,0	8	216	224	0	1316,9	3,6
CA3 luc	közepes	sűrűn	0,89	16,5	5	273	279	(1)	1687,8	1,8
CA3 luc	közepes	sűrűn	1,10	13,6	0	69	69	0	507,0	0,0
Σ				47,2	13	558	572	(1)	1213,1	2,3

* a gyengén GABA-pozitív moharost terminálisokat a serkentő bemenetek (GABA-negatív) kategóriájába soroltuk.

** A GABA-negatív BDA-jeölt bemeneteket zárójelbe tettük.

*** Ezt a két dendritszakaszt a GABA elleni immunfestés sikeretelensége miatt csak az input-denzitációs meghatározásra használtuk fel.

**** Ennek a vizsgált dendritnek nem tudtuk a teljes hosszát megmérni, ezért az input-denzitást csak a pontosan megmért szakasz alapján számoltuk ki (kapesos zárójelben az itt talált terminálisok száma), a gátló terminálisok aránya viszont az összes mintavételezett terminális alapján van a táblázatban megadva.

8. Táblázat. A különböző HS sejt típusok számjára érkező szinaptikus bemenetek denzitásának részletes táblázata

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

Sejt típusa	Szóma elhelyezkedése	Tüskék jelenléte a szómán	Vizsgált metszetek száma (60 nm)	Vizsgált szóma-felcszín (μm^2)*	Gátló bemenetek száma	Serkentő bemenetek száma**	Összes bemenetek száma	BDA jelölt bemenetek száma***	Input denzitás (db / 100 μm^2)	A gátló bemenetek aránya (%)	Tüskén lévő bemenetek aránya (%)	BDA-jelölt terminálisok aránya a gátló terminálisokon belül (%)
CA1 ori, Ritkán-tüskés HS sejt	CA1 ori	nincs	30	105,9	26	58	84	2	79,3	31,0		7,7
	CA1 ori ^{cs}	nincs	39	78,1	11	61	72	2	92,2	15,3		18,2
	CA1 ori-aly	nincs	60	123,3	13	53	66	0	53,5	19,7		0
	CA1 ori	nincs	30	95,7	17	73	90	4	94,0	18,9		23,5
	Σ			403,0	67	245	312	8	77,4	21,5		11,9
CA3 ori, Ritkán-tüskés HS sejt	CA1 alveus	nincs	42	85,1	9	18	27	3	31,7	33,3		33,3
	CA1 alveus	nincs	53	137,3	5	32	37	0	27,0	13,5		0
	CA1 alveus	nincs	40	115,3	11	40	51	6	44,2	21,6		54,5
	Σ			337,6	25	90	115	9	34,1	21,7		36,0
	CA3 ori, Ritkán-tüskés HS sejt	CA3b ori	nincs	30	110,8	28	60	88	0	79,4	31,8	
CA3b ori	nincs	30	124,8	18	81	99	1	79,3	18,2		5,6	
CA3c ori	nincs	30	66,8	26	61	87	2	130,2	29,9		7,7	
Σ			302,4	72	202	274	3	90,6	26,3		4,2	
CA3 rad, Ritkán-tüskés HS sejt	CA3b luc-rad	nincs	30	96,0	23	57	80	0	83,4	28,8		0
	CA3b rad	nincs	30	98,1	26	59	85	8	86,6	30,6		30,8
	CA3b rad ^{cs}	nincs	40	99,6	13	65	78	0	78,3	16,7		0
	Σ			293,7	62	181	243	8	82,73	25,5		12,9
	CA3 luc, Sűrűn-tüskés HS sejt	CA3 luc	van	44	82,0	0	94	94	0	114,6	0,0	39,4
CA3b luc	van	30	90,0	2	207	209	(1)	232,1	1	55,0	1	GABA-neg
CA3b luc	van	30	77,4	0	125	125	0	161,5	0,0	9,6	0	0
CA3c luc	van	30	100,1	5	133	138	0	137,9	3,6	15,2	0	0
Σ			349,5	7	559	566	(1)	161,9	1,2		32,7	0

hilus, Sűrűn- tűskés HS sejt	hilus van hilus van hilus van Σ	30 30 31	54,5 88,8 103,8 247,1	3 2 3 8	58 60 72 190	61 62 75 198	0 1 (1) 1(+1)	112,0 69,8 72,3 80,1	4,9 3,2 4,0 4,0	8,2 0,0 8,0 5,6	0 50 1 25
---------------------------------------	--	----------------	---------------------------------------	-------------------------	------------------------------	------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------

* A tűskék felszínét nem mértük meg.

** A gyengén GABA-pozitív moharost terminálisokat a serkentő bemenetek kategóriájába soroltuk

*** A GABA-negatív BDA-jelölt bemeneteket zárójelbe tettük.

cs Ezek a sejtek csillóval rendelkeztek a megvizsgált részükön.

GABA-neg: GABA-negatív.

5.2.3.1.3. A ritkán-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumát beidegző bemenetek

A fénymikroszkópos analízis során ritkán-tüskés HS sejtek feltételezett axon iniciális szegmentumán is találtunk BDA-jelölt boutonokat (14.B. ábra). Erre minden rétegben találtunk példát, ahol ezek a sejtek előfordultak. A jelölt septalis axonok követhetőek voltak, és így megfigyelhettük, hogy nem szelektívek a HS sejtek axon iniciális szegmentumára, hanem általában több további kontaktust létesítettek a szómával és a proximalis dendritekkel is (14.B2 ábra). A HS sejtek axonjai a szómából és az egyik proximalis dendrit szómához közeli részéből is eredhettek, majd eredésük után hamar elhalványultak. Két, CA1 str. oriensben jelölt, rátapadó BDA-jelölt boutonokkal rendelkező feltételezett axon iniciális szegmentumot korrelált fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettünk alá, amit GABA elleni festéssel kombináltunk. Mindkét axon iniciális szegmentummal három jelölt bouton létesített kapcsolatot, amelyek mind szinapszist formáltak, és GABA-pozitívnak bizonyultak (14.B1-4 ábra). Egy további, jelölt boutonokkal nem szinaptizáló axon iniciális szegmentumot is megvizsgáltunk (16.B ábra). Az axon iniciális szegmentumokra jellemző membrán alatti denz struktúrát („membrane undercoating”; Palay és mtsai, 1968; Chan-Palay, 1972) nem láthattuk a teljes citoplazmát kitöltő DAB csapadék miatt, de több bizonyíték is a rendelkezésünkre állt a vizsgált nyúlványok axon iniciális szegmentumként való azonosításához: i) a fénymikroszkópos kép (14.B1 ábra): ezek a nyúlványok vékonyabbak voltak mint a dendritek, kúp alakú kezdeti részük volt, majd elvékonyodtak miközben a DAB-jel elhalványodott bennük, míg a sejtek dendritjei egyenletes vastagságúak, és végig erősebben jelöltek voltak. ii) nagy mennyiségű mikrotubulus köteget tartalmaztak, amely a dendritekre nem jellemző, a axon iniciális szegmentumokban viszont megfigyelhető (16.B2 ábra; Somogyi, 1977) iii) a nyúlványokat követtük az elektronmikroszkópos sorozatmetszeteken, amíg myelinhévely borította be őket, ami dendritek esetében nem fordulhat elő.

A három vizsgált axon iniciális szegmentummal szinaptizáló terminálisokat. a dendriteket beidegző bemenetekhez hasonlóan rekonstruáltuk. Az axondomb és az axon iniciális szegmentum a myelinhévely kezdetéig összesen 4-7 nagyméretű GABAerg (a BDA-jelölt terminálisokkal együtt)-, valamint 16-20 kisebb GABA-negatív bemenetet kapott (14.B és 16.B ábra; 9. táblázat). Az axon iniciális szegmentummal szinaptizáló boutonok többsége az első 5-10 μm -en volt megfigyelhető, utána distalisan, a

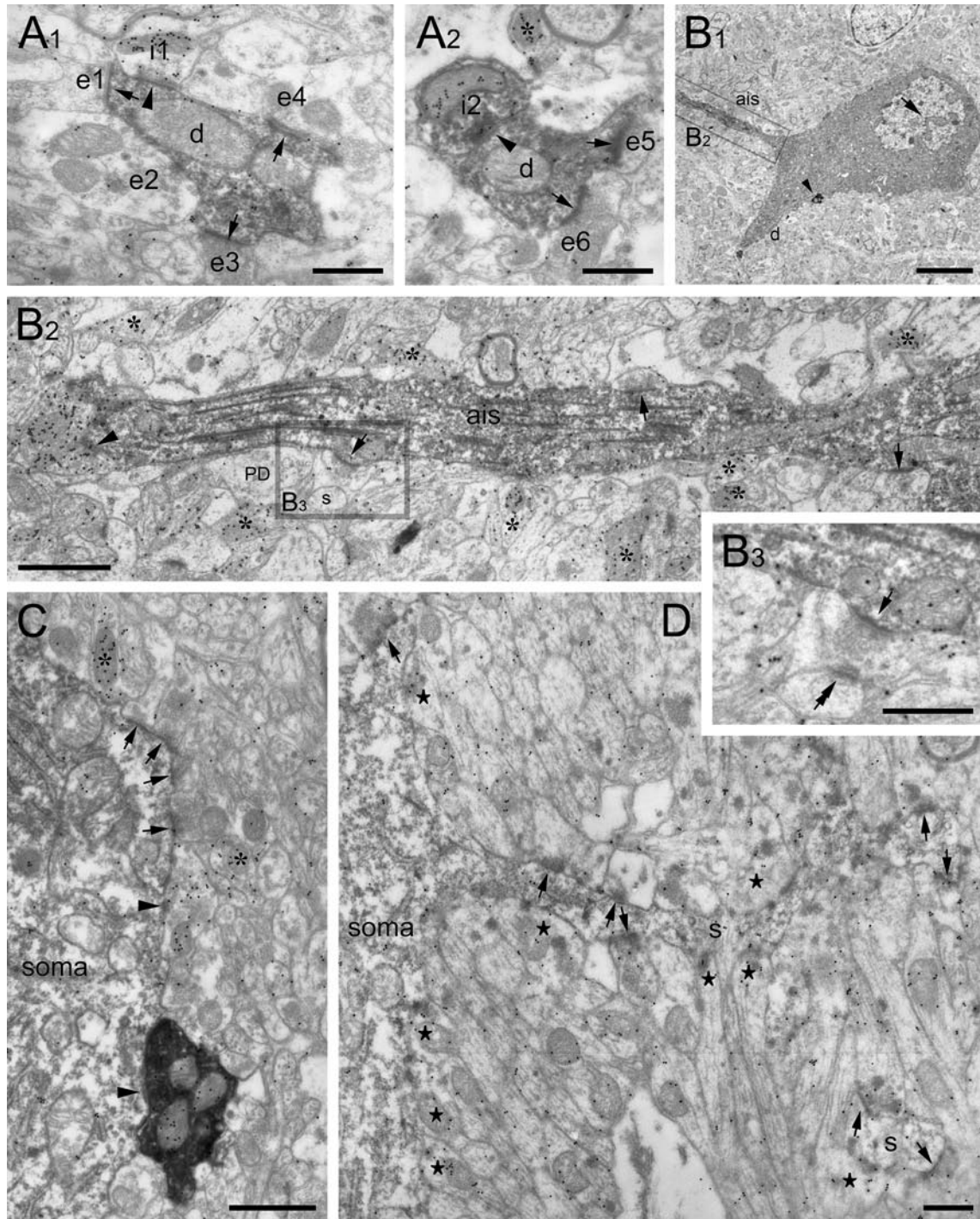
myelinhüvely irányába haladva számuk fokozatosan csökkent. Az axon iniciális szegmentumot beidegző GABA-negatív terminálisok egyike szinaptikus kapcsolatot létesített egy jelöletlen tüskével is, amit egy piramissejt morfológiájú dendritághoz tudtunk követni (16.B2 és B3 ábra).

5.2.3.2. A sűrűn-tüskés HS sejtek bemeneteinek elektronmikroszkópos vizsgálata

5.2.3.2.1. A sűrűn-tüskés HS sejtek dendritjeit és szómáját beidegző bemenetek

Az elektronmikroszkópos vizsgálat szerint a str. lucidumban és hilusban található sűrűn-tüskés HS sejtek szómáját és dendritjeit is gyengén GABA-pozitív moharost kötegek vették körül (16.D ábra; Sandler és Smith, 1991; Sloviter és mtsai, 1996; Bergersen és mtsai, 2003). A GABA-pozitív „gátló” kategóriába sorolt terminálisok felett jóval több arany szemcse volt látható, így a két csoport elkülöníthető volt. Mind a szómákon, mind a dendriteken hosszú, (néhol elágazó) tüskéket találtunk, amelyeket teljes hosszukon moharost terminálisok borítottak (16.D ábra). Ezek szinte kizárólag kisméretű varicositasok voltak, amelyek a filopodiális nyúlványok vagy *en passant* boutonok közé tartozhattak (Acsády és mtsai, 1998). A HS sejtekkel csak elvétve létesítettek szinapszist nagy moharost terminálisok (Ramón y Cajal, 1911; Claiborne és mtsai, 1986). Ezek az egy-két szinapszis mellett, amit a HS sejtre adtak mindig több további szinapszissal kapcsolódtak jelöletlen profilokhoz is, amelyek ultrastrukturális képük alapján a CA3 piramissejtek komplex tüskéi voltak (Blackstad és Kjaerheim, 1961; Chicurel és Harris, 1992).

Korábbi közlemények alapján tudjuk, hogy a str. lucidumban lévő HS sejtek a calretinin tartalmú sűrűn-tüskés sejtekkel azonosak, vagy azok egy csoportját képezik (Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007). Méréseink segítségével kvantitatív eredményekkel erősítettük meg a korábbi észrevételeket (Gulyás és mtsai, 1992), amelyek szerint ezek a sejtek a serkentő (moharost) bemenetek számához viszonyítva nagyon kevés gátló bemenetet kapnak (1,2% a str. lucidumban-, 4% a hilusban található szómákon, valamint 2,1% a str. lucidumban lévő közepes vastagságú-, és 2,3% a vékony dendriteken).



16. Ábra. A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtekre konvergáló GABA-pozitív és GABA-negatív szinaptikus bemenetek denzitása és aránya

A1 és A2: Egy BDA-jelölt ritkán-tüskés CA1 HS sejt vékony dendritjére az itt bemutatott két elektronmikroszkópos metszeten hat GABA-negatív (e1-6), egy BDA-t nem tartalmazó GABA-pozitív (i1), és egy BDA-jelölt, feltehetőleg septo-hippocampalis GABA-pozitív (i2) bemenet érkezik. A szinapszisokat nyilak és nyílhegyek jelölik. A

GABA pozitívítást az *i1* és *i2* terminálisok felett látható arany szemcsék igazolják. Az *e2* jelű bouton a szomszédos metszeten létesít szinapszist a dendrittel. A dendritszakasz 3-dimenziós rekonstrukciója a 15. ábrán látható, ahol az ezen az ábrán látható boutonokat azonos számokkal jelöltük. B1-3: A ritkán-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumát GABA-pozitív és GABA-negatív terminálisok is innerválják. A HS sejt szómájából eredő axon iniciális szegmentummal (B1, *ais*) egy GABA-pozitív (B2, nyílhegy) és három GABA-negatív bouton (nyilak) szinaptizál a B2 ábrán bemutatott metszeten. B3: A B2-n bekeretezett GABA-negatív input kinagyított képe a következő sorozatmetszetről. Látható, hogy a bouton kapcsolatot létesít egy további profíllal (kettős nyíl), amely sorozatmetszeteken keresztül követve a „PD” jelzésű dendritből (B2) eredő piramis sejt tüskének bizonyult (*s*). A B1 ábrán megfigyelhető a jelölt HS sejt interneuronokra jellemző invaginált nucleusa (nyíl) valamint egy, a szómáját beidegző BDA-jelölt feltehetően septalis eredetű bouton (nyílhegy). C: Egy ritkán-tüskés HS sejt szómájára a CA3 str. oriensben több serkentő (nyilak)-, egy BDA-t nem tartalmazó GABA-pozitív (nyílhegy, felül), és egy BDA-jelölt GABA-pozitív terminális (nyílhegy alul) érkezik a bemutatott metszeten. A csillagok az A-C képeken GABA-pozitív profílokat jelölnek. D: A sűrűn-tüskés HS sejtekre a tüskéknek köszönhetően hatalmasra megnőtt membránfelület miatt jóval több bemenet érkezik, mint a ritkán-tüskés sejtekre. Ezek többsége kisméretű mohaterminálisoktól származik, amelyek gyengén GABA-pozitívak (lásd az elszórt arany szemcséket az ábrán látható moharost-kötegeken és terminálisokon). A gátlósejtek terminálisait a jóval erősebb GABA-pozitivitás alapján el lehetett különíteni az előbbiektől. Az ábrán látható moharostok egy része szinaptikus kapcsolatot létesít (nyilak) a str. lucidumban elhelyezkedő, BDA-jelölt sűrűn-tüskés HS sejt szómájával, és abból kiágazó tüskékkel (*s*). A csillaggal jelölt moharost-terminálisok a szomszédos metszeten formálnak szinapszist a sejtrel. A sűrűn-tüskés sejteken az erősen GABAerg profílok aránya az összes bemenet számához képest jóval alacsonyabb volt, mint a ritkán-tüskés HS sejteken megfigyelt arány. Skálák: A1, A2, B3, C, D: 0,5 μm ; B1: 5 μm ; B2: 1 μm .

Forrás: Takács és mtsai, 2008.

A gazdagon beidegzett tüskéknek köszönhetően a 100 μm -re jutó input-denzitás jóval magasabb volt, mint a ritkán-tüskés HS sejteken, vagy bármely más eddig

kvantitatív módon vizsgált hippocampalis sejtípuson [663,2 a vékony-, és 1213,1 a közepesen vastag dendriteken; 5. táblázat, (Gulyás és mtsai, 1999; Megias és mtsai, 2001; Mátyás és mtsai, 2004)]. Amint a 7. táblázatból látható, a variancia a vizsgált dendritszakaszok között rendkívül nagy volt, ami a mintavételezett dendritszakaszokra jutó különböző mennyiségű tüskének tulajdonítható.

A $100 \mu\text{m}^2$ szómafelszínre jutó bemenetek száma szintén rendkívül magas volt a str. lucidumban található sűrűn-tüskés HS sejtek esetében (161,9), míg a hilusban találhatóak a ritkán-tüskés HS sejtekhez hasonló mennyiségű bemenetet kaptak (80,1), (6. összefoglaló- és 8. részletes táblázat). Ennek oka a hilaris HS szómák kisebb számú tüskéje lehetett.

5.2.3.3. A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtek különböző mennyiségű és arányú serkentő és gátló bemenetet kapnak

A sejtekre érkező összes bemenet számának megbecsléséhez 3-dimenzióban rekonstruáltuk azok teljes dendritfáját (n=3 ritkán-tüskés HS sejt a CA1 str. oriensből, és n=1 sűrűn-tüskés sejt a CA3 str. lucidumból; 10. és 17.A ábra), és félvékony sorozatmetszetek segítségével megmértük szómáik felszínét. A gyenge retrográd jelölés miatt a sejtek nagy része alkalmatlan volt a rekonstrukcióra, mivel dendritjeikből a természetes végük előtt elhalványodott a DABNi jel. A rekonstruált sejtek teljes dendritfája feltöltődött, amit az igazolt, hogy a dendritek a metszet belsejében a DABNi jel halványodása nélkül végződtek.

A CA1 HS sejtek (n=3) dendritfája 9-11 db $80 \mu\text{m}$ vastag metszetet foglalt el, és teljes hossza 5780 ± 219 (SD) μm volt (10.A és 17.A ábra). Ez alapján a teljes dendritfára érkező bemenetek számát $21\,206 \pm 1491$ -re (SD) becsültük, amelyből 13,7% gátló.

Egy átlagos ritkán-tüskés CA1 HS sejt szómája a méréseink alapján $989,7 \pm 281,3$ (SD) μm^2 felszínű (n=15 sejt), és számításaink szerint 766 ± 230 (SD) bemenetet kap, amelyekből 21,5% gátló.

A CA1 HS sejtek axon iniciális szegmentumát és axondombját vizsgálatunk szerint 18 ± 2 (SD) serkentő, és 5 ± 2 (SD) gátló terminális idegezi be.

9. Táblázat. A ritkán-tüskés-, és sűrűn-tüskés HS sejtekre érkező bemenetek becsült száma

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

	Ritkán-tüskés HS sejtek a CA1 str. oriensben		Sűrűn-tüskés HS sejtek a CA3 str. lucidumban	
	Bemenetek száma	Gátló bemenetek aránya (%)	Bemenetek száma	Gátló bemenetek aránya (%)
Dendritikus bemenetek	21 206 ± 1491	13,7	36 490	2,3
Szomatikus bemenetek	766 ± 230	21,5	1241 ± 275	1,2
Az axon iniciális szegmentum és az axondomb bemenetei	23 ± 3	21,4	*	*
Összes bemenet	21 995	14	37 731	2,3

* A sűrűn-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumára és axondombjára érkező bemeneteket nem vizsgáltuk.

A táblázat bizonyos soraiban az értékek átlag (mean) ± SD formában vannak megadva.

Mindezek alapján, egy tipikus CA1 str. oriensben található ritkán-tüskés HS sejtre érkező összes bemenet száma ~22 000 lehet, amiből 14% gátló (9. táblázat).

Mivel a sűrűn-tüskés HS sejtek sokkal ritkábban fordultak elő, a mintánkban csak nagyon kevés erősen jelölt képviselőjük volt. Ezek közül csak egynek tudtuk a teljes dendritfáját rekonstruálni (10.B ábra). Ezt nyolc 80 µm vastag metszetből rajzoltuk ki, és a 3-dimenziós rekonstrukció alapján teljes hossza 4965 µm volt. Az erre a sejtre érkező bemenetek becsült száma 36 490 db, aminek csupán 2,3%-a GABAerg.

A sűrűn-tüskés sejtek szómája $766,4 \pm 170$ (SD) µm² felszínű volt (n=11 sejt), és számításaink szerint 1241 ± 275 (SD) bemenetet kapott, amiből csak 1,2% gátló.

Egy CA3 str. lucidumban található sűrűn-tüskés HS sejtre érkező összes bemenetek becsült száma tehát 37 700, amiből csak 2,3% gátló (9. táblázat).

5.2.4. A HS sejtek lokális axonjai és posztszinaptikus célelemei

A három rekonstruált, erősen feltöltődött, CA1 str. oriensben található HS sejt axonjait is követni tudtuk, így részlegesen rekonstruáltuk axonfájukat is 10-26 db 80 µm

vastag metszetből. (17. ábra). Ezután axonkollaterálisait átágyasztuk, és korrelált fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá a posztszinaptikus célelemeik meghatározása céljából.

5.2.4.1. A HS sejtek lokális axonfájának fénymikroszkópos jellemzői

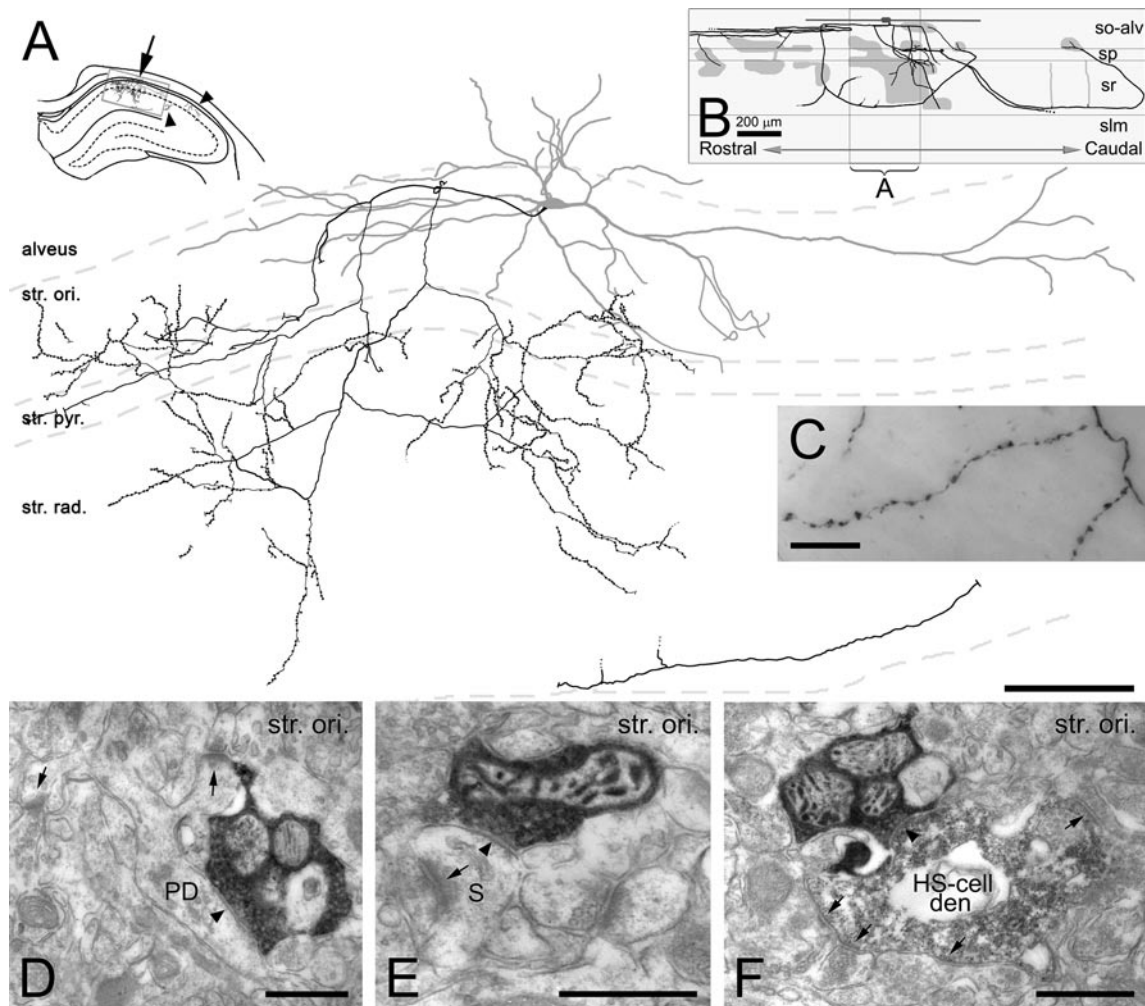
A rekonstruált sejtek axonjai a szómából eredtek (17.A ábra), és ezután rostralis- vagy caudalis irányba indultak el, majd röviddel az axon iniciális szakaszt követően vastag, boutonokat nem hordozó fő ágakat adtak a str. oriensbe, vagy a str. pyramidale és radiatum felé, ahol ezek vékonyabb bouton-mentes ágakra váltak szét. Több vastag főaxon elérte a str. radiatum és lacunosum-moleculare határát, ahol horizontális irányba fordult, és a réteghatárral párhuzamosan haladt, miközben rá merőleges, bouton-mentes vagy boutonokat hordozó ágakat adott a str. radiatumba és oriensbe. A bouton-mentes ágakból varikóz kollaterálisok ágaztak ki. Terminálisokkal rendelkező kollaterálisokat a főleg a radiatum-, és oriens rétegekben, illetve sokkal ritkábban a str. pyramidale-ban találtunk. A jelölt sejtek axonjai sosem léptek be a str. lacunosum-moleculare-ba. A varikóz axonok egymástól egyenletes távolságokra elhelyezkedő, kis- vagy közepes méretű *en passant* boutonokat hordoztak (17.C ábra). Ritkán nyéllel rendelkező („drumstick-like”) boutonokat is találtunk.

Amint jól megfigyelhető a 17.A és B ábrán, az axonok horizontális és rostro-caudalis kiterjedése a hippocampusban egyaránt nagyon nagy volt; a szómától 900 μm távolságra is találtunk boutonokat hordozó kollaterálisokat.

Az egyik rekonstruált sejt esetében, amelyik a CA1 területének CA2 régióval határos részén helyezkedett el (10.A ábra), egy fő kollaterális a CA2 régión keresztül belépett a CA3 területére is, ahol a CA1 régióban megfigyeltekhez hasonló morfológiájú, boutonokat hordozó ágakra vált szét.

A rekonstrukció során, vastagabb átmérőjű, feltehetőleg távolra vetítő axonokat is találtunk. Az egyik sejt fő axonja caudalis irányban haladt a CA1 str. oriens és alveus határán, majd két, hasonló vastag fő ágra vált szét. Ezekből egyike folytatta útját az caudalis irányban, míg a másik rostralis irányba fordul, majd eltűnt az alveusban a DABNi jel elhanyagolása miatt. Ez a két ág megfelelhet a Jinno és mtsai által leírt double-projection sejtek retrohippocampalis területre vetítő (caudalis) és MS-DB-be

projicionáló (rostralis) ágainak (Jinno és mtsai, 2007). Egy másik sejt egy nagyon vastag, rostralis irányba tartó fő axonággal rendelkezett, ami a feltétezett MS-DB-be vezető kollaterális lehetett, míg egy vékonyabb ág indult a caudalis irányba a str. oriens/alveus határon. A harmadik, a 17. ábrán megfigyelhető sejt nem rendelkezett caudalis irányba követhető fő axonággal, viszont három vastag kollaterálisa irányult az MS-DB felé (17. B ábra).



17. Ábra. A CA1 oriens rétegében található ritkán-tüskés HS sejtek dendritfája, axon-arborizációja és célelem-szelektivitása

A: BDA-jelölt HS rekonstrukciója a CA1 régióból. A szürke színnel feltüntetett dendriték horizontális irányban a str. oriensben és alveusban húzódnak. A sejt fekete színnel ábrázolt lokális axonjai főleg a str. radiatumban és str. oriensben valamint kevésbé sűrűen a str. pyramidale-ban futnak és nem lépnek be a lacunosum-moleculare rétegbe. Az ábrán a teljes dendritfa és az axonjának négy 80 μm vastag metszetből

kirajzolt részlete látható. Az inzerten nyíllal jelöltük a szóma helyzetét a dorsalis hippocampusban. A szürke színnel bekeretezett terület látható nagyobb nagyításban az ábra fő részén. Néhány, a szómától messze elhelyezkedő kollaterális helyzete csak az inzerten figyelhető meg (nyílhegyek a bekeretezett területen kívül). B: A teljes rekonstruált dendritfa (sötétszürke)-, és az axonfa 26 db 80 μm vastag metszetből kirajzolt részének (fekete) kiterjedése a rostro-caudalis síkban. Kapcsos zárójellel jelöltük az axonfának az „A” ábrán látható részét. A világos szürke színnel besatírozott területen a sejt szinaptikus boutonokat hordozó kollaterálisokkal rendelkezett. A sejtnél három fő axonága futott rostralisán az MS-DB irányába. Az ábrán megfigyelhető, hogy a CA1 HS sejteknek a szómájuktól nagy távolságra (~900 μm) is vannak hippocampalis célelemeik. A lokális axonfa rekonstrukciója nem teljes, mert sok fő axonágot nem tudunk követni a DABNi jel elhalványodása miatt. C: A HS sejt axon-kollaterálisainak fénymikroszkópos képe. A kisméretű boutonok szabályos távolságra helyezkednek el egymástól a kollaterálisok mentén. D: A jelölt HS sejtek fő célelemei a piramissejtek str. oriensben és radiatumban lévő vékony distalis dendritágai voltak. Egy BDA-jelölt rekonstruált HS-sejt boutonja szimmetrikus szinapszist formál (nyílhegy) egy vékony piramissejt dendrittel (PD). A dendritből két tüske ágazik ki, amelyekre aszimmetrikus bemenetek érkeznek (nyilak). E: A lokális célelemek között piramissejtek tüskéi is voltak. Az egyik rekonstruált HS sejt terminálisa szimmetrikus szinapszissal (nyílhegy) beidegez egy piramissejt tüskét (s), amely egy aszimmetrikus bemenetet is kap egy nem jelölt boutonról (nyíl). F: A HS sejtek egymást is beidegzik. Az egyik rekonstruált HS sejt terminálisa beidegezi egy másik BDA-jelölt HS sejt dendritjét (HS-cell den, a szinapszisra nyílhegy mutat). A beidegzett HS sejt a csoportra jellemzően rengeteg további bemenetet kap a dendritágra (nyilak). Ez a szinapszis az egyike annak a kilenc azonosított szinapszisnak, amit a jelölt preszinaptikus HS sejt axonja létesített a posztzinaptikus HS sejt két dendritágán. Rövidítések: so-alv: stratum oriens és alveus, sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum, slm: stratum lacunosum-moleculare. Skálák: A: 100 μm ; B: 200 μm ; C: 10 μm ; D-F: 0.5 μm .

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

5.2.4.2. *A HS sejtek terminálisainak ultrastrukturális jellemzői és posztzinaptikus célelemei*

A három rekonstruált CA1 HS sejt axonkollaterálisait elektronmikroszkópos sorozatmetszeteken keresztül követtünk a str. oriens és radiatum területén, és a posztzinaptikus célelemeiket a piramis sejtek és az interneuronok korábban publikált ultrastrukturális jellemzői alapján azonosítottuk (Lásd a Módszerek fejezetben, Gulyás és mtsai, 1999; Megías és mtsai, 2001). GABA elleni festést a metszeteken nem végeztünk, mert a perfúzióhoz használt fixáló alacsony glutáraldehid-tartalma ezt nem tette lehetővé (magas glutáraldehid koncentrációjú fixáló használata esetén viszont nem jelölődtek a HS sejtek axonjai). A random kiválasztott axonkollaterálisok mellett (n=180 szinapszis) egy olyan axonágot is megvizsgáltunk, amelynek nyolc boutonja egy másik HS sejt két elágazó dendritjére tapadt rá.

A három sejt terminálisainak ultrastrukturális képe hasonló volt: kicsi- közepes méretűek voltak ($0,25 \pm 0,12 \mu\text{m}^2$, átlag terület a bouton legnagyobb keresztmetszetén mérve, n=135), nagyszámú kisméretű vezikulát tartalmaztak, általában tartalmaztak legalább egy mitochondriumot (85%), és minden esetben szimmetrikus szinapszisokat képeztek (17. D-E ábra).

A vizsgált boutonok a sorozatmetszetek alapján néha kettő- (20%) vagy akár három (2,2%) szinapszist is létesítettek különböző szomszédos profilokon. A szinapszisok 6,1%-t az axon kollaterálisok vékony, intervarikóz részén találtuk. Ezek alapján a HS sejtek sokkal több szinapszissal rendelkeznek, mint amennyi a fénymikroszkópban látható varikozitások száma.

A posztzinaptikus célelemek (n=180, 10. táblázat) főleg piramis sejtek dendritágai (80,6%, 17.D ábra)-, ill. kisebb százalékban tüskéi (11,7%, 17.E ábra) voltak. Interneuronok dendritjeit idegezte be a vizsgált boutonok 3,3%-a (17.F ábra).

A beidegzett piramis sejt dendritek szinte kizárólag vékony, distalis dendritágak voltak (n=141, 78,3%-a az összes szinapszisnak). Mindössze négy vastag proximalis dendrit célelemet találtunk (2,2%-a az összes szinapszisnak). Egy esetben egy bouton egy-egy szinapszissal beidegezett egy dendritágot és egy abból kiinduló tüskét is. A szimmetrikus szinapszissal beidegzett tüskék minden esetben kaptak egy aszimmetrikus bemenetet is egy jelöletlen terminálistól. Nagy többségük jellegzetes piramis sejt tüske-

morfológiával bírt: feji és nyaki résszel rendelkezett, és ritkábban tüske-apparátust is tartalmazott (17.E ábra; Spacek és Harris, 1997).

A fénymikroszkópos vizsgálat során az egyik HS sejtnek két olyan egymás mellett futó axonágát figyeltük meg, amely kúszórostszerűen ráfonódott egy másik jelölt HS sejt két elágazó dendritjére, és nyolc lehetséges kapcsolatot létesített azzal. Ezeket a boutonokat megvizsgáltuk az elektronmikroszkópban. Mind a nyolc jelölt bouton szinapszist formált a BDA-tartalmú dendritekkel, valamint egy további szinaptikus kapcsolatot is találtunk a jelölt profilok között, amelyet az axon intervarikóz része létesített. Az egyik jelölt bouton HS sejtrel létesített szinapszisa a 17.F ábrán látható. A nyolcból négy vizsgált terminális további, nem jelölt posztzinaptikus elemekkel is szinapszist formált, amelyek mind piramis dendriteknek bizonyultak. A két kollaterális további boutonjait szintén megvizsgáltuk. Ezek mind piramis dendriteket vagy tüskéket innerváltak.

10. Táblázat. A rekonstruált CA1 HS sejtek lokális posztzinaptikus célelemei

Forrás: Takács és mtsai, 2008, módosítva.

Sejt	Vizsgált szinapsziszok száma	A vizsgált terület(ek)	Posztzinaptikus célelemek			
			Piramissejt dendritág	Piramissejt tüske	Interneuron dendritág	Nem azonosított
1.	78	CA1 ori, rad	82,1% (64)	12,8% (10)	2,6% (2)	2,6% (2)
2.	69	CA1 ori, rad	87,0% (60)	5,8% (4)	1,5% (1)	5,8% (4)
3.	33	CA1 rad	68,4% (21)	21,2% (7)	9,1% (3)	6,1% (2)
Σ	180	CA1 ori, rad	80,6% (145)	11,7% (21)	3,3% (6)	4,4% (8)

A százalékok utáni zárójelben a célelemek száma látható.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A CA1 régióba érkező serkentő pályák különböző célelem-szelektivitást mutatnak

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a CA1 régió fő glutamáterg bemenetei, az entorhinalis rostok, a Schaffer kollaterálisok és a CA1 piramis sejtek lokális axonágai jelentősen különböznek a posztszinaptikus piramis sejt-, és interneuron célelemeik arányában.

A hippocampusban az interneuronok a teljes neuronpopulációnak csak kis hányadát teszik ki [11% (Woodson és mtsai, 1989); 7% (Aika és mtsai, 1994)]. Ebből arra következtethetünk, hogy „random” innerváció esetén, vagyis ha az axonok a különböző típusú sejteket egyszerűen az előfordulási arányuk szerint idegezik be, a posztszinaptikus célelemek között jóval több piramis sejt lesz mint interneuron. A kutatócsoportunk korábbi közleményeiből ismert, hogy a CA1 interneuronokra általában kevesebb glutamáterg bemenet érkezik mint a CA1 piramis sejtekre [1700 – 19 000 bemenet/interneuron vs. 30 000 bemenet/piramis sejt; 1. táblázat, (Gulyás és mtsai, 1999; Megias és mtsai, 2001; Mátyás és mtsai, 2004);]. A különböző típusú interneuronok dendritfájának elhelyezkedése, hossza és szinaptikus borítottsága igen eltérő lehet (1. táblázat, és lásd a CA1 HS sejtek adatait ebben a dolgozatban). Sok hippocampalis interneuron csoport (pl. az O-LM- vagy a neurogliaform sejtek) szinaptikus borítottságát a típus gyakorisága ellenére még nem vizsgálták és a különböző interneuronok relatív gyakoriságát sem ismerjük. Emiatt a dolgozatban nem kíséreltem meg a különböző rétegekben elhelyezkedő posztszinaptikus interneuronok és piramis sejtek számát valamint a konvergencia mértékét megbecsülni, és csak a vizsgált pályák összehasonlítását tárgyalom.

Vizsgálataink szerint a CA1-be érkező fő „feed-forward” pályák (a str. lacunosum moleculare területét beidegző entorhinalis rostok és az oriens és radiatum rétegekben arborizáló Schaffer kollaterálisok) posztszinaptikus célelemeiket azok előfordulási valószínűségéhez hasonló arányban innerválják, ami azt jelenti, hogy túlnyomórészt piramis sejtekkel (>90%) és kisebb arányban (<10%) interneuronokkal

létesítenek szinaptikus kapcsolatot. Ezzel szemben a CA1 „feed-back” bemenetei, a CA1 piramissejtek lokális rekurrens kollaterálisai nagyobb arányban idegeznek be interneuronokat (>50%), mint amekkora azoknak a CA1 területén megfigyelhető relatív gyakoriságából következne. Emellett azt is kimutattuk, hogy az entorhinalis bemenet célelem-szelektivitása réteg-specifikus: az alvearis rostok a str. oriens/alveus, a str. pyramidale és a str. radiatum területén magasabb arányban idegeznek be interneuronokat mint a lacunosum-moleculare réteget beidegző entorhinalis rostok. Mindezek azt jelentik, hogy az agyi pályákat a posztszinaptikus célelemek direkt vizsgálata nélkül, pusztán a beidegzett területen található neuronok előfordulási valószínűsége alapján nem jellemezhetjük.

6.1.1. A CA1 piramissejtek heterogén csoportot képeznek

A mintavételezett CA1 piramissejtek kapcsán fontos megjegyezni, hogy bár az *in vitro* mintánk illetve az összevont *in vitro*-, és *in vivo* mintánk a célelem-eloszlás alapján statisztikailag homogén populációt alkotott, önmagában az *in vivo* feltöltött sejtek csoportja heterogén volt (3. táblázat). A négy különböző állatban mintavételezett piramissejtek (n= 2; 4; 1 és 1 sejt/állat) célelemei között 73,5; 31; 94,7 és 47,4%-ban találtunk interneuronokat. Ennek több oka is lehet: i) Az alkalmazott mintavétel a sejtek lokális axonhálózatán belül nem tekinthető teljesen randomnak, mivel a mintavételezett szinapszisok egymáshoz viszonylag közel voltak. Előfordulhat, hogy a str. oriens/alveus határon található interneuronok eloszlása nem teljesen egyenletes, így bizonyos állatok esetében a mintavételezett területen belül több interneuron helyezkedhetett el, mint más állatok esetében, és a mintába ennek megfelelően több interneuron célelemmel rendelkező szinapszis jutott. ii) A célelem-eloszlás eltérő értéke a CA1 piramissejtek különböző alcsoportjaira jellemző tulajdonság lehet.

Egy adott terület principális sejtjeit az interneuronokkal összehasonlítva általában homogén csoportnak tartják, de egyre inkább nyilvánvalóvá válik, hogy a CA1 piramissejtek populációja több szempontból is heterogén és ezáltal alcsoportokra osztható. Azok a sejtek, amelyek szómája a str. radiatumhoz közelebb található, kisebb méretűek a mélyebben elhelyezkedő sejteknél, az „inside-out” kérgi fejlődési sorrend következtében az egyedfejlődés során később jönnek létre és eltérő molekuláris

markereket is expresszállhatnak [pl. calbindint; (Baimbridge és Miller, 1982)] mint mélyebben található társaik (Slomianka és mtsai, 2011). A két csoport extrahippocampalis kimenetei is eltérőek lehetnek (Slomianka és mtsai, 2011). A CA1 piramis sejtek fiziológiai tulajdonságaikban is jelentős különbségeket mutathatnak. Bizonyos CA1 piramis sejtek komplex burstökben tüzelnek *in vitro*, míg másokra ez nem jellemző (Jensen és mtsai, 1996). Ez a tulajdonság a sejteknek a hippocampus proximo-distalis tengelyén való elhelyezkedésével korrelál; fokozatosan egyre több ilyen sejtet találni a CA2 felől a subiculum irányába haladva (Jarsky és mtsai, 2008). *In vivo*, a theta-, és gamma oszcilláció alatt mért tüzelési paraméterek alapján is két különböző CA1 piramis sejt populációt lehet elkülöníteni (Senior és mtsai, 2008; Mizuseki és mtsai, 2011). A sejt proximo-distalis tengelyen való elhelyezkedése korrelál az *in vivo* térbeli tüzelésük jellemzőivel is, aminek hátterében valószínűleg az állhat, hogy a térbeli információt szállító medialis entorhinalis kérgi rostok elsősorban a proximalis CA1 régióba érkeznek (Henriksen és mtsai, 2010). Mivel az *in vitro*-, vagy *in vivo* egyedileg megjelölt CA1 piramis sejteket random választottuk ki, és a hosszantartó mintavétel miatt számuk alacsony volt (n=10), nem tudjuk, mennyire jól reprezentálják a teljes populációt. Érdeemes lenne megvizsgálni, hogy vajon a fenn felsorolt különböző piramis sejtek lokális célelem-szelektivitása alcsoportra jellemző módon különbözik, vagy mintavételi probléma-, esetleg a teljes populációra jellemző heterogenitás áll az általunk megfigyelt magas variancia mögött.

A dolgozatomban további részében a megfigyelt heterogenitás ellenére összevonom a vizsgált piramis sejtek mintáit, de itt felhívom a figyelmet arra, hogy az esetleges különböző piramis sejt-alcsoportok képviselői az átlagostól eltérő szelektivitást is mutathatnak.

6.1.2. A CA1 piramis sejtek lokális kollaterálisai erős interneuron-szelektivitást mutatnak

A CA1 piramis sejtek a többi megvizsgált pályával összehasonlítva meglepően magas arányban idegeztek be interneuronokat (56,7%). A CA1 piramis sejtek lokális kollaterálisai szigorúan a str. oriens és alveus határán egy keskeny vonalban futnak és nem lépnek át más rétegekbe (Ramon y Cajal, 1911; Lorente de No, 1934; Knowles és

Schwartzkroin, 1981b; Tamamaki és mtsai, 1987; Tamamaki és Nojyo, 1990). Bár a hippocampusban a glutaminsav dekarboxiláz-pozitív (GABAerg) sejtek szómái viszonylag egyenletesen szétszóródva helyezkednek el (Babb és mtsai, 1988; Aika és mtsai, 1994; Shi és mtsai, 2004; Stanley és Shetty, 2004), a lehetséges posztszinaptikus interneuron célelemek száma mégis magasabb lehet CA1 piramis sejtek által beidegzett területen, a str.oriens/alveus határán mint a hippocampus más rétegeiben. Ez annak köszönhető, hogy ezen a területen sok olyan interneuron van, amely horizontális dendritfával rendelkezik és összes dendritje ezen a területen arborizál, sűrű hálózatot képezve a str. oriens/alveus határán (Woodson és mtsai, 1989; Fukuda és Kosaka, 2000). A potenciális interneuron célelemek magasabb számát az elektronmikroszkópos megfigyeléseink is igazolták: jóval gyakrabban láttunk interneuron dendriteket (és ritkábban piramis sejt dendriteket) a str. oriens/alveus határán mint a többi vizsgált rétegben. Mivel a str. oriensben belül nincs olyan struktúra, ami elhatárolná a CA1 piramis sejtek kollaterálisait az alveussal határos részre, az a jelenség, hogy preferenciálisan mégis itt arborizálnak arra utal, hogy feltehetőleg az itt található interneuronok vonzzák ide őket. Ezzel szemben a CA3 piramis sejtek axonjai behálózják a str. oriens nagy részét és elkerülik a piramis sejt dendriteket nem-, vagy csak ritkán tartalmazó alveust (Sik és mtsai, 1993; Li és mtsai, 1994).

A legtöbb ismert CA1 str. oriens/alveus határán elhelyezkedő horizontális interneuron, pl. az O-LM sejtek csoportja mGluR1 α -receptor pozitív (Martin és mtsai, 1992; Baude és mtsai, 1993; Hampson és mtsai, 1994), és tüskés dendritekkel rendelkezik. A CA1 piramis sejtek szelektív ischaemiás léziója majd az mGluR1 α -receptor-pozitív sejtekkel szinaptizáló degenerálódó terminálisok arányának meghatározása útján Blasco-Ibanez és Freund kimutatta (1995), hogy ezek a sejtek glutamáterg bemeneteik nagy többségét (>70%) a CA1 piramis sejtektől kapják. A jelölt CA1 piramis sejtek posztszinaptikus célelemei között mi is sok tüskés interneuron dendritet és interneuron tüskét találtunk, megerősítve ennek a korábbi tanulmánynak a következtetéseit.

Eredményeink megmagyarázzák, hogy hippocampalis szelet-preparátumban megkísérelt kettős sejt-elvezetés során miért sokkal nehezebb kapcsolt CA1 piramis sejt párokat találni (<1% a kapcsolttság valószínűsége; Knowles és Schwartzkroin, 1981a; Deuchars és Thomson, 1996) mint CA1 piramis sejt által beidegzett interneuronokat

(>32% valószínűség; Knowles és Schwartzkroin, 1981a; Lacaille és mtsai, 1987; Ali és mtsai, 1998). A fenti valószínűségi értékek tükrében az általunk talált piramis sejtcélelemek aránya még túl magasnak is tűnhet (29,3% *in vitro*, 39,2% *in vivo*). Ez azonban valójában nem ellentmondás, mert a fiziológiai kapcsoltsági valószínűség értelmezésekor figyelembe kell venni az interneuronok és piramis sejtek egymáshoz viszonyított arányát is (~1:9; Woodson és mtsai, 1989). Ez azt jelenti, hogy a CA1 lokális kollaterálisok szinapszisainak 60-70%-a, amely eredményeink szerint interneuronokat idegez be a sejtek 1/10-t képező interneuronokra konvergál, míg a maradék 30-40% szinapszis sokkal több piramis sejt között (az összes sejt ~9/10-e) oszlik el. Ez alapján egy-egy interneuront valószínűleg több szinapszissal is beidegeznek ezek az axonok, a konvergencia mértéke valószínűleg nagyobb mint a piramis sejtek esetében. Biró és mtsai (2005) kísérleteiben a piramis sejtek átlagosan 2,8 (1-6) szinapszissal idegezték be a posztzinaptikus interneuronokat. Egy piramis sejt-piramis sejt pár esetében Deuchars és Thomson (1996) kettő elektronmikroszkóposan azonosított szinapszist is talált, de nem tudjuk, hogy ez a szinapszisszám mennyire lehet általánosan jellemző. A CA1 piramis sejtek által létesített szinapszisok helye eltérő a különböző posztzinaptikus sejteken: míg az interneuronokat akár a szómájukon vagy a proximalis dendritörzseiken is beidegezhetik, a piramis sejteken szinte kizárólag a distalis dendritágakon elhelyezkedő tüskéket innerválják. Elképzelhető, hogy a piramis sejtek basalis dendritjeinek distalis részén található távoli tüske-szinapszisok egy része esetében a szinaptikus átvitel valószínűleg nem detektálható szómából történő elvezetéssel (Lacaille és mtsai, 1987), így ezeket a szinapszisokat a fiziológiai kapcsoltsági vizsgálatokban feltételezhetőleg nehezebb kimutatni.

Ahogy az előbbieken kifejtettem, Blasco-Ibanez és Freund közleményével (1995) összhangban eredményeink azt sugallják, hogy a CA1 piramis sejtek fő célelemei a str. oriens/alveus horizontális interneuronjai lehetnek. Ez elektrofiziológiai méréseik is megerősítik: a kettős sejt-elvezetés során gyakrabban találni CA1 piramis sejt által beidegzett str. oriens/alveus horizontális interneuront (a szinaptikus kapcsoltsági valószínűsége 33%; Ali és Thomson, 1998); (Biró és mtsai, 2005) mint radiális dendritfával rendelkező bistratified sejtet (14% valószínűség; Ali és mtsai, 1998) vagy kosársejtet (4,5% valószínűség; Ali és mtsai, 1998).

A CA1 piramis sejtek tüzelése meglepően hosszú késéssel követi a fő bemeneteinek, a CA3 piramis sejtek illetve az entorhinalis kéreg III rétegében elhelyezkedő piramis sejtek tüzelését theta oszcilláció alatt (Mizuseki és mtsai, 2009). A CA1 piramis sejtek tüzelési csúcsa negyed theta ciklussal követi a CA3 piramis sejtek tüzelési csúcsát és fél theta ciklussal késik az entorhinalis kéreg III rétegi piramis sejteihez képest. Ez azt jelentheti, hogy a theta oszcilláció alatt a CA1 régió neuronhálózata meglehetősen függetlenül alakítja ki tüzelési mintázatát mintsem monoszinaptikusan követné a különböző agyterületeken át terjedő aktivitást (Mizuseki és mtsai, 2009). Ehhez a viszonylag független működéshez feltétlenül szükség van az erős feed-back gátlásra, amiért a CA1 piramis sejtek által gazdagon beidegzett interneuronok felelősek.

Azok a CA1 interneuronok, amelyek erős monoszinaptikus bemenetet kapnak a lokális piramis sejtektől átmenetileg megszabadulhatnak a theta-ciklus bizonyos szakaszához való fáziskapcsoltságuktól, és preszinaptikus piramis sejteikkel együtt egyre korábban tüzehetnek a soron következő theta ciklusok alatt (Maurer és mtsai, 2006; Ego-Stengel és Wilson, 2007). Megfigyelésünk, amelyek szerint a lokális interneuronok bemeneteinek nagy része a CA1 piramis sejtektől ered, támogatja a fenn idézett közleményeket. Eredményeink megerősítik azokat a korábbi tanulmányokat is, amelyek szerint a CA1 régió hálózati felépítése nem tartalmaz kiterjedt serkentő rekurrens kapcsolatokat a CA1 piramis sejtek között.

6.1.3. A Schaffer kollaterálisok túlnyomórészt piramis sejteket és egy nagyságrenddel kevesebb interneuront idegeznek be

A CA1 piramis sejtek célelem-szelektivitásával összehasonlítva viszonylag kis mennyiségben (7,1%) találtunk interneuron dendriteket az *in vitro* jelölt Schaffer kollaterálisok célelemei között. Korábbi közlemények szerint a CA3 piramis sejtek boutonjainak 2,1%-a parvalbumin-pozitív célemeleket idegez be (Sik és mtsai, 1993), míg 2,7%-a substance P-pozitív neuronokat innervál (Wittner és mtsai, 2006). Wittner és mtsai (2006) azt is kimutatták, hogy a CA3 piramis sejtek rostjai elkerülik a tüskés interneuronokat míg a tüske-mentes interneuronokat az előfordulási valószínűségüknek megfelelően idegeznek be. A Schaffer kollaterálisok általunk megvizsgált interneuron

célelemei szintén tüske-mentesek voltak a megvizsgált elektronmikroszkópos sorozatmetszeteken belül. Ezek a megfigyelések arra utalhatnak, hogy míg a rekurrens CA1 piramisajt axonok elsősorban valószínűleg tüskés horizontális sejteket –többek között O-LM és HS sejteket- innerválnak (lásd fenn), addig a Schaffer kollaterálisok fő célelemei más interneuron típusok, pl. kosársejtek, axo-axonikus sejtek és bistratified sejtek lehetnek.

Az általánosan elfogadott nézet szerint a CA1 régióban az éleshullám során detektálható ripple aktivitás a Schaffer kollaterálisok erős serkentő hatására jön létre (Csicsvari és mtsai, 2000). A ripple alatt a CA1 piramisajt tüzelése a nyugalmi aktivitás hatszorosára emelkedik, míg a GABAerg interneuronok átlagosan csak háromszorosára növelik a tüzelési frekvenciájukat (Csicsvari és mtsai, 1999). Ez tehát azt jelenti, hogy nem csak az aktivitás növekedik meg nagy mértékben, hanem az aktivált piramisajt aránya is kétszeresére nő az aktivált interneuronokhoz képest. Az, hogy a Schaffer kollaterálisok jóval nagyobb arányban idegeznek be piramisajt mint interneuronokat minden bizonnyal szerepet játszik a CA1 piramisajt arányaiban nagyobb mértékű aktivációjában az éleshullám aktivitás alatt. Itt azt is meg kell jegyezni, hogy az aktivált interneuronok csak bizonyos interneurontípusok közé tartozhatnak, ugyanis bizonyított, hogy ripple aktivitás alatt a különböző típusok eltérő viselkedést mutatnak: aktiválódnak, gátlódnak vagy nem változtatják tüzelési mintázatukat (Klausberger és Somogyi, 2008).

6.1.4. Az entorhinalis rostok réteg-specifikus célelem-szelektivitást mutatnak

A lacunosum-moleculare rétegben jelölődött entorhinalis boutonok az interneuron és piramisajt célelmeiket ezek előfordulási valószínűségéhez hasonló arányban innerválták. A célelemek 8,5% interneuron volt, ami jól egyezik az interneuronok arányával a teljes hippocampalis neuronállományon belül [11%, (Woodson és mtsai, 1989), 7%, (Aika és mtsai, 1994)]. Hasonló eredmények következethetők Desmond és mtsai tanulmányából (1994), amelyek szerint az entorhinalis boutonok ebben a rétegben 93,5%-ban tüskéket, míg 6,5%-ban dendritágakat idegeznek be. A distalis piramisajt dendritek tüskéi és dendritágai mellett az entorhinalis rostok posztszinaptikus célelemei közé tartoznak a parvalbumin-pozitív

interneuronok (Kiss és mtsai, 1996), és valószínűleg minden egyéb interneuron típus, amely dendriteket küld a lacunosum-moleculare rétegbe. Egyik fő célsejtcsoport lehet a neurogliaform sejtek populációja, mivel ezek dendritfájának nagy része ebben a rétegben helyezkedik el (Price és mtsai, 2005).

A lacunosum-moleculare rétegben mértekhez viszonyítva sokkal magasabb arányban idegeztek be interneuronokat az alvearis pálya jelölt rostjai a rétegen kívül (a str. oriens/alveus, str. pyramidale és str. radiatum területén összevont összes célelem arányában 21,3%). *In vivo* és *in vitro* stimulációs kísérletek során az entorhinalis bemenet általában igen erős feed-forward gátlást vált ki (Colbert és Levy, 1992; Empson és Heinemann, 1995; Paré és Llinás, 1995; Soltesz, 1995; Ang és mtsai, 2005), amely kialakulásáért az alvearis pályának köszönhetően a lacunosum-moleculare rétegen kívül elhelyezkedő interneuronok is felelősek lehetnek. A str. oriens és alveus határán futó alvearis rostok akár az O-LM sejteket is beidegezhetik, amelyek a distalis piramisest dendritekre érkező entorhinalis bemenetek feed-back kontrolljában játszanak fontos szerepet (Maccaferri és McBain, 1995; Yanovsky és mtsai, 1997; Maccaferri és mtsai, 2000). Ha ilyen kapcsolat valóban létezik, akkor ezek a sejtek az entorhinalis pálya által kiváltott feed-forward gátlásban is részt vesznek, bonyolítva a CA1 régió neuronhálózatáról alkotott képet. A fentiek miatt is érdemes lenne meghatározni, hogy vajon milyen típusba tartoznak az alvearis rostok által beidegzett interneuronok.

Az alvearis pálya rostjai a lacunosum-moleculare rétegbe érve csatlakoznak az entorhinalis kéregből a subiculumon keresztül érkező rostokhoz, amelyekkel együtt sűrűn behálózzák a réteget. Emiatt a lacunosum-moleculare rétegben mintavételezett jelölt boutonok mindkét irányból érkező rostköteghez tartozhattak (lásd Módszerek fejezet). A teljes entorhinalis innervációnak valószínűleg csak kisebb hányada érkezik az alveus felől, de sajnos pontos adat nem áll rendelkezésünkre (Deller és mtsai, 1996). A jelölt axonok nagy sűrűsége miatt a str. lacunosum-moleculare-ba nem tudunk egyedi alvearis rostokat átkövetni, ezért nem tudtuk meghatározni, hogy vajon ezek a rostok megtartják-e magas interneuron-célelem arányukat ebben a rétegben is.

Az entorhinalis kéregben és a CA1 régióban detektálható gamma oszcilláció szinkronicitást mutat egymással (Colgin és mtsai, 2009). Eredményeink szerint a CA1 piramisestek mellett a CA1 interneuronokat is beidegzik az entorhinalis rostok. A neurogliaform sejtek, amelyek dendritfája specifikusan az entorhinalis rostok végződési

területén, a lacunosum-moleculare rétegben található valószínűleg nem kapnak szinaptikus bemenetet a CA1 piramis sejtektől. Ennek ellenére a neurogliaform sejtek tüzelése erősen korrelál a lokálisan extracellulárisan mérhető gamma oszcillációval (Fuentelba és mtsai, 2010). Ez azt jelentheti, hogy a neurogliaform sejtek aktivitását az entorhinalis kéreg a perforáns pályán keresztül szinkronizálja a gamma frekvenciában.

6.1.5. A CA3 és a CA1 régió külső és belső kapcsolatainak eltérő szerveződése

A CA3 régióba érkező két fő glutamaterg bemenet az entorhinalis kéreg II. rétegéből illetve a gyrus dentatusból ered. A CA1 régióval összehasonlítva a fő különbség a szemcsesejtek moharostjaiból érkező bemenet jelenléte, amely a CA3 str. lucidumban idegezi be speciális terminálisaival az itt elhelyezkedő neuronokat. Ezek kis divergenciával idegeznek be kevés számú piramis sejtet, oly módon, hogy az egyedi szemcsesejt-piramis sejt kapcsolatok a sok szinapszissal rendelkező nagyméretű boutonnak köszönhetően nagyon hatékonyak (Henze és mtsai, 2002). Ezzel szemben a moharostok nagy divergenciát mutatnak az interneuronok irányába, amelyekkel csak egy-egy szinapszist létesítenek (Acsády és mtsai, 1998). Ez teszi lehetővé, hogy a szemcsesejtek és a CA3 piramis sejtek közötti információátadás erős interneuronális kontroll alatt, nagyon nagy precizitással történjen meg (Henze és mtsai, 2002; Acsády és Káli, 2007). A CA3 piramis sejtek rekurrens rostjai fénymikroszkópos megfigyelések alapján nagyszámú piramis sejtet és egy nagyságrenddel kevesebb interneuront idegeznek be (Sik és mtsai, 1993; Wittner és mtsai, 2006), hasonlóan az általunk a CA1 területén megvizsgált kollaterálisaikhoz.

A CA1 régió nem rendelkezik a moharostokhoz hasonló külső glutamaterg bemenettel, az ide érkező megvizsgált glutamaterg pályák (entorhinalis rostok, Schaffer kollaterálisok) nagy divergenciát mutatnak a piramis sejtek irányába és kisebb számú interneuront idegeznek be. A moharostok hiánya mellett a CA1 régió belső asszociációs kapcsolatai is különböznek a CA3 régióétól. A CA1 területén i) a rekurrens piramis sejt axonágak száma és teljes hossza alacsony, ii) ezek csak egy vékony rétegben a str. oriens/alveus határán helyezkednek el és iii) ahogy ebben a tanulmányban kimutattuk, túlnyomórészt interneuronokkal létesítenek kapcsolatot szemben a CA3 piramis sejtek

nagy mennyiségű, az egész oriens és radiatum réteget behálózó, főleg piramis sejteket innerváló rekurrens kollaterálisaival szemben (Wittner és mtsai, 2007). A CA1 piramis sejtek rekurrens kollaterálisai a divergencia alapján inkább a szemcses sejtek moharost terminálisaira emlékeztetnek, de esetükben nincsenek különböző célelemekre specializálódott, morfológiailag eltérő terminális-típusok, és a moharostoktól eltérően glutamaterg célelemeikkel valószínűleg nem képeznek erősebb kapcsolatot mint az interneuronokkal.

A CA1 piramis sejtek rekurrens rostjainak kisebb száma és az interneuron célelemeik nagyobb aránya azt is eredményezheti, hogy a nagyobb kiterjedésű rekurrens axonfával rendelkező, de az összes célelem arányában kevesebb interneuront beidegző CA3 piramis sejtekkel körülbelül megegyező számú lokális interneuront innerválnak. Ezzel szemben a CA3 piramis sejtek rekurrensi esetében jóval nagyobb a beidegzett lokális piramis sejt-célelemek száma, amelyek létrehozzák a csak a CA3 régióra jellemző, memórianyomok kialakításában fontos szerepet játszó auto-asszociációs hálózatot (Acsády és Káli, 2007). A két terület külső és belső kapcsolatainak különböző anatómiai szerveződése alapját képezi az információ eltérő feldolgozásának.

Összegezve a leírtakat arra következtethetünk, hogy eredményeink szerint a különböző glutamaterg pályák célelem-szelektivitását elsősorban a bemenetek forrása határozza meg. Ez a finoman kiépített hálózati rendszer kialakulásával komplex neurális működések létrejöttét tette lehetővé. Fontos lenne megvizsgálni, vajon az ebben a dolgozatban tanulmányozott piramis sejtek hasonló vagy különböző célelem-szelektivitást mutatnak-e az általuk beidegzett további kérgi területeken, a CA3 régióban, az entorhinalis kéregben és a subiculumban.

6.2. A HS sejtek kapcsolatrendszere

A HS sejtek morfológiai vizsgálata alapján az alábbiakban felsorolt következtetéseket tudtuk levonni: i) Az MS-DB-ből eredő GABAerg axonok beidegzik a HS sejteket, az összes rétegben, ahol előfordulnak. ii) A HS sejteknek különböző morfológiai típusai jellemzőek a hippocampalis formatio különböző területein és rétegeiben: a ritkán-tüskés HS sejtek a CA1-3 str. oriens, a CA3 str. radiatum területén helyezkednek el, míg a CA3 str. lucidumban sűrűn-tüskés HS sejtek figyelhetők meg. A

hilusban mindkét típus megtalálható, köztes bélyegeket mutató HS sejtekkel együtt. iii) A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtek szinaptikus bemeneteinek denzitása eltérő, és csoportra jellemző sajátosság. A ritkán-tüskés sejtekre nagy mennyiségű szinaptikus bemenet érkezik (~22 000 a CA1 oriens rétegében lévő sejtek esetében), amelyből ~14% GABAerg. A sűrűn-tüskés sejtek még ennél is több, főleg kisméretű moharost boutonoktól eredő bemenetet kapnak (~37 000 a str. lucidumban lévő HS sejtek esetében), de GABAerg nem-principális sejtek csak ritkán innerválják őket (2,3%). iv) A HS sejtekre érkező GABAerg bemenetek nagy hányada eredhet az MS-DB-ből (akár 54,5% a szómán illetve 27,6% a dendriteken a ritkán-tüskés HS sejtek esetében). v) A ritkán-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumát GABA-negatív és GABA-pozitív bemenetek is beidegezik, és az utóbbiak között septo-hippocampalis eredetű boutonok is lehetnek. vi) A CA1 területén elhelyezkedő HS sejtek jelen tanulmányban megvizsgált axonkollaterálisai főleg vékony piramissejt dendriteket, ritkábban pedig piramissejt tüskéket és interneuronokat idegeztek be. vii) A HS sejtek szinaptikus kapcsolatot létesíthetnek egymással, ahogy azt egy esetben megfigyeltük két jelölt HS sejt között.

6.2.1. A hippocampus és az MS-DB reciprok kapcsolata: a HS sejtek GABAerg bemeneteinek jelentős része az MS-DB-ből eredhet

Kombinált retrográd és anterográd pályakövető módszert alkalmazva ebben a tanulmányban mi bizonyítottuk először közvetlenül, hogy a HS sejtek a septo-hippocampalis GABAerg axonok célelemei között vannak. Ez nem teljesen váratlan eredmény, ugyanis a következő megfigyelések alapján lehetett indirekt módon következtetni rá: i) Gyakorlatilag minden HS sejt tartalmaz somatostatint (Zappone és Sloviter, 2001; Jinno és Kosaka, 2002; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007), és ismert, hogy a str. oriens somatostatín-immunoreaktív sejtjei preferált célelemei a GABAerg septo-hippocampalis rostoknak (Gulyás és mtsai, 1990). ii) A septo-hippocampalis pálya beidegzi a calbindin-pozitív sejteket is (Freund és Antal, 1988; Miettinen és Freund, 1992a), amelyek között szintén vannak MS-DB-be vetítő sejtek (Tóth és Freund, 1992; Jinno és Kosaka, 2002; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai). iii) Közvetett bizonyítéknak számítanak azok a megfigyelések is, amelyek szerint a HS

sejtek nagy többsége NGF-t expresszál (Acsády és mtsai, 2000a), és a NGF-tartalmú sejteket a septo-hippocampalis axonok preferenciálisan beidegzik (Rocamora és mtsai, 1996). iv) A sűrűn-tüskés calretinin-immunoreaktív sejtek, amelyek megfeleltethetőek a sűrűn-tüskés HS sejteknek (Gulyás és mtsai, 2003) szintén kapnak GABAerg bemeneteket az MS-DB-ből (Acsády és mtsai, 1993).

Az MS-DB-ből eredő GABAerg beidegzés különlegesen erős a ritkán-tüskés HS sejtek esetében, amelyeken a fénymikroszkópban minden rétegben rengeteg jelölt septo-hippocampalis bouton lehetett megfigyelni (akár 90 bouton/sejt egy db 60 µm vastag metszeten belül). A sűrűn-tüskés sejteket a jelölt septo-hippocampalis bouton sokkal ritkábban idegezték be (maximum 8 bouton/sejt egy db 60 µm vastag metszeten belül). Ez a különbség megmagyarázható a ritkán-tüskés HS sejtre érkező GABAerg bemenetek magasabb arányával (14%-a az összes bemenetnek) a sűrűn-tüskés HS sejtekéhez képest (2,3%- a az összes bemenetnek). Így az MS-DB-ből eredő GABAerg bemenetek aránya az adott sejttípus összes GABAerg bemenetéhez képest közel egyforma lehet a két csoport esetében. A mintánkban a septalis GABAerg bemenetek aránya az összes GABAerg bemeneten belül igen változó volt, és maximális értéke 54,5% volt a szómákon és 27,6% a dendriteken belül. Mindkét maximális értéket egy-egy ritkán-tüskés HS sejten találtuk. Mivel pályajelölő anyaggal csak a bemenetek egy részét tudjuk megjelölni, az is előfordulhat, hogy még ezek az értékek is alábecsülik a septalis GABAerg bemenetek valódi arányát, ami arra utal, hogy a HS sejtek fő GABAerg bemenete az MS-DB-ből származik. Ez azt is jelentheti, hogy a HS sejtek működését a lokális interneuronok kisebb mértékben befolyásolhatják mint az MS-DB GABAerg sejtei.

Tóth és mtsai közleménye (1993) szerint az MS-DB és a hippocampus között a másik irányban is sejtpopuláció-szintű reciprok kapcsolat van: a HS sejtek GABAerg rostjai az MS-DB-n belül beidegzik a hippocampusba vetítő GABAerg sejteket. A kapcsolat divergenciáját még egyik irányban sem ismerjük. Ha ez megfelelően nagy mértékű, akkor akár egyedi HS sejt - septo-hippocampalis sejt párok is lehetnek közvetlen reciprok kapcsolatban. Mindez fontos szerepet játszhat a theta ritmus kialakításában, a két terület oszcillációinak összehangolásában (Wang, 2002; Manseau és mtsai, 2008). Wang neuronhálózat-modelljében (2002) például sem a MSDB- sem a HS sejtek populációja önmagában nem tudott theta ritmusban szinkronizálódni,

ellenben ha a két csoportot reciprok módon összekötötte mindkét populáció szinkronizációt mutatott.

6.2.2. A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtekre érkező szinaptikus bemenetek denzitása és forrása

6.2.2.1. Módszertani megfontolások

A HS sejtek szinaptikus bemeneteinek tanulmányozása során meg kellett küzdenünk azzal az akadállyal, amit a HS sejtek teljes dendritfájának megjelenítése okozott. A pályajelölő anyag a legtöbb sejtet csak részlegesen töltötte fel, így míg a szóma és a proximális dendritek általában erősen jelöltek voltak, a distális dendritek követése nehézségekbe ütközött. Emiatt csak három ritkán-tüskés CA1 HS sejt és csak egyetlen sűrűn-tüskés HS sejt teljes dendritfáját tudtuk rekonstruálni. A három CA1-ben rekonstruált sejt dendritjeinek teljes hossza csak kevesebb mint 4%-ban különbözött, és a további, csak részlegesen rekonstruált CA1 HS sejtek is nagyon hasonló morfológiával rendelkeztek. Ezért úgy gondoljuk, hogy a CA1 HS sejtek esetében számításaink megközelítik a valós értékeket, és további mitavételezett sejtek valószínűleg nem befolyásolnák jelentős módon az eredményeinket. Mivel a CA3 str. lucidumából csak egyetlen sejt dendritfáját tudtuk teljesen rekonstruálni, az esetükben kapott értékek csak első, durvább becslésnek tekinthetők.

6.2.2.2. A ritkán-tüskés HS sejtek a lokális piramissejtek aktivitását mintavételezik

Eredményeink szerint a ritkán-tüskés HS sejtek elhelyezkedése megfelel azoknak a rétegeknek, ahol az adott területen található principális sejtek lokális axonjai végződnek. A CA1 régióban szómájuk és összes dendritjük a str. oriens és alveus területén található, leggyakrabban a két réteg határán, éppen ott, ahol a CA1 piramissejtek lokális axonjai is futnak. Így ezek a sejtek lehetnek az egyik fő célelemcsoportja a CA1 piramissejteknek, amelyek preferenciálisan interneuronokat idegeznek be, ahogy azt a dolgozat első részében bemutattam. Ezt megerősíti Blasco-Ibanez és Freund közleménye (1995), amely szerint az itt elhelyezkedő mGluR1 α -pozitív és calbindin-tartalmú interneuronok glutamáterg bemeneteinek jelentős része

(>70%) a CA1 piramis sejtek lokális rostjaitól ered. Mivel a ritkán-tüskés HS sejtek mindkét említett markert expresszálják (Tóth és Freund, 1992; Gulyás és mtsai, 2003; Jinno és mtsai, 2007) valószínűleg ennek a csoportnak a glutamáterg bemenetei között is a CA1 piramis sejtek szinapszisai dominálnak.

A CA1 str. oriensben található HS sejteket innerválhatják az entorhinalis pálya alvearis rostjai is (Deller és mtsai, 1996), amelyek vizsgálataink szerint leginkább ezen a területen mutatnak preferenciát az interneuronok irányába (3. táblázat). Ezeken túl elhelyezkedésük alapján glutamáterg bemenet érkezik a CA1 HS sejtekre a Schaffer kollaterálisoktól és az amygdalából is (Pikkarainen és mtsai, 1999).

A CA3 régióban a CA3 piramis sejtek lokális axonjai mind a radiatum, mind az oriens réteget sűrűn behálózzák. Ennek megfelelően, a CA1 régióban megfigyeltekkel ellentétben a CA3-ban a ritkán-tüskés HS sejtek mindkét rétegben megtalálhatóak. Emellett a CA3 str. oriensben található HS sejtek dendritjei beléphetnek a str. radiatumba, amire a CA1 esetében nem láttunk példát. Szintén a lokális piramis sejtektől érkező bemenetek dominanciájára utalhat az a megfigyelésünk, ami szerint a ritkán-tüskés HS sejtek dendritjei radiálisan keresztezték a str. lucidumot és az ezeken mért input-denzitás alacsonyabb volt mint a str. oriensben vagy a str. radiatumban mért értékek. Ez azt mutathatja, hogy a moharost-terminálisok feltehetőleg elkerülik a ritkán-tüskés sejtek dendritjeit.

Mivel a mintavétel azonos módon történt, eredményeinket össze lehet hasonlítani a csoportunk által eddig megvizsgált interneuron-típusok szinaptikus bemeneteinek adataival (Gulyás és mtsai, 1999; Mátyás és mtsai, 2004). Az eddig megvizsgált interneuron típusok közül a HS sejtekre érkezik a legtöbb bemenet (~22 000/sejt), amely meghaladja az eddig ismert legsűrűbb beidegezést fogadó PV-pozitív sejtek összes bemenetének számát is (~16 300/sejt). Mivel a korábban megvizsgált sejtcsoportok radiális-, minden hippocampalis réteget elfoglaló dendritfával rendelkeztek, a CA1 HS sejtekkel összehasonlítva bemeneteiknek csak kisebb hányada érkeztetett a CA1 piramis sejtektől. Mindezek alapján a CA1 területén a megvizsgált sejtcsoportok közül valószínűleg a HS sejtek mintavételezik leghatékonyabban a lokális aktivitást. Mi lehet ez alapján a ritkán-tüskés HS sejtek szerepe a hippocampalis működésekben? *In vivo*, a double-projection (HS) sejtek erőteljesen növeli tüzelési frekvenciájukat az éllshullám-asszociált ripple aktivitás alatt (Jinno és mtsai, 2007).

Akciós potenciáljaik röviddel a CA1 piramis sejtek kisülését követik, ami alapján az aktív lokális piramis sejtektől származó nagy számú bemeneteik hatására kezdenek tüzelni (Jinno és mtsai, 2007). Az MS-DB-ben található sejtek gátoltak a hippocampusban mért ripple oszcilláció alatt (Dragoi és mtsai, 1999; Borhegyi és mtsai, 2004), amiért mindezek alapján az ebben a fázisban igen aktív HS sejtek septalis terminálisai által kibocsátott GABA lehet felelős. A HS sejtek ezzel a működésükkel megakadályozhatják a theta oszcilláció létrejöttét az éles hullám aktivitás alatt (Jinno és mtsai, 2007). Emellett az MS-DB-ben található gátló sejtek szinkron elcsendesülésének köszönhetően a hippocampalis interneuronok felszabadulhatnak a septo-hippocampalis pálya gátlása alól (Tóth és mtsai, 1997). Ennek eredményeképpen gátló hatást fejthetnek ki a sharp wave burstokért felelős piramis sejtekre, és ezáltal negatív visszacsatolást létrehozva megszüntethetik az adott ripple-t (Dragoi és mtsai, 1999). A HS sejtek CA1 régió piramis sejtjeit beidegző lokális kollaterálisainak elsődlegesen nem a gátlásban lehet szerepük, hanem a piramis sejtek feszültségfüggő ioncsatornáinak de-inaktivációjában, ami által lehetővé teszik ezek további tüzelését (Jinno és mtsai, 2007; Klausberger, 2009).

A GABAerg bemenetek arányát (14%) illetően a ritkán-tüskés HS sejtek a sor közepén helyezkednek el a többi interneuron csoport között (PV-pozitív sejtek: 6%, CR-pozitív sejtek: 21%, CB-pozitív sejtek: 29%, CCK és VIP-pozitív kosársejtek: 36%). A ritkán-tüskés HS sejtek fő GABAerg bemenete az MS-DB-ből származik (lásd az előző fejezetet), és többszörös beidegzést kaphatnak más HS sejtektől is, ahogy azt egy sejt esetében megfigyelhettük. A VIP és CR tartalmú hármastípusú interneuron-szelektív sejtek csoportja szintén beidegezheti őket, ugyanis ezek rostjai a HS sejtek elhelyezkedési területén a CA1 str. oriens/alveus határon futnak, és itt beidegzik az mGluR1 α -pozitív és calbindin-tartalmú interneuronokat, közöttük feltehetőleg a HS sejteket is (Acsády és mtsai, 1996; Ferraguti és mtsai, 2004).

A CA1 HS sejtek dendritfájának morfológiája hasonló az O-LM sejtekéhez: mindkét sejtípus horizontális str. oriens/alveus határon húzódó dendritekkel rendelkezik (McBain és mtsai, 1994; Maccaferri és McBain, 1995; Sik és mtsai, 1995), így fő bemenetét valószínűleg a CA1 piramis sejtektől kapja. Ennek ellenére az éleshullám során megfigyelhető ripple aktivitás során teljesen ellentétes viselkedést mutatnak: míg a HS sejtek ekkor a legaktívabbak (Jinno és mtsai, 2007), az O-LM

sejtek kifejezetten gátoltak alatta (Klausberger és mtsai, 2003). Ezt az eltérő membrántulajdonságok, ioncsatorna eloszlások mellett a GABAerg bemenetek eltérő anatómiai szerveződése is okozhatja, ezért érdemes lenne megvizsgálni a bemenetek tulajdonságait az O-LM sejtek esetében is.

A CA3 régió ritkán-tüskés HS sejtjein nagyon hasonló szinaptikus denzitás értékeket mértünk mint a CA1 területén, ami arra utal, hogy a ritkán-tüskés HS sejtek hasonló szerepet tölthetnek a CA3 és a CA1 neuronhálózatában. Fontos megjegyezni, hogy bár a megvizsgált ritkán-tüskés HS sejtek bemeneti tulajdonságai igen hasonlóak voltak, ismert, hogy a különböző neurokémiai markerek expresszálása alapján heterogén csoportot alkotnak mind a CA1 mind a CA3 területén. Az M2 muszkarinos receptor expresszáló HS sejtek például általában nem expresszálnak mGluR1 α receptort (Jinno és mtsai, 2007), amely alapján a ritkán-tüskés HS sejtek csoportján belül két alcsoport létezhet. Ezek esetleg funkcionálisan is eltérhetnek egymástól. Mindazonáltal a szinaptikus bemenetek vizsgálata során a mintánkban nem talákoztunk nagy egyedi különbségekkel, ezért úgy gondoljuk, hogy a különböző markereket expresszáló ritkán-tüskés HS sejtek input-denzitás értékei hasonlóak lehetnek.

6.2.2.3. A sűrűn-tüskés HS sejtek fő bemenete a szemcsesejtektől ered

A str. lucidum sűrűn-tüskés sejtjei azonosnak tekinthetők a korábban leírt sűrűn-tüskés calretinin-pozitív sejtek csoportjával (Gulyás és mtsai, 2003). Ezek a sejtek a nevüket a dendritjeiket és szómájukat is sűrűn beborító tüskékről kapták, amelyek rengeteg szinaptikus bemenetet fogadnak (Gulyás és mtsai, 1992; Soriano és Frotscher, 1993). Ebben a tanulmányban a korábbi becslés helyett egy pontosabb méréssel kimutattuk, hogy a hippocampusban eddig kvantitatív módon megvizsgált neuronpopulációk közül ezekre a sejtekre érkezik a legtöbb szinaptikus bemenet (~37 700; Gulyás és mtsai, 1999; Megias és mtsai, 2001; Mátyás és mtsai, 2004). Szómájuk és horizontális dendritfájuk, amelynek összes ága extrém réteg-specificitást mutatva a str. lucidumban húzódott szinte az összes szinaptikus bemenetét kisméretű, gyengén GABA-pozitív moharostterminálisoktól kapta. Korábbi megfigyelésekkel egyezően óriás moharostterminálisokat csak elvétve találtunk ezeken a sejteken (Gulyás és mtsai, 1992; Acsády és mtsai, 1998). Ez az erőteljes serkentő bemenet csak rendkívül

gyenge gátló beidegzéssel társult; a nem-principális sejtektől eredő GABAerg bemenetek aránya az összes bemeneten belül csupán 2,3% volt. Ez a alacsony arány megmagyarázhatja azt a megfigyelést, hogy ez a sejtípus rendkívül érzékenynek bizonyult ischemiában (Freund és Maglóczky, 1993; Hsu és Buzsáki, 1993; Arabadzisz és Freund, 1999) és kísérletes epilepszia modellekben (Maglóczky és Freund, 1995; van Vliet és mtsai, 2004). Feltételezhető, hogy a moharostok sarjadzása miatti illetve az ischaemia alatt bekövetkező excitotoxikus hatást nem tudja kivédeni ilyen alacsony számú gátló bemenet, ezért ezek a sejtek hamarabb elpusztulnak.

A ritkán-tüskés és sűrűn-tüskés HS sejtek bemeneteinek eltérő eredetét (lokális piramissejtek versus szemcsesejtek) támasztja alá Wittner és mtsai megfigyelése (2006), amely szerint a CA3 piramissejtek axonágai beidegezik a tüske-mentes interneuron dendriteket, de elkerülik a tüskés interneuronokat. A CA3 régióban található ritkán-tüskés HS sejtek dendritfájának csak a legdistalisabb része hordoz elszórtan tüskéket, ezért ez a sejtípus a fenti tanulmányban a tüske-mentes interneuronok közé sorolandó. Mi a vizsgálataink során azt találtuk, hogy a szemcsesejtek a HS sejtek esetében a CA3 piramissejtekkel épp ellentétes szelektivitást mutatnak: beidegezik a sűrűn-tüskés HS sejteket, de csak ritkán létesítenek szinapszist a ritkán-tüskés HS sejtekkel.

6.2.2.4. *A hilaris HS sejtek*

Bár a hilaris HS sejtek nagyon heterogén csoportot alkottak, a dendritfájuk hasonló elhelyezkedést mutatott. Az összes megfigyelt sejt közös jellemzője volt, hogy dendritjeik sosem léptek be a str. granulosum vagy a str. moleculare rétegekbe, amiből arra következtethetünk, hogy az entorhinalis rostok valószínűleg nem idegezték be őket. Ez alapján ez a csoport akár azonos populációba tartozhat a somatostatin-pozitív hilaris perforáns pálya-asszociált sejtekkel (HIPP sejtek, Han és mtsai, 1993; Buckmaster és Schwartzkroin, 1995). Utóbbiak a str. moleculare külső kétharmadában idegezik be a szemcsesejtek dendritjeit, így a perforáns pálya bemeneteket tartják gátló kontroll alatt (Halasy és Somogyi, 1993). A hilusban az ellenoldali gyrus dentatusba vetítő GABAerg sejtek is vannak (Zappone és Sloviter, 2001), de még nem tudjuk ezek egyidejűleg vetíthetnek-e az MS-DB-be is. A hilaris HS sejtek bemeneteik nagy részét a

sűrűn-tüskés HS sejtekhez hasonlóan a szemcsesejtek moharostjainak kisméretű filopodiális és *en passant* terminálisaitól kapják.

6.2.2.5. A HS sejtek lehetséges szerepe pathologicus folyamatokban

A hilaris somatostatin-pozitív interneuronok száma a str. lucidumban található sűrűn-tüskés sejtekéhez hasonlóan szintén csökken ischaemiát követően (Johansen és mtsai, 1987), különböző epilepszia modellekben (Sloviter, 1987; Freund és mtsai, 1992; Lowenstein és mtsai, 1992; Sperk és mtsai, 1992; Mitchell és mtsai, 1995; Buckmaster és Dudek, 1997) és temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegekben (de Lanerolle és mtsai, 1989; Mathern és mtsai, 1995; Sundstrom és mtsai, 2001). A hilaris és sűrűn-tüskés CA3 HS sejtek korai degenerációja a fenti állapotokban azzal a következménnyel járhat, hogy a hippocampo-septalis projekciónak megszűnik az a része, amely a szemcsesejtek aktivitásáról tájékoztatta az MS-DB-t. A CA1 és CA3 ritkán-tüskés HS sejtjeitől eredő MS-DB-be vetítő axonok viszont valószínűleg megmaradnak, ugyanis a str. oriens calbindin és somatostatin-pozitív (feltehetőleg HS-) sejtjei túlélőnek bizonyultak az egyik kísérletes epilepsziamodellekben (Cossart és mtsai, 2001; Dinocourt és mtsai, 2003). Ez azt jelentheti, hogy a továbbiakban a hippocampalis formatio principális sejtjei közül csak a piramissejtek aktivitása alapján lesz lehetőség az MS-DB szabályozására. A pilocarpin és káinsavas epilepszia modellekben az enyhe rohamokat és anatómiai változásokat mutató állatokban a CA1 piramissejt axonok sarjadzása figyelhető meg (Esclapez és mtsai, 1999). Ez viszont azt eredményezheti, hogy a CA1 ritkán-tüskés HS sejtek CA1 piramissejtektől eredő bemeneteinek száma - ami vizsgálataink szerint kontroll állapotban is rendkívül magas - megnőhet. Ennek következtében a ritkán-tüskés HS sejtek aktivitása is fokozódhat, így jelentősebb mértékben befolyásolhatják az MS-DB septo-hippocampalis sejtjeit. A HS sejtek MSDB-t és hippocampust is tartalmazó szeletben IPSP-eket és rebound spikeokat válthatnak ki az MSDB GABAerg neuronjaiban (Manseau és mtsai, 2008), ami alapján fontosak lehetnek a theta ritmus szabályozásában. Epilepszia során ezen funkciójuk a pusztulásuk (sűrűn-tüskés HS sejtek) vagy lehetséges aktivitásváltozásuk (ritkán-tüskés HS sejtek) miatt feltételezhetőleg sérül, de erre közvetlen bizonyíték még nincsen. Ismert, hogy a pilocarpinnal előidézett epilepszia korai szakaszában, amikor még a CA1 piramissejtek többsége (90%) megőrződött, a theta ritmus megváltozik a

kontroll állatokéhoz képest (Chauvière és mtsai, 2009). Ez együtt jár a térbeli memória károsodásával, amelynek mértéke korrelál a theta ritmus powerének csökkenésével (Chauvière és mtsai, 2009). A térbeli memória károsodása mögött a hippocampus helysejtjeinek deficitje állhat, ezek aktivitása ugyanis korai életkorban történő hippocampalis epileptikus görcsöket követően tartósan megváltozik a kontroll állatok helysejtjeihez képest (a helymezők kevésbé stabilak, információ tartalmuk alacsonyabb; Karnam és mtsai, 2009). Az viszont, hogy a theta ritmus változása és a következményes térbeli memória károsodás bármilyen közvetett vagy közvetlen ok-okozati kapcsolatban áll a HS sejtek sűrűn tüskés csoportjának pusztulásával ill. ritkán-tüskés HS sejtek feltételezett aktivitásnövekedésével még nem ismert (Colom, 2006). A theta ritmus antiepileptikus hatású (a görcsök gyakorisága alacsonyabb spontán vagy kiváltott theta alatt; Colom, 2006), így ha szabályozásában valóban szerepet játszanak a HS sejtek, akkor pusztulásuk vagy aktivitásváltozásuk a theta ritmus powerjének csökkentésén keresztül hozzájárulhat a betegség előrehaladásához.

6.2.2.6 A ritkán-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumát beidedegző septalis rostok jelentősége

Már korábban is tudtuk, hogy a gátlósejtek axon iniciális szegmentumát is beidegezzük GABAerg terminálisok (Gulyás és mtsai, 1999; Mátyás és mtsai, 2004), de ezek eredete bizonytalan volt, ugyanis az axo-axonikus sejtek csak a principális sejtek axon iniciális szegmentumait innerválják (Somogyi és mtsai, 1982; Somogyi és mtsai, 1983). A kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint a parvalbumin-pozitív interneuronok axon iniciális szegmentumain található boutonok nem tartalmaztak parvalbumint, ami megerősíti, hogy ezek nem a (parvalbumin-pozitív) axo-axonikus sejtektől eredtek (Gulyás és mtsai, 1999). Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a ritkán-tüskés HS sejtek axon iniciális szegmentumait beidegző boutonok eredhetnek az MS-DB GABAerg sejtjeitől, amelyek ezáltal igen hatékony módon befolyásolhatják a ritkán-tüskés HS sejtek akciós potenciáljait, kimeneti jelét. A piramissejtek axon iniciális szegmentumain megfigyeltékhez hasonlóan a befolyás iránya (serkentés vagy gátlás) a kloridionok egyensúlyi potenciáljától és az ezt meghatározó kloridion

transzporterek jelenlététől függhet (Szabadics és mtsai, 2006), amelyek eloszlását a HS sejtek és egyéb interneuronok esetében még nem ismerjük.

A CA1 területén a HS sejtek axon iniciális szegmentumait a GABAerg boutonoknál kisebb méretű GABA-negatív terminálisok is beidegezték, hasonló arányban, ami a szómára is jellemző volt. Találtunk egy olyan GABA-negatív bemenetet is, amely a beidegzett axon iniciális szegmentum mellett egy piramisajt tuskét is innervált. Ez alapján feltételezhető, hogy az axon iniciális szegmentumokat beidegző GABA-negatív boutonok glutamát neurotranszmitterrel rendelkeznek. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a HS sejtek axon iniciális szegmentumának bemenetei a szóma és a proximalis dendritek bemeneteihez hasonlóan szerveződnek, és nincs olyan nagy eltérés a különböző kompartmentumok között, mint a principális sejtek esetében. Utóbbi a CCK-pozitív kosársejtekre is igaz, mert esetükben is találtak GABA-negatív bemeneteket az axon iniciális szegmentumokon, a szómán mért értékekhez hasonló arányban (Mátyás és mtsai, 2004).

6.2.3. A HS sejtek különböző célelem-szelektivitást mutathatnak

A HS sejtek lokális posztzinaptikus célelemeit csoportunk először fiatal patkányban vizsgálta meg (Gulyás és mtsai, 2003). Gulyás és mtsai ebben a tanulmányban a következő módon jelölték meg a HS sejteket: az MS-DB-be retrográd jelölőanyagot, fluoreszcens mikrogyöngyöt injektáltak, majd a műtött patkányok hippocampusából szeleteket készítettek és az egyedi, fluoreszcensen világító sejteket biocytinnel töltötték fel *in vitro*. A megvizsgált HS sejtek axonfája minden hippocampalis rétegben előfordulhatott, és az interneuron-szelektív sejtekre jellemző módon a kollaterálisai mentén szabálytalan távolságokra található boutonokkal rendelkezett, amelyek kizárólag interneuronokat idegezték be (5. ábra). Ezzel szemben egy későbbi tanulmányban, Jinno és mtsai (2007) által *in vivo*, juxtacellulárisan feltöltött, MS-DB felé irányuló axonnal rendelkező sejtek főleg vékony piramisajt dendriteket innerváltak a str. oriensben és radditaumban. A jelen tanulmányban három retrográd úton, BDA tracerrel jelölt CA1 HS sejt célelem-szelektivitását vizsgáltuk meg felnőtt patkányban. Ez a Jinno és mtsai által jelölt sejtekére hasonlított: az általunk megvizsgált sejtek axonjai a str. radiatumban és oriensben arborizáltak, főleg vékony

piramissejt dendriteket (80,6%) és ritkábban piramissejt tüskéket (11,7%) idegeztek be, a posztszinaptikus interneuronok aránya jóval alacsonyabb volt (3,3%).

Az ellentmondásra több lehetséges magyarázat is létezik: i) Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a HS sejtek célelem-szelektivitása változhat a fejlődés folyamán, ezért eltérő lehet a fiatal és felnőtt patkányokban. A fejlődő állatban a HS sejtek első célelemei interneuronok lehetnek, amelyek a piramissejteket megelőzve differenciálódnak, körülbelül a septo-hippocampalis axonok megérkezésével azonos időben (Soriano és mtsai, 1986; Lang és Frotscher, 1990; Linke és Frotscher, 1993; Dupuy és Houser, 1997). Ezt követően, a piramissejtek differenciálódásával párhuzamosan megszűnhet az interneuronokat beidegző szinapszisok nagy része, és új, piramissejtekkel szinaptizáló boutonok jöhetnek létre. Ezzel egy időben az axonágak elhelyezkedése is változhat. Az általunk megvizsgált sejtek egyikének axonfája, -amellett, hogy a másik két sejthez hasonlóan főleg piramissejteket innervált - egy rövid részletén kevert target-szelektivitást mutatott: rákúszott egy másik jelölt HS sejt két dendritjére és azzal kilenc szinapszist létesített. Ez arra utalhat, hogy ezen a szakaszon ez a sejt megtarthatta eredeti célelem-szelektivitását. ii) A másik lehetséges magyarázat, hogy a CA1 HS sejtek heterogén csoportot képeznek a célelem-szelektivitásuk és axon arborizációjuk szerint mind fiatal mind felnőtt állatban. Ez esetben felmerül a kérdés, hogy miért nem találni interneuron-szelektív HS sejtet *in vivo*, illetve piramissejteket beidegző HS sejtet *in vitro*. Egy lehetséges válasz, hogy jóval kevesebb interneuron-szelektív HS sejt van, így megjelölésüknek kicsi az esélye *in vivo*. Azt a tényt, hogy ezzel szemben *in vitro* csak ilyen sejtet sikerült feltölteni talán azzal magyarázhatjuk, hogy az *in vitro* mintavétel nem volt teljesen random a következők miatt: i) Lehetséges, hogy a különböző retrográd jelölő anyagokat eltérő típusú sejtek veszik fel. A BDA 3kD felvétele például aktivitás-függő (Jiang és mtsai, 1993), így az aktívabb sejtípusok nagyobb számban lehetnek az ezzel az anyaggal megjelölt sejtek között. Elképzelhető, hogy a fluoreszcens mikrogyöngyöket az interneuron-szelektív HS sejtek csoportja vette fel inkább, így relatíve nagyobb arányban képviseltették magukat a hippocampusban jelölt HS sejtek között. ii) A szeletben talált, mikrogyöngyöt tartalmazó HS sejtek többsége (~90%) nem volt életben, így ezeket nem lehetett biocytinnel feltölteni. Ha eltérés van a különböző HS sejt csoportok túlélési rátájában, vagyis ha a piramissejteket beidegző HS sejtek érzékenyebbek a szeletkészítés során megváltozott körülményekre

mint az interneuron-szelektív HS sejtek, akkor előfordulhat, hogy az eredetileg ritkább, de a szeletkészítésre rezisztensebb interneuron-szelektív sejtek lesznek többségben az élő, biocytinnel feltölthető sejtek között.

6.2.4. A CA1 HS sejtek kiterjedt, több agyterületre is vetítő axonfája

A három, ebben a tanulmányban rekonstruált CA1 HS sejt lokális axonfája a hippocampusnak rendkívül nagy területét betöltötte, laza axonhálózatot képezve főleg a str. oriens és radiatum rétegben (17. ábra). A szómától akár 900 μm távolságra is megfigyeltünk boutonokat hordozó kollaterálisokat. Az egyik sejt esetében a CA3 területén is találtunk axonágakat, ami alapján ez a sejt az ún. back-projection sejtekre emlékeztetett (Sik és mtsai, 1994). Mivel a jelölőanyag elhalványulása miatt az egyik sejt esetében sem sikerült a teljes axonfát rekonstruálni, a HS sejtek axonhálózata jóval nagyobb is lehet, akár az egész hippocampust behálózhatja. A lokális axonhálózat laza szerkezete arra utal, hogy ezek a sejtek rengeteg piramissejtet beidegeznek, de az egyedi piramissejtekkel csak gyenge kapcsolatokat létesítenek. Mivel a HS sejtek csak a vékony, distalisabb piramidendriteket és a piramistüskéket idegezik be, a piramissejtek kimeneti jelét valószínűleg nem-, vagy csak csak nagyon kis mértékben befolyásolják. Ezt az is alátámasztja, hogy a HS sejtek a theta ritmus alatt abban a fázisban legaktívabbak, amikor a piramissejtek tüzelése maximális (Jinno és mtsai, 2007). A HS sejtek a piramissejtek kimenetének szabályozása helyett tehát valószínűleg inkább a glutamáterg, tüskékre érkező egyedi bemenetek hatását modulálhatják.

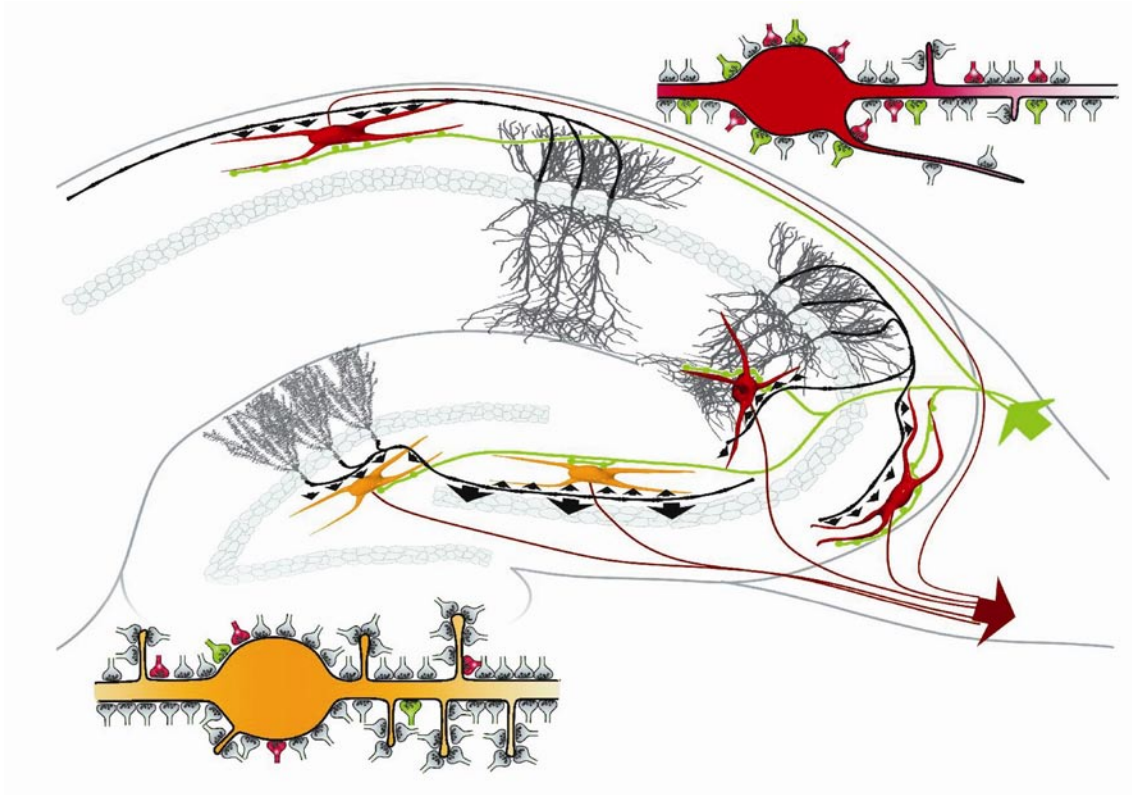
A HS sejtek axonjai nemcsak a hippocampusban divergálnak sok sejtire, hanem a hippocampuson kívül is több különböző, egymástól nagy távolságra elhelyezkedő agyterületet beidegezhettek. A Jinno és mtsai által (2007) feltöltött double projection sejtek az MS-DB mellett a hippocampustól caudalisan elhelyezkedő subiculumba is vetítettek. Mi nem tudtuk ekkora távolságra követni az axonokat, de a rekonstruált sejtek közül kettőnek volt caudalis irányba tartó vastag kollaterálisa, amely akár a subiculumot is elérhette. Mi lehet a szerepe az ilyen nagy divergenciával bíró, távoli területekre vetítő GABAerg sejteknek? A kognitív reprezentációk előállításához szükséges gyors kommunikációt a különböző agyterületek között valószínűleg a glutamáterg principális sejtek teszik lehetővé. Az ugyanezen területeket összekötő interneuronok gyorsabb vezetésű rostjaik révén ennek az információátadásnak a precíz

koordinációjáért lehetnek felelősek, és kulcsfontosságú szerepet tölthetnek be a ritmikus aktivitások szinkronizációjában.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a CA1 régiót beidegző glutamáterg bemenetek különböző célelem-szelektivitást mutatnak; az általuk beidegzett piramis sejtek és interneuronok relatív aránya pályára jellemző. A Schaffer kollaterálisok az oriens és radiatum rétegekben túlnyomórészt piramis sejtek tuskéit idegezik be hasonlóan a str. lacunosum-moleculare területét innerváló entorhinalis axonokhoz. Mindkét bemenet szinapszisainak több mint 90%-a esetében piramis sejt-, és kevesebb mint 10%-a esetében interneuron a posztszinaptikus partner, ami megfelel a két sejtcsoport előfordulási valószínűségének a CA1 területén. Ezzel szemben a CA1 piramis sejtek str. oriens és alveus határán futó lokális axonjai preferenciálisan interneuronokkal létesítenek szinaptikus kapcsolatot (>50%), és csak kisebb mértékben idegeznek be piramis sejteket. Ez azt jelenti, hogy a CA1 területén a CA3 régióval ellentétben a piramis sejtek között nem jellemzőek rekurrens asszociációs kapcsolatok. A CA1 piramis sejtek által beidegzett interneuronok nagy része a rostok elhelyezkedése, a posztszinaptikus profilok ultrastukturális morfológiája és korábbi közlemények eredményei alapján a horizontális str. oriens/alveus interneuronok közé (Pl. O-LM és HS sejtek) tartozhat. Eredményeink szerint a CA1 régióba érkező entorhinalis bemenet rétegre jellemző célelem-szelektivitást mutat; az oriens, pyramidale és radiatum rétegeken áthaladó alvearis rostok a str. lacunosum-moleculare-ban mért értékeknél jóval nagyobb arányban (>20%) idegeznek be interneuronokat. Ez azt eredményezheti, hogy a lacunosum-moleculare rétegen kívül található interneuronok az eddig feltételezettnél nagyobb mértékben vehetnek részt az entorhinalis bemenet által kiváltott erős feed-forward gátlás kialakításában.

A HS sejtek szinaptikus kapcsolatainak anatómiai vizsgálata során talált eredményeinket a 18. ábrán foglaltuk össze. A HS sejtek egyik csoportja, a ritkán-tüskés HS sejtek azokban a hippocampalis rétegekben fordulnak elő, ahol az adott régió principális sejtjeinek rekurrens axonágai végződnek (CA1 str. oriens/alveus, CA3 str. radiatum és oriens), így nagy számú glutamáterg bemeneteik többségét ezektől kaphatják. A másik csoportot alkotó sűrűn-tüskés HS sejtek specifikusan a str. lucidumban és a hilusban fordulnak elő, ahol rengeteg glutamáterg bemenetet fogadnak a szemcsesejtek kis terminálisaitól. Ennek következtében a két különböző HS sejt



18. Ábra. A HS sejtek reciprok kapcsolatban állnak az MS-DB GABAerg sejtjeivel, amelyeket sűrű szinaptikus bementek révén nagyszámú principális sejt állapotáról tájékoztathatnak.

A septo-hippocampalis GABAerg axonok (zöld) beidegzik az MS-DB-be projekciós axonágaikkal (piros) visszavetítő HS sejtet. A ritkán-tüskés HS sejtek (piros) a lokális piramis sejtek által beidegzett területeken (CA1-3 str. oriens, CA3 str. radiatum) helyezkednek el, míg a sűrűn-tüskés HS sejtek (sárga) a szemcsesejt axonok végződési területén (hilus, CA3 str. lucidum) találhatóak. A szemcsesejt moharostjai óriás mohaterminálisaikkal (nagy nyilak) sok szinapszist létesítenek a CA3 piramis sejtekkel, míg kisebb méretű filopodiális vagy en passant boutonjaikkal (kis nyilak) egy-egy szinapszist formálnak a beidegzett interneuronokkal, többek között a sűrűn-tüskés HS sejtekkel. A két HS sejt típusra érkező szinaptikus bemenetek denzitása különböző, amit az bal alsó és a jobb felső sarokban található inzerteken ábrázoltunk: Mindkét típusra nagyszámú glutamáterg bemenet érkezik (szürke), amit alacsonyabb számú GABAerg input szabályoz (piros és zöld), amelyek egy része az MS-DB-ből érkezik (zöld). A sűrűn-tüskés HS sejtekre a tüskék nagyobb sűrűségének köszönhetően jóval több

bemenet érkezik mint a ritkás tüskés HS sejtekre. A ritkán-tüskés HS sejteken az összes bemenet 14%-a GABAerg, míg a sűrűn-tüskés HS sejteken ez az arány rendkívül alacsony (2,3%). A ritkán-tüskés sejtek esetében a szómára érkező összes GABAerg bemenetnek akár az 54,5%-a is septalis eredetű lehet. A ritkán-tüskés sejtek axon iniciális szegmentumát (a felső inzerten lefelé irányuló vékony nyúlvány) egyaránt beidegzik GABA-negatív és GABA-pozitív (köztük septalis) boutonok. A nagyszámú glutamáterg bemenet lehetővé teszi, hogy a HS sejtek a hippocampalis formatio aktivitásszintjének változásairól megbízhatóan tájékoztassák a medialis septumot.

Forrás: Takács és mtsai., 2008.

csoport a lokális piramissejtek- (ritkán-tüskés HS sejtek) illetve a szemcsesejtek (sűrűn-tüskés HS sejtek) nagy populációjának aktivitásváltozásairól tájékoztathatja az MS-DB neuronjait. Mindkét típust beidegzik az MS-DB-ből eredő GABAerg axonok, sejtpopuláció-szintű reciprok kapcsolatok kialakítva a hippocampus és az MS-DB között, ami fontos lehet a két agyterület oszcillációinak összehangolásában. A sűrűn-tüskés sejteket arányaiban jóval kevesebb GABAerg terminális idegezi be mint a ritkán-tüskés HS sejteket, amely megmagyarázhatja a két típus eltérő érzékenységét pathologicus folyamatokban (ischemia, epilepszia). Az általunk megvizsgált ritkán-tüskés CA1 HS sejtek lokális axonjai túlnyomórészt piramissejteket idegeztek be, amiből a fiatal állatokban ismert interneuron-szelektivitásuk fényében arra következtethetünk, hogy ezek a sejtek vagy heterogén csoportot képeznek célelem-szelektivitásuk szerint vagy az egyedfejlődés során megváltoztatják célelem-preferenciájukat.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A CA1 régió fő glutamáterg bemenetei piramis sejteket és interneuronokat egyaránt beidegeznek, de a pályák célelem-szelektivitása nem ismert. A különböző pályák anatómiai szerveződésének összehasonlítása céljából elektronmikroszkópos vizsgálattal meghatároztuk *in vivo* vagy *in vitro* jelölt CA1 és CA3 piramis sejtek, valamint entohinalis axonok által beidegzett piramis sejt-, és interneuron célelemelemek relatív arányát. Míg a Schaffer kollaterálisok és a stratum (str.) lacunosum-moleculare-t beidegző entohinalis rostok túlnyomórészt piramis sejteket idegeztek be (>90%), a CA1 piramis sejtek lokális axonjai preferenciálisan interneuronokat innerváltak (>50%). Az entorhinalis bemenet rétegre jellemző célelem-szelektivitást mutatott; az oriens-, pyramidale-, és radiatum rétegeken áthaladó alvearis rostok a str. lacunosum-moleculare-ban mért értékeknél szignifikánsan nagyobb arányban (>20%) idegeztek be interneuronokat.

A disszertációban szereplő másik munkában a medialis septum-diagonalis Broca-köteg komplexumába (MS-DB) vetítő GABAerg hippocampo-septalis sejtek (HS) szinaptikus bemeneteit tanulmányoztuk. A hippocampusban ezeknek a sejteknek két fő típusát tudtuk elkülöníteni, amelyek jellegzetesen különböztek morfológiájuk és szinaptikus bemeneteik alapján. A ritkán-tüskés HS sejtek azokban a rétegekben fordultak elő, ahol az adott régió principális sejtjeinek rekurrens axonágai végződnek (CA1-3 str. oriens/alveus, CA3 str. radiatum), és nagy számú glutamáterg bemenetet kaptak (~19 000/sejt a CA1 területén). A másik csoportot alkotó sűrűn-tüskés HS sejtek specifikusan a str. lucidumban és a hilusban fordultak elő, ahol főleg a szemcsesejtek kis terminálisai idegezték be őket nagy sűrűségben (~37 000/sejt a str. lucidumban). Míg a ritkán-tüskés HS sejtek bemeneteinek körülbelül 14%-a volt GABA-pozitív, a sűrűn-tüskés HS sejtekkel rendkívül kevés gátlósejttől eredő terminális létesített szinapszist (~2,3%). Mindkét típust beidegezték GABAerg septo-hippocampalis axonok, sejt populáció-szintű reciprok kapcsolatot kialakítva a hippocampus és az MS-DB között, amely fontos lehet a két agyterület oszcillációinak összehangolásában. A megvizsgált CA1 HS sejtek lokális axonjai főleg piramis sejteket idegeztek be. A nagyszámú glutamáterg bemenet lehetővé teheti, hogy a HS sejtek a hippocampalis formatio aktivitásintjének változásairól megbízhatóan tájékoztassák az MS-DBt.

9. SUMMARY

Glutamatergic inputs of the CA1 area innervate both pyramidal cells and interneurons; however, their target selectivity is not known. To compare the anatomical organization of different pathways, we determined the relative proportion of pyramidal cell and interneuron targets of *in vivo* or *in vitro* labeled CA1 and CA3 pyramidal cells and entorhinal axons using electron microscopy. While Schaffer collaterals and entorhinal axons in stratum (str.) lacunosum-moleculare innervated a high proportion of pyramidal cells (>90%), local axons of CA1 pyramidal cells targeted preferentially interneurons (>50%). Entorhinal axons showed a layer-specific target selection as the alvear fibers transversing str. oriens-, pyramidale-, and radiatum innervated a significantly higher proportion of interneurons (>20%) than did the entorhinal axons in str. lacunosum-moleculare.

A second goal of the thesis was to quantitatively describe the synaptic inputs of GABAergic hippocampo-septal (HS) cells that project to the medial septum-diagonal band of Broca complex (MS-DB). Two types of HS cells were found in the hippocampus, which were characteristically different according to their morphological and input properties. Sparsely-spiny HS cells were found in hippocampal areas where recurrent axons of principal cells arborize (CA1-3 str. oriens/alveus, CA3 str. radiatum), and they received dense glutamatergic inputs (~19 000/cell in the CA1 area). Densely-spiny HS cells were located specifically in str. lucidum and hilus, where the small terminals of granule cells innervated them in high density (~37 000/cell in str. lucidum). While about 14% of the inputs were GABA-positive for the sparsely spiny cells, densely spiny cells were innervated by an extremely low number of GABAergic terminals (~2.3%). GABAergic septo-hippocampal axons innervated both types of HS cells, establishing a reciprocal connection between the hippocampus and MS-DB, which can be important in synchronizing the oscillations of the two areas. Local axons of CA1 HS cells formed synapses mostly with pyramidal cells. The synaptic organization suggest that by sampling the activity of large populations of principal cells HS cells could reliably broadcast changes of hippocampal activity level to the MS-DB.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Acsády L, Káli S (2003) A hippocampusfüggő memória neurobiológiai alapjai. In: Pléh C, Kovács G, Gulyás B (szerk.) *Kognitív Idegtudomány*, Osiris Kiadó, Budapest, 2003: 359-388.
- Acsády L, Káli S (2007) Models, structure, function: the transformation of cortical signals in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:577-599.
- Acsády L, Halasy K, Freund TF (1993) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. *Neuroscience* 52:829-841.
- Acsády L, Görcs TJ, Freund TF (1996) Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73:317-334.
- Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T, Buzsáki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386-3403.
- Acsády L, Pascual M, Rocamora N, Soriano E, Freund TF (2000a) Nerve growth factor but not neurotrophin-3 is synthesized by hippocampal GABAergic neurons that project to the medial septum. *Neuroscience* 98:23-31.
- Acsády L, Katona I, Martínez-Guijarro FJ, Buzsáki G, Freund TF (2000b) Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J Neurosci* 20:6907-6919.
- Ahmed OJ, Mehta MR (2009) The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends Neurosci* 32:329-338.
- Aika Y, Ren JQ, Kosaka K, Kosaka T (1994) Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector. *Exp Brain Res* 99:267-276.
- Ali AB, Thomson AM (1998) Facilitating pyramid to horizontal oriens-alveus interneurone inputs: dual intracellular recordings in slices of rat hippocampus. *J Physiol* 507 (Pt 1):185-199.

- Ali AB, Deuchars J, Pawelzik H, Thomson AM (1998) CA1 pyramidal to basket and bistratified cell EPSPs: dual intracellular recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol* 507 (Pt 1):201-217.
- Alonso A, Köhler C (1982) Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett* 31:209-214.
- Amaral DG, Kurz J (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 240:37-59.
- Amaral D, Lavenex P (2006). Chapter 3. "Hippocampal Neuroanatomy". In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. (szerk.) *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Oxford: 37-114.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Andersen P, Eccles JC, Loynning Y (1963) Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature* 198:540-542.
- Ang CW, Carlson GC, Coulter DA (2005) Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. *J Neurosci* 25:9567-9580.
- Arabadzisz D, Freund TF (1999) Changes in excitatory and inhibitory circuits of the rat hippocampus 12-14 months after complete forebrain ischemia. *Neuroscience* 92:27-45.
- Ascoli GA, Atkeson JC (2005) Incorporating anatomically realistic cellular-level connectivity in neural network models of the rat hippocampus. *Biosystems* 79:173-181.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Brown WJ (1988) Distribution of glutamate-decarboxylase-immunoreactive neurons and synapses in the rat and monkey hippocampus: light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 278:121-138.
- Baimbridge KG, Miller JJ (1982) Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res* 245:223-229.

- Baisden RH, Woodruff ML, Hoover DB (1984) Cholinergic and non-cholinergic septo-hippocampal projections: a double-label horseradish peroxidase-acetylcholinesterase study in the rabbit. *Brain Res* 290:146-151.
- Baude A, Bleasdale C, Dalezios Y, Somogyi P, Klausberger T (2007) Immunoreactivity for the GABAA receptor alpha1 subunit, somatostatin and Connexin36 distinguishes axoaxonic, basket, and bistratified interneurons of the rat hippocampus. *Cereb Cortex* 17:2094-2107.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11:771-787.
- Bergersen L, Ruiz A, Bjaalie JG, Kullmann DM, Gundersen V (2003) GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses. *Eur J Neurosci* 18:931-941.
- Berod A, Hartman BK, Pujol JF (1981) Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 29:844-850.
- Biró AA, Holderith NB, Nusser Z (2005) Quantal size is independent of the release probability at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 25:223-232.
- Blackstad TW, Kjaerheim A (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* 117:133-159.
- Bland BH, Oddie SD (2001) Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav Brain Res* 127:119-136.
- Blasco-Ibáñez JM, Freund TF (1995) Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci* 7:2170-2180.
- Borhegyi Z, Maglóczy Z, Acsády L, Freund TF (1998) The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *Neuroscience* 82:1053-1065.

- Borhegyi Z, Varga V, Szilágyi N, Fabo D, Freund TF (2004) Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J Neurosci* 24:8470-8479.
- Bourne JN, Kirov SA, Sorra KE, Harris KM (2007) Warmer preparation of hippocampal slices prevents synapse proliferation that might obscure LTP-related structural plasticity. *Neuropharmacology* 52:55-59.
- Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47-60.
- Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296:2243-2246.
- Brun VH, Leutgeb S, Wu HQ, Schwarcz R, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2008) Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron* 57:290-302.
- Buckmaster PS, Schwartzkroin PA (1995) Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J Neurosci* 15:774-789.
- Buckmaster PS, Dudek FE (1997) Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol* 385:385-404.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828.
- Buzsáki G (1984) Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol* 22:131-153.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.
- Cenquizca LA, Swanson LW (2006) Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J Comp Neurol* 497:101-114.
- Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1-26.
- Chan-Palay V (1972) The tripartite structure of the undercoat in initial segments of Purkinje cell axons. *Z Anat Entwicklungsgesch* 139:1-10.

- Chauvière L, Rafrafi N, Thinus-Blanc C, Bartolomei F, Esclapez M, Bernard C (2009) Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29:5402-5410.
- Chicurel ME, Harris KM (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325:169-182.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 246:435-458.
- Coggeshall RE, Lekan HA (1996) Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 364:6-15.
- Colbert CM, Levy WB (1992) Electrophysiological and pharmacological characterization of perforant path synapses in CA1: mediation by glutamate receptors. *J Neurophysiol* 68:1-8.
- Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462:353-357.
- Colom LV (2006) Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96:609-623.
- Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E (2005) Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 58:151-164.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2001) Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4:52-62.
- Csicsvari J, Hirase H, Mamiya A, Buzsáki G (2000) Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* 28:585-594.
- 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* 19:274-287.

- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495:387-395.
- Deller T, Adelmann G, Nitsch R, Frotscher M (1996) The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res* 286:293-303.
- Desmond NL, Scott CA, Jane JA, Levy WB (1994) Ultrastructural identification of entorhinal cortical synapses in CA1 stratum lacunosum-moleculare of the rat. *Hippocampus* 4:594-600.
- Deuchars J, Thomson AM (1996) CA1 pyramid-pyramid connections in rat hippocampus in vitro: dual intracellular recordings with biocytin filling. *Neuroscience* 74:1009-1018.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M (2003) Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459:407-425.
- Dragoi G, Carpi D, Recce M, Csicsvari J, Buzsáki G (1999) Interactions between hippocampus and medial septum during sharp waves and theta oscillation in the behaving rat. *J Neurosci* 19:6191-6199.
- Dupuy ST, Houser CR (1997) Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *J Comp Neurol* 389:402-418.
- Ego-Stengel V, Wilson MA (2007) Spatial selectivity and theta phase precession in CA1 interneurons. *Hippocampus* 17:161-174.
- Eldred WD, Zucker C, Karten HJ, Yazulla S (1983) Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 31:285-292.
- Empson RM, Heinemann U (1995) The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. *J Physiol* 484 (Pt 3):707-720.
- Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, Bernard C (1999) Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 408:449-460.

- Eyre MD, Freund TF, Gulyas AI (2007) Quantitative ultrastructural differences between local and medial septal GABAergic axon terminals in the rat hippocampus. *Neuroscience* 149:537-548.
- Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004) Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* 14:193-215.
- Ferraguti F, Klausberger T, Cobden P, Baude A, Roberts JD, Szucs P, Kinoshita A, Shigemoto R, Somogyi P, Dalezios Y (2005) Metabotropic glutamate receptor 8-expressing nerve terminals target subsets of GABAergic neurons in the hippocampus. *J Neurosci* 25:10520-10536.
- Ferrante M, Migliore M, Ascoli GA (2009) Feed-forward inhibition as a buffer of the neuronal input-output relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18004-18009.
- Fiala JC, Kirov SA, Feinberg MD, Petrak LJ, George P, Goddard CA, Harris KM (2003) Timing of neuronal and glial ultrastructure disruption during brain slice preparation and recovery in vitro. *J Comp Neurol* 465:90-103.
- Fiala JC (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microsc* 218:52-61.
- Freund TF, Antal M (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336:170-173.
- Freund TF, Gulyás AI, Acsády L, Görcs T, Tóth K (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8501-8505.
- Freund TF (1992) GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl* 7:79-91.
- Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkänen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ (1992) Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull* 28:27-38.
- Freund TF, Maglóczy Z (1993) Early degeneration of calretinin-containing neurons in the rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience* 56:581-596.

- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Freund TF, Katona I (2007) Perisomatic inhibition. *Neuron* 56:33-42.
- Frotscher M, Léránth C (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 239:237-246.
- Fuentealba P, Klausberger T, Karayannis T, Suen WY, Huck J, Tomioka R, Rockland K, Capogna M, Studer M, Morales M, Somogyi P (2010) Expression of COUP-TFII nuclear receptor in restricted GABAergic neuronal populations in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 30:1595-1609.
- Fukuda T, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T (1996) Dense GABAergic input on somata of parvalbumin-immunoreactive GABAergic neurons in the hippocampus of the mouse. *Neurosci Res* 26:181-194.
- Fukuda T, Kosaka T (2000) Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J Neurosci* 20:1519-1528.
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305:1258-1264.
- Gaykema RP, van der Kuil J, Hersh LB, Luiten PG (1991) Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 43:349-360.
- Glickfeld LL, Scanziani M (2006) Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat Neurosci* 9:807-815.
- Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37:299-309.
- Gulyás AI, Görös TJ, Freund TF (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* 37:31-44.
- Gulyás AI, Miettinen R, Jacobowitz DM, Freund TF (1992) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience* 48:1-27.

- Gulyás AI, Miles R, Hájos N, Freund TF (1993) Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci* 5:1729-1751.
- Gulyás AI, Hájos N, Freund TF (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16:3397-3411.
- Gulyás AI, Megías M, Emri Z, Freund TF (1999) Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci* 19:10082-10097.
- Gulyás AI, Hájos N, Katona I, Freund TF (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci* 17:1861-1872.
- Gulyás AI, Buzsáki G, Freund TF, Hirase H (2006) Populations of hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *Eur J Neurosci* 23:2581-2594.
- Haglund L, Swanson LW, Köhler C (1984) The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J Comp Neurol* 229:171-185.
- Halasy K, Somogyi P (1993) Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:411-429.
- Hampson DR, Theriault E, Huang XP, Kristensen P, Pickering DS, Franck JE, Mulvihill ER (1994) Characterization of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 60:325-336.
- Han ZS, Buhl EH, Lörinczi Z, Somogyi P (1993) A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:395-410.
- Hangya B, Borhegyi Z, Szilágyi N, Freund TF, Varga V (2009) GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci* 29:8094-8102.

- Henderson Z, Fiddler G, Saha S, Boros A, Halasy K (2004) A parvalbumin-containing, axosomatic synaptic network in the rat medial septum: relevance to rhythmogenesis. *Eur J Neurosci* 19:2753-2768.
- Henderson Z, Lu CB, Janzsó G, Matto N, McKinley CE, Yanagawa Y, Halasy K (2010) Distribution and role of Kv3.1b in neurons in the medial septum diagonal band complex. *Neuroscience* 166:952-969.
- Henriksen EJ, Colgin LL, Barnes CA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2010) Spatial representation along the proximodistal axis of CA1. *Neuron* 68:127-137.
- Henze DA, Wittner L, Buzsáki G (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci* 5:790-795.
- Hodgson AJ, Penke B, Erdei A, Chubb IW, Somogyi P (1985) Antisera to gamma-aminobutyric acid. I. Production and characterization using a new model system. *J Histochem Cytochem* 33:229-239.
- Hsu M, Buzsáki G (1993) Vulnerability of mossy fiber targets in the rat hippocampus to forebrain ischemia. *J Neurosci* 13:3964-3979.
- Huh CY, Goutagny R, Williams S (2010) Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm. *J Neurosci* 30:15951-15961.
- Huxter J, Burgess N, O'Keefe J (2003) Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 425:828-832.
- Hájos N, Papp EC, Acsády L, Levey AI, Freund TF (1998) Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* 82:355-376.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580-623.
- Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N (2008) Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506:535-547.
- Jensen MS, Azouz R, Yaari Y (1996) Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 492 (Pt 1):199-210.

- Jiang X, Johnson RR, Burkhalter A (1993) Visualization of dendritic morphology of cortical projection neurons by retrograde axonal tracing. *J Neurosci Methods* 50:45-60.
- Jinno S (2009) Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front Neuroanat* 3:13.
- Jinno S, Kosaka T (2002) Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. *Brain Res* 945:219-231.
- Jinno S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsáki G, Somogyi P (2007) Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J Neurosci* 27:8790-8804.
- Johansen FF, Zimmer J, Diemer NH (1987) Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss. *Acta Neuropathol* 73:110-114.
- Karnam HB, Zhou JL, Huang LT, Zhao Q, Shatskikh T, Holmes GL (2009) Early life seizures cause long-standing impairment of the hippocampal map. *Exp Neurol* 217:378-387.
- Katona I, Acsády L, Freund TF (1999) Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience* 88:37-55.
- Kawaguchi Y, Hama K (1987) Fast-spiking non-pyramidal cells in the hippocampal CA3 region, dentate gyrus and subiculum of rats. *Brain Res* 425:351-355.
- Khazipov R, Congar P, Ben-Ari Y (1995) Hippocampal CA1 lacunosum-moleculare interneurons: modulation of monosynaptic GABAergic IPSCs by presynaptic GABAB receptors. *J Neurophysiol* 74:2126-2137.
- Kirov SA, Sorra KE, Harris KM (1999) Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *J Neurosci* 19:2876-2886.
- Kirov SA, Petrak LJ, Fiala JC, Harris KM (2004) Dendritic spines disappear with chilling but proliferate excessively upon rewarming of mature hippocampus. *Neuroscience* 127:69-80.
- Kiss J, Patel AJ, Baimbridge KG, Freund TF (1990) Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience* 36:61-72.

- Kiss J, Buzsáki G, Morrow JS, Glantz SB, Leranth C (1996) Entorhinal cortical innervation of parvalbumin-containing neurons (Basket and Chandelier cells) in the rat Ammon's horn. *Hippocampus* 6:239-246.
- Kiss J, Maglóczy Z, Somogyi J, Freund TF (1997) Distribution of calretinin-containing neurons relative to other neurochemically identified cell types in the medial septum of the rat. *Neuroscience* 78:399-410.
- Kiss J, Csáki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranth C (2000) The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [³H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* 97:657-669.
- Klausberger T (2009) GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur J Neurosci* 30:947-957.
- Klausberger T, Magill PJ, Márton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsáki G, Somogyi P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844-848.
- Klausberger T, Márton 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, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-57.
- Knowles WD, Schwartzkroin PA (1981a) Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J Neurosci* 1:318-322.
- Knowles WD, Schwartzkroin PA (1981b) Axonal ramifications of hippocampal Ca1 pyramidal cells. *J Neurosci* 1:1236-1241.
- Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K (1985) GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 239:420-430.
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987) GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419:119-130.

- Köhler C, Chan-Palay V, Wu JY (1984) Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat Embryol (Berl)* 169:41-44.
- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1987) Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7:1979-1993.
- Lang U, Frotscher M (1990) Postnatal development of nonpyramidal neurons in the rat hippocampus (areas CA1 and CA3): a combined Golgi/electron microscope study. *Anat Embryol (Berl)* 181:533-545.
- Leranth C, Deller T, Buzsáki G (1992) Intraseptal connections redefined: lack of a lateral septum to medial septum path. *Brain Res* 583:1-11.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* 315:961-966.
- Lewis PR, Shute CC (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90:521-540.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339:181-208.
- Linke R, Frotscher M (1993) Development of the rat septohippocampal projection: tracing with DiI and electron microscopy of identified growth cones. *J Comp Neurol* 332:69-88.
- Linke R, Pabst T, Frotscher M (1995) Development of the hippocamposeptal projection in the rat. *J Comp Neurol* 351:602-616.
- Lorente de No, R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46, 113-177.
- Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK (1992) Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* 12:4846-4853.
- Maccaferri G (2005) Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *J Physiol* 562:73-80.

- Maccaferri G, McBain CJ (1995) Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:137-145.
- Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 524 Pt 1:91-116.
- Maglóczy Z, Freund TF (1995) Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience* 66:847-860.
- Maglóczy Z, Acsády L, Freund TF (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 4:322-334.
- Manseau F, Goutagny R, Danik M, Williams S (2008) The hippocamptoseptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro. *J Neurosci* 28:4096-4107.
- Martin LJ, Blackstone CD, Hugarir RL, Price DL (1992) Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 9:259-270.
- Martina M, Vida I, Jonas P (2000) Distal initiation and active propagation of action potentials in interneuron dendrites. *Science* 287:295-300.
- Martínez A, Ruiz M, Soriano E (1999) Spiny calretinin-immunoreactive neurons in the hilus and CA3 region of the rat hippocampus: local axon circuits, synaptic connections, and glutamic acid decarboxylase 65/67 mRNA expression. *J Comp Neurol* 404:438-448.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP (1995) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci* 15:3990-4004.
- Mátyás F, Freund TF, Gulyás AI (2004) Convergence of excitatory and inhibitory inputs onto CCK-containing basket cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19:1243-1256.

- Maurer AP, Cowen SL, Burke SN, Barnes CA, McNaughton BL (2006) Phase precession in hippocampal interneurons showing strong functional coupling to individual pyramidal cells. *J Neurosci* 26:13485-13492.
- McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14:4433-4445.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (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. *Psychol Rev* 102:419-457.
- McKenna JT, Vertes RP (2001) Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res Bull* 54:619-630.
- Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527-540.
- Miettinen R, Freund TF (1992a) Convergence and segregation of septal and median raphe inputs onto different subsets of hippocampal inhibitory interneurons. *Brain Res* 594:263-272.
- Miettinen R, Freund TF (1992b) Neuropeptide Y-containing interneurons in the hippocampus receive synaptic input from median raphe and GABAergic septal afferents. *Neuropeptides* 22:185-193.
- Mitchell J, Gatherer M, Sundstrom LE (1995) Loss of hilar somatostatin neurons following tetanus toxin-induced seizures. *Acta Neuropathol* 89:425-430.
- Miyashita T, Rockland KS (2007) GABAergic projections from the hippocampus to the retrosplenial cortex in the rat. *Eur J Neurosci* 26:1193-1204.
- Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Buzsáki G (2009) Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 64:267-280.
- Mizuseki K, Diba K, Pastalkova E, Buzsáki G (2011) Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat Neurosci* 14:1174-1181.

- Murray EA, Mishkin M (1984) Severe tactual as well as visual memory deficits follow combined removal of the amygdala and hippocampus in monkeys. *J Neurosci* 4:2565-2580.
- Naber PA, Witter MP, Lopez da Silva FH (1999) Perirhinal cortex input to the hippocampus in the rat: evidence for parallel pathways, both direct and indirect. A combined physiological and anatomical study. *Eur J Neurosci* 11:4119-4133.
- Nakashiba T, Young JZ, McHugh TJ, Buhl DL, Tonegawa S (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* 319:1260-1264.
- Naumann T, Linke R, Frotscher M (1992) Fine structure of rat septohippocampal neurons: I. Identification of septohippocampal projection neurons by retrograde tracing combined with electron microscopic immunocytochemistry and intracellular staining. *J Comp Neurol* 325:207-218.
- Naus CC, Morrison JH, Bloom FE (1988) Development of somatostatin-containing neurons and fibers in the rat hippocampus. *Brain Res* 468:113-121.
- Nyakas C, Luiten PG, Spencer DG, Traber J (1987) Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull* 18:533-545.
- O'Keefe J., Nadel L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford, England, Clarendon Press.
- O'Keefe J, Recce ML (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3:317-330.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM (1968) The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193-201.
- Paré D, Llinás R (1995) Intracellular study of direct entorhinal inputs to field CA1 in the isolated guinea pig brain in vitro. *Hippocampus* 5:115-119.
- Pawelzik H, Hughes DI, Thomson AM (2002) Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 443:346-367.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press

- Pikkarainen M, Rönkkö S, Savander V, Insausti R, Pitkänen A (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* 403:229-260.
- Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113-136.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163.
- Pouille F, Marin-Burgin A, Adesnik H, Atallah BV, Scanziani M (2009) Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nat Neurosci* 12:1577-1585.
- Price CJ, Cauli B, Kovacs ER, Kulik A, Lambolez B, Shigemoto R, Capogna M (2005) Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 25:6775-6786.
- Ramon y Cajal, S. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine, Paris.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG (2000) Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103:23-37.
- Risold, P. Y. (2004). The septal region. In: Paxinos, G. (szerk.) *The Rat Nervous System*, 3. kiadás, Elsevier Academic Press, San Diego, 605–632.
- Rocamora N, Pascual M, Acsády L, de Lecea L, Freund TF, Soriano E (1996) Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway. *J Neurosci* 16:3991-4004.
- Sandler R, Smith AD (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 303:177-192.
- Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, McNaughton BL, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2006) Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science* 312:758-762.
- Schaffer, K. (1892) Beitrag zur histologie der Amnionshornformation. *Arch Mikrosk Anat* 39:611-632.

- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Senior TJ, Huxter JR, Allen K, O'Neill J, Csicsvari J (2008) Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurosci* 28:2274-2286.
- Seress L, Ribak CE (1985) A combined Golgi-electron microscopic study of non-pyramidal neurons in the CA 1 area of the hippocampus. *J Neurocytol* 14:717-730.
- Shi L, Argenta AE, Winseck AK, Brunso-Bechtold JK (2004) Stereological quantification of GAD-67-immunoreactive neurons and boutons in the hippocampus of middle-aged and old Fischer 344 x Brown Norway rats. *J Comp Neurol* 478:282-291.
- Schousboe I, Bro B, Schousboe A (1977) Intramitochondrial localization of the 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase from ox brain. *Biochem J* 162:303-307.
- Sik A, Tamamaki N, Freund TF (1993) Complete axon arborization of a single CA3 pyramidal cell in the rat hippocampus, and its relationship with postsynaptic parvalbumin-containing interneurons. *Eur J Neurosci* 5:1719-1728.
- Sik A, Ylinen A, Penttonen M, Buzsáki G (1994) Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science* 265:1722-1724.
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsáki G (1995) Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 15:6651-6665.
- Siklós L, Kuhnt U, Párducz A, Szerdahelyi P (1997) Intracellular calcium redistribution accompanies changes in total tissue Na⁺, K⁺ and water during the first two hours of in vitro incubation of hippocampal slices. *Neuroscience* 79:1013-1022.
- Simon AP, Poindessous-Jazat F, Dutar P, Epelbaum J, Bassant MH (2006) Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats. *J Neurosci* 26:9038-9046.
- Slomianka L, Amrein I, Knuesel I, Sørensen JC, Wolfer DP (2011) Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct Funct*.
- Sloviter RS (1987) Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235:73-76.

- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373:593-618.
- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD, Menkens KA (2001) Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J Comp Neurol* 430:283-305.
- Soltész I (1995) Brief history of cortico-hippocampal time with a special reference to the direct entorhinal input to CA1. *Hippocampus* 5:120-124.
- Somogyi P (1977) A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 136:345-350.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A (1982) The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7:2577-2607.
- Somogyi P, Takagi H (1982) A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 7:1779-1783.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD (1983) A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259:137-142.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Chubb IW, Penke B, Erdei A (1985) Antisera to gamma-aminobutyric acid. II. Immunocytochemical application to the central nervous system. *J Histochem Cytochem* 33:240-248.
- Somogyi P, Hodgson AJ (1985) Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J Histochem Cytochem* 33:249-257.
- Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9-26.

- Somogyi, P. (2010) Hippocampus: Intrinsic Organization. In: Gordon M. Shepherd és Sten Grillner (szerk.) Handbook of Brain Microcircuits, Oxford University Press, Oxford, 2010: 148-164.
- Soriano E, Frotscher M (1993) Spiny nonpyramidal neurons in the CA3 region of the rat hippocampus are glutamate-like immunoreactive and receive convergent mossy fiber input. *J Comp Neurol* 333:435-448.
- Soriano E, Cobas A, Fairén A (1986) Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. *Brain Res* 395:88-92.
- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 551:927-943.
- Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17:190-203.
- Sperk G, Marksteiner J, Gruber B, Bellmann R, Mahata M, Ortler M (1992) Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat. *Neuroscience* 50:831-846.
- Spruston N, Lübke J, Frotscher M (1997) Interneurons in the stratum lucidum of the rat hippocampus: an anatomical and electrophysiological characterization. *J Comp Neurol* 385:427-440.
- Stanfield BB, Cowan WM (1984) An EM autoradiographic study of the hypothalamo-hippocampal projection. *Brain Res* 309:299-307.
- Stanley DP, Shetty AK (2004) Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration. *J Neurochem* 89:204-216.
- Sterio DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134:127-136.
- Steward O (1976) Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 167:285-314.
- Steward O, Scoville SA (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169:347-370.

- Sundstrom LE, Brana C, Gatherer M, Mepham J, Rougier A (2001) Somatostatin- and neuropeptide Y-synthesizing neurones in the fascia dentata of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain* 124:688-697.
- Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172:49-84.
- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311:233-235.
- Szabadics J, Soltesz I (2009) Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *J Neurosci* 29:4239-4251.
- Tamamaki N, Nojyo Y (1990) Disposition of the slab-like modules formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 291:509-519.
- Tamamaki N, Abe K, Nojyo Y (1987) Columnar organization in the subiculum formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 412:156-160.
- Totterdell S, Hayes L (1987) Non-pyramidal hippocampal projection neurons: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 16:477-485.
- Tóth K, Freund TF (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49:793-805.
- Tóth K, Borhegyi Z, Freund TF (1993) Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci* 13:3712-3724.
- Tóth K, Freund TF, Miles R (1997) Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J Physiol* 500 (Pt 2):463-474.
- Umbriaco D, Garcia S, Beaulieu C, Descarries L (1995) Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus* 5:605-620.
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272-282.

- van Vliet EA, Aronica E, Tolner EA, Lopes da Silva FH, Gorter JA (2004) Progression of temporal lobe epilepsy in the rat is associated with immunocytochemical changes in inhibitory interneurons in specific regions of the hippocampal formation. *Exp Neurol* 187:367-379.
- Vanderwolf CH, Kramis R, Robinson TE (1977) Hippocampal electrical activity during waking behaviour and sleep: analyses using centrally acting drugs. *Ciba Found Symp*:199-226.
- Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* 326:449-453.
- Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:595-622.
- Vertes RP, Kocsis B (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81:893-926.
- Vida I, Halasy K, Szinyei C, Somogyi P, Buhl EH (1998) Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 506 (Pt 3):755-773.
- Wainer BH, Steininger TL, Roback JD, Burke-Watson MA, Mufson EJ, Kordower J (1993) Ascending cholinergic pathways: functional organization and implications for disease models. *Prog Brain Res* 98:9-30.
- Wang XJ (2002) Pacemaker neurons for the theta rhythm and their synchronization in the septohippocampal reciprocal loop. *J Neurophysiol* 87:889-900.
- Weber K, Rathke PC, Osborn M (1978) Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1820-1824.
- Wenk H, Ritter J, Meyer U (1975) [Histochemistry of cholinergic systems in the CNS. I. Topochemical and quantitative changes in acetylcholinesterase activity in the limbic cortex after septal lesions in the rat (author's transl)]. *Acta Histochem* 53:77-92.
- Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201:160-163.

- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T (2000) Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911:1-24.
- Wittner L, Henze DA, Záborszky L, Buzsáki G (2006) Hippocampal CA3 pyramidal cells selectively innervate aspiny interneurons. *Eur J Neurosci* 24:1286-1298.
- Wittner L, Henze DA, Záborszky L, Buzsáki G (2007) Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Struct Funct* 212:75-83.
- Wolf E, Birinyi A, Pomahazi S (1995) A fast 3-dimensional neuronal tree reconstruction system that uses cubic polynomials to estimate dendritic curvature. *J Neurosci Methods* 63:137-145.
- Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y (1989) Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 280:254-271.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179-203.
- Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM (1979) Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)* 156:165-176.
- Yanovsky Y, Sergeeva OA, Freund TF, Haas HL (1997) Activation of interneurons at the stratum oriens/alveus border suppresses excitatory transmission to apical dendrites in the CA1 area of the mouse hippocampus. *Neuroscience* 77:87-96.
- Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I, Sik A, Buzsáki G (1995) Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* 15:30-46.
- Zappone CA, Sloviter RS (2001) Commissurally projecting inhibitory interneurons of the rat hippocampal dentate gyrus: a colocalization study of neuronal markers and the retrograde tracer Fluoro-gold. *J Comp Neurol* 441:324-344.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Takács VT, Freund TF, Gulyás AI. 2008. Types and synaptic connections of hippocampal inhibitory neurons reciprocally connected with the medial septum. *European Journal of Neuroscience* 28(1):148-64.

Takács VT, Klausberger T, Somogyi P, Freund TF, Gulyás AI. 2012. Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons.

Hippocampus, in press. DOI 10.1002/hipo.20974.

Az értekezés témájától független publikációk:

Marchionni I, Takács VT, Nunzi MG, Mugnaini E, Miller RJ, Maccafè G. 2010. Distinctive properties of CXC chemokine receptor 4-expressing Cajal-Retzius cells versus GABAergic interneurons of the postnatal hippocampus. *Journal of Physiology* 588(Pt 15):2859-78.

Dobó E, Takács VT, Gulyás AI, Nyiri G, Mihály A, Freund TF. 2011. New silver-gold intensification method of diaminobenzidine for double-labeling immunoelectron microscopy.

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 59(3):258-69.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Gulyás Attilának mondok köszönetet, hogy tudományos diákkörös-, majd PhD hallgató éveim alatt vezette és segítette munkámat, és megismertetett a tudományos kutatás alapjaival.

Köszönöm Prof. Freund Tamásnak, hogy lehetővé tette, hogy az általa vezetett Agykéreg Kutatócsoportban dolgozhassak, és hogy tanácsaival mindig támogatott munkám során.

Prof. Somogyi Péternek hálásan köszönöm, hogy részt vehettem a csoportja által megkezdett munkában, hogy az együttműködés alatt oxfordi laborjában több hetet is eltölthettem, és hogy minden felmerülő kérdésben türelmesen segített a kutatómunka és a cikkírás során. A kollaboráció során végzett értékes munkájukért köszönetet mondok Dr. Thomas Klausbergernek, Dr. Txema Sanznak, a néhai Dr. Eberhard Buhlnak, Dr. Catherine Bleasdale-nek, Dr. John Tukkernek, Kristina Detznernek és David Robertsnek. Dr. Yannis Daleziosnak a statisztikai analízisben nyújtott segítségét köszönöm.

Goda Gyözőnek, Iványi Katalinnak, Lengyel Katalinnak és Szépné Simon Emőkének igen értékes asszisztensi és titkárnői segítségükért tartozom hálás köszönettel.

A Celluláris-, és Hálózat Neurobiológiai Osztály összes mostani-, és korábbi tagjának köszönetet mondok szakmai segítségükért, valamint az általuk teremtett inspiráló légkörért. A dolgozat alapját képező közlemények létrejöttében különösen sokat segítettek Dr. Mátyás Ferenc, Dr. Nyíri Gábor és Dr. Papp Edit szakmai tanácsai. Dr. Bokor Hajnalkának köszönöm, hogy házi védésem opponenseként hasznos kritikai megjegyzéseivel segített az értekezés javításában.

Köszönöm Dr. Gianmaria Maccaferrinek, hogy tanulmányaim során egy évet ösztöndíjasként eltölthettem a laboratóriumában, és a Rosztóczy Alapítványnak, hogy ehhez anyagi támogatást nyújtott.

Végül, de nem utolsósorban megköszönöm családomnak, elsősorban szüleimnek dr. Farkas Ildikónak és Takács Andrásnak, valamint férjemnek, Tresó Bálintnak, hogy mindig támogatnak és mellettem állnak.