DOI:10.14753/SE.2017.1961

Ketamin-xylazin indukálta talamokortikális lassú hullámú aktivitás in vivo elektrofiziológiai vizsgálata patkányban

Doktori értekezés

Fiáth Richárd Balázs

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Konzulens: Dr. Ulbert István, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bódizs Róbert, dr. habil., tudományos főmunkatárs
Dr. Détári László, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kamondi Anita, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Arányi Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Czurkó András, Ph.D., tud. főmunkatárs

Budapest
2016

DOI:10.14753/SE.2017.1961

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK 2

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

3. BEVEZETÉS 7

3.1 AZ AGYKÉREG 10

3.1.1 Az agykéreg makroszkópikus struktúrája és felosztása 10

3.1.2 Az agykéregben található sejttípusok morfológiai és elektrofiziológiai tulajdonságai 11

3.1.2.1 Gliasejtek 11

3.1.2.2 Az agykérgi neuronok csoportosításának szempontjai 12

3.1.2.3 Neokortikális piramissejtek 14

3.1.2.4 Csillagpiramis sejtek 15

3.1.2.5 Csillagsejtek 15

3.1.3 Az agykéreg réteges szerkezete 17

3.1.4 Az agykéreg moduláris szerkezete 20

3.1.5 Az agykéreg kapcsolatrendszere 21

3.1.6 A kitüntetett tulajdonságokkal rendelkező V. réteg 22

3.1.7 A szomatoszenzoros kéreg 24

3.1.7.1 A szomatoszenzoros kéreg bemenetei – szomatoszenzoros afferensek 25

3.1.7.2 A szomatoszenzoros kéreg kimenetei – szomatoszenzoros efferensek 26

3.1.7.3 Kortikokortikális kapcsolatok 27

3.2 ALVÁS 28

3.2.1 Az alvás szerepe 28

3.2.2 Az alvás makro- és mikrostruktúrája 31

3.2.3 Alvás és ébrenléti központok az agyban 35

3.2.4 Lokális alvás 37

3.2.5 A lassú hullámú alvás alatt kialakuló lassú oszcilláció 38

3.2.5.1 A lassú oszcilláció lamináris generátorai 41

3.2.5.2 A lassú oszcilláció keletkezési mechanizmusa 43

3.2.5.3 A lassú oszcilláció szerepe a memóriakonszolidációban 44

3.2.6 A ketamin-xylazin által indukált lassú ritmus 46

4. CÉLKITŰZÉSEK 49

5. MÓDSZEREK 51

5.1 MŰTÉT ÉS ALTATÁS 51

5.2 ELEKTRÓDÁK ÉS ELEKTROFIZIOLÓGIAI ELVEZETÉSEK 53

5.3 SZOMATOSZENZOROS INGERLÉS 57
5.4 HISZTOLÓGIA 58
5.5 ADATFELDOLGOZÁS 61
5.5.1 A lassú oszcilláció fázisainak detektálása 61
5.5.2 Áramforrás-sűrűség és lokális mezőpotenciál grádiens analízis 65
5.5.3 A különböző kérgi rétegekben induló aktív fázisok detektálása 66
5.5.4 Idő-frekvencia analízis 67
5.5.5 Szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott up-state-ek elemzése 67
5.6 STATISZTIKAI ELEMZÉS 68

6. EREDMÉNYEK 69

6.1 PATKÁNY SZOMATOSZENZOROS AGYKÉRGÉBŐL ELVEZETETT, KETAMIN-XYLAZIN ÁLTAL INDUKÁLT SPONTÁN LASSÚ HULLÁMÚ AKTIVITÁS FÁZISAINAK IDŐTARTAM SZERINTI ELOSZLÁSA 69
6.2 A VIZSGÁLT SZOMATOSZENZOROS AGYKÉRGI TERÜLETEK RÉTEGEINEK VASTAGSÁGA 71
6.3 A KETAMIN-XYLAZIN ÁLTAL INDUKÁLT SPONTÁN LASSÚ HULLÁMÚ AKTIVITÁS SPEKTRÁLIS TULAJDONSÁGAI 73
6.4 A LASSÚ HULLÁMÚ AKTIVITÁS SZOMATOSZENZOROS KÉRGI RÉTEGEK KÖZÖTTI KORRELÁCIÓJA ÉS KOHERENCIÁJA 75
6.5 A SPONTÁN KIALAKULÓ AKTÍV FÁZISOK LAMINÁRIS MÉLYSÉGI PROFILJA A SZOMATOSZENZOROS KÉREGBEN 76
6.6 A RÖVID ÉS HOSSZÚ SPONTÁN AKTÍV FÁZISOK LAMINÁRIS MÉLYSÉGI PROFILJA A SZOMATOSZENZOROS KÉREGBEN 85
6.7 A SPONTÁN KIALAKULÓ DOWN-STATE-EK RÉTEGELEMZÉSE A SZOMATOSZENZOROS KÉREGBEN 89
6.8 A SZOMATOSZENZOROS INGERLÉSSEL KIVÁLTOTT UP-STATE-EK RÉTEGELEMZÉSE 91
6.9 AZ UP-STATE-EK ALATTI SEJTAKTIVITÁS AGYKÉRGI RÉTEGEK KÖZÖTTI INDULÁSÁNAK VIZSGÁLATA 96

7. MEGBESZÉLÉS 103

7.1 A LASSÚ HULLÁMÚ AKTIVITÁS TULAJDONSÁGAINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA PATKÁNYBAN ÉS EMBERBEN 104
7.2 A LASSÚ HULLÁMÚ AKTIVITÁS RÉTEGELEMZÉSE ÁLLATMODELLEKBEN 110
7.3 AZ V. RÉTEG KITÜNTETETT SZEREPE ÁLLATOKBAN A LASSÚ OSZCILLÁCIÓ AKTÍV FÁZISA ALATT 113
7.4 A TALAMUSZ KÖZREMŰKÖDÉSE A KÉRGI LASSÚ OSZCILLÁCIÓBAN 114
7.5 A KÍSÉRLET KORLÁTJAI 115

8. KÖVETKEZTETÉSEK 117

9. ÖSSZEFOGLALÁS 118

10. SUMMARY 119

11. IRODALOMJEGYZÉK 120

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 147

12.1 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁT ADÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK 147
12.2 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK 147

DOI:10.14753/SE.2017.1961

13. **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 148**

DOI:10.14753/SE.2017.1961

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AASM	American Academy of Sleep Medicine
AMPA	α-amino-3-hydroxi-5-metil-4-izoxazol-propánsav
ARAS	ascending reticular activating system, felszálló retikuláris aktiváló rendszer
CAP	cyclic alternating pattern, ciklikusan váltakozó mintázat
CSD	current source density, áramforrás-sűrűség
DR	dorsal raphe
GABA	γ -aminobutyric acid, γ-amino-vajsav
EEG	elektroenkefalográf/elektroenkefalogram
EPSP	excitatory postsynaptic potential, serkentő posztszinaptikus potenciál
FFT	Fast Fourier Transform, gyors Fourier transzformáció
FRB	fast rhythmic bursting; gyors, ritmikus burst tüzelő
FS	fast spiking, gyorsan tüzelő
GRD	field potentiel gradient, mezőpotenciál grádiens
IB	intrinsic bursting, burst tüzelő
IL-1	interleukin-1
LC	locus coeruleus
LDT	laterodorsal tegmental nucleus
LFP	local field potential, lokális mezőpotenciál
M1	elsődleges motoros kéreg
MUA	multiple-unit activity, soksejt-aktivitás
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NREM	non-rapid eye movement, gyors szemmozgás nélküli
nRt	nucleus reticularis thalami, retikuláris talamikus mag
PB	phosphate buffer, foszfát puffer
PGO	ponto-genikulo-okcipitális
Po	posterior thalamic nucleus, poszterior talamikus mag
PPT	pedunculopontine tegmental nucleus
REM	rapid eye movement, gyors szemmozgás
RS	regular spiking, szabályosan tüzelő
S1	elsődleges szomatoszenzoros kéreg

S2	másodlagos szomatoszenzoros kéreg
S1Tr	elsődleges szomatoszenzoros kéreg törzsi régiója
S1HL	elsődleges szomatoszenzoros kéreg hátsó lábhoz tartozó régiója
SCSS	sima csillagsejt
SD	standard deviation, szórás
SO	slow oscillation, lassú oszcilláció
SPW-R	sharp-wave ripple, éleshullám fodor
SWA	slow-wave activity, lassú hullámú aktivitás
SWS	slow-wave sleep, lassú hullámú alvás
TC	thalamocortical, talamokortikális
TCSS	tüskés csillagsejt
TMS	transzkraniális mágneses ingerlés
TNF	tumor-nekrózis faktor
VB	ventrobazális talamikus komplex
VL	ventrolaterális talamikus mag
VM	ventromediális talamikus mag
VLPO	ventrolaterális preoptikus área
VPL	ventrális poszterolaterális talamikus mag

DOI:10.14753/SE.2017.1961

3. BEVEZETÉS

Az alvás az ember legalapvetőbb fiziológiai szükségletei közé tartozik. Életünk mintegy harmadát töltjük ebben a módosult tudatállapotban, mely során jelentős mértékben megváltoznak szervezetünk különböző fiziológiás mutatói az ébrenléti állapothoz képest. A leglátványosabb változások talán az agyunkban zajlanak. Elalváskor az éber, figyelő egyénre jellemző gyors (30-40 Hz) agyi ritmusokat fokozatosan felváltják az egyre lassuló hullámok. A legmélyebb alvási fázisban az agyban található neuronok jelentős hányada már 1 Hz alatti membránpotenciál-oszcillációt mutat, mely során rövid, néhány száz milliszekundum hosszú, szinaptikus és sejtaktivitásban gazdag periódusok váltakoznak körülbelül ugyanilyen hosszúságú aktivitásmentes szakaszokkal.

Már az ókori filozófusokat is érdekelte az alvás jelensége, azonban a modern alváskutatás és az igazi tudományos áttörések csak a XX. század közepe táján kezdődtek, miután kifejlesztették az agyi elektromos tevékenység regisztrálásra alkalmas készüléket, az elektroenkefalográfot (EEG). Azóta feltárták többek között az alvás különböző fázisait - a paradox alvást és a lassú hullámú alvást -, az alvás cirkadián és homeosztatikus szabályozásának folyamatait, valamint nagyszámú, az alvás-ébrenléti egyensúly fenntartásáért felelős agyi központot fedeztek fel. Az alvással kapcsolatban felhalmozódott rengeteg tudásunk ellenére azonban az alvás szerepe a mai napig sem tisztázott teljes mértékben és a különféle patológiás alvásmintázatok, az ún. alvászavarok kialakulásáért felelős folyamatokat is csak mostanában kezdjük részleteiben megérteni.

A doktori munkám során a természetes lassú hullámú alvásban (slow-wave sleep, SWS) és bizonyos altatószerek hatására kialakuló lassú hullámú aktivitást (slow-wave activity, SWA) vizsgáltam patkányok agykérgében. Definíció szerint az SWA az alvási EEG 0.5-4 Hz-es frekvenciatartományának a teljesítményét jelenti, amibe beletartoznak a delta hullámok (1-4 Hz) és az 1 Hz alatti lassú hullámok is. Az értekezésben a ’Bevezetés’ fejezet kivételével az SWA kifejezést az eredeti definíciója helyett az 1 Hz körüli frekvenciájú lassú hullámokra értelmezem, mellőzve a definícióból a gyorsabb delta ritmust, valamint nem teljesítményt, hanem oszcillációt, ritmust fogok érteni alatta. Egy másik, hasonló fogalmat - a lassú oszcillációt - a szakirodalom a lassú hullámokat létrehozó sejtszintű membránpotenciál-fluktuációra is alkalmazza. Ebben az értekezésben viszont (a ’Bevezetés’ fejezet kivételével) a lassú hullámú aktivitás, a lassú

ritmus, a lassú hullámok és a lassú oszcilláció szinonim fogalmak lesznek, mindegyik az alvás vagy altatás alatt regisztrálható, nagy amplitúdójú, alacsony (~ 1Hz) frekvenciájú szinkronizált aktivitást fogja jelenteni. Az SWA-nak két jellemző fázisa van, melyek megnevezésére az eredeti, angol nyelvű terminusokat ('up-state', illetve 'down-state'), vagy pedig magyar nyelvű megfelelőjüket fogom használni ('aktív fázis', illetve 'inaktív fázis').

Az SWA-nak többek között jelentős szerepet tulajdonítanak a memóriakonszolidációban és szinaptikus plaszticitási folyamatokban, valamint bizonyos alvászavarok is ebben a fázisban alakulnak ki, mint például az alvajárás (szomnambulizmus), vagy az éjszakai felrettenések (pavor nocturnus).

Szabadon mozgó patkányokban a természetes lassú hullámú alvás és az SWA vizsgálatát nehezíti, hogy ezek az állatok rövid, néhány perces ciklusokban alszanak és az alvási fázisok közötti átmenetek is dinamikusan váltakoznak. Szerencsére több olyan altató is létezik, mely képes a természetes SWS-ez hasonló állapotot indukálni. Ez a szabályos és ritmikus lassú oszcilláció az anesztetikumok megfelelő dózisban történő folyamatos adagolása mellett stabilan, órákon keresztül fenntartható. Ezért az ezek által az anyagok (ketamin, uretán stb.) által keltett lassú hullámokat az alváskutatásban bevett módon használják a természetes lassú hullámok modelljeként annak vizsgálatára.

Az utóbbi években összegyűlt tudományos bizonyítékok alapján a lassú hullám aktivitás az agykéregben keletkezik, azonban több agyi struktúra (pl. talamusz) is fontos szerepet játszhat az SWA szabályozásában. A képet tovább árnyalja, hogy az SWA komplex téridőbeli dinamikát mutat, vagyis az agykéregben kialakuló oszcilláció terjed mind horizontálisan a különböző kérgi területek között, mind pedig vertikálisan a kortikális rétegek között. Az eddigi megfigyelések alapján a különböző kérgi rétegekben található neuronok más mértékben és más szerepben vehetnek részt az SWA genezisében és szabályozásában, ezért az agykérgi lassú hullámok alatti neuronális aktivitás rétegelemzéses vizsgálata új és jelentős folyamatokat fedhet fel.

A doktori tanulmányaim során ketamin-xylazinnal altatott patkányok agykérgéből regisztrálható lassú hullámú aktivitást vizsgáltam elektrofiziológiai módszerekkel. Az agyi elektromos jelek elemzése során a különböző agykérgi rétegeknek a lassú ritmusban betöltött szerepét vettem szemügyre, melyet szövettani vizsgálatokkal is igyekeztem alátámasztani. A sejtaktivitás elemzésével megvizsgáltam, hogy mely kortikális

DOI:10.14753/SE.2017.1961

rétegekből indulhatnak el a lassú hullámok spontán kialakuló vagy szomatoszenzoros ingerekkel kiváltott ciklusai, valamint tanulmányoztam a spontán kialakuló és a szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott lassú hullámok közötti különbségeket, illetve hasonlóságokat is.

3.1 Az agykéreg

3.1.1 Az agykéreg makroszkópikus struktúrája és felosztása

Az agykéreg (cortex cerebri) a nagyagy (cerebrum) legnagyobb hányadát kitevő része. Ez a rétegzett struktúra, mely kívülről borítja a bal és a jobb agyféltekéket, az agy filogenetikailag legfiatalabb része és az emberben, valamint az emberszabású majmokban éri el maximális komplexitását. Az agykéreg olyan magasabb rendű agyi folyamatokban játszik kulcsszerepet, mint például az emlékezés, figyelem, beszéd, tanulás vagy a tudatosság. Általánosságban véve hat fő rétegből épül fel (hexalamináris architektúra), melyek sejtes összetétele, kapcsolatai területspecifikusan változnak. Az emberi agykéreg felülete kb. 220.000 mm^2, a szürkeállomány térfogata 560 cm^3, súlya pedig kb. 580 g. Ez utóbbi érték az agy összsúlyának nagyjából 40%-a, amiből a neuronok kb. 180 grammot tesznek ki, a gliasejtek és vererek súlya pedig a maradék 400 grammot (Economo és Koskinas 1925; Economo és Triarhou 2009).

A kortexet körülbelül 14-16 milliárd idegsejt alkotja (Azevedo és mtsai 2009; Economo és Triarhou 2009), és minden egyes neuron akár több tízezer másikkal alakíthat ki kapcsolatot. Az agykéreg filogenetikailag legfiatalabb része a neokortex, legősibb része pedig az allokortex, mely a háromrétegű archikortexből (hippokampusz, gyrus dentatus) és a hatrétegű paleokortexből (parahippokampális gyrus, szaglókéreg) épül fel. Az agykéreg minden területén ugyanazok a fő sejttípusok és hasonló sejtek közötti kapcsolatok figyelhetőek meg. A sejteknek és kapcsolataiknak az eloszlása is hasonló a különböző kérgi területek között.

Mivel az evolúció során az agykéreg sokkal gyorsabban nőtt a koponyánál, ezért kialakult a jól ismert tekervényes szerkezet. Ennek a tekervényes elrendeződésnek köszönhetően a kortex sokkal nagyobb felület kialakítására képes a koponya által behatárolt területen belül. Természetesen a kéreg redőkbe gyűrődésére nemcsak mechanikai szükség volt, hanem funkcionális előnyei is vannak. Ezáltal a különböző kérgi területeket összekötő rostok (fehérállomány) hossza, így az agy térfogata is, sokkal kisebb, mintha az agykéreg sima felületű lenne. A kortexen található mély árkokat hasadékoknak (fissura cerebri), a sekélyebb redőket pedig barázdáknak (sulcus cerebri)

hívják. A két barázda közötti kiboltosodó részeket nevezzük tekervényeknek (gyrus cerebri).

Az agykéreg vastagsága emlősök esetén 0.5 mm-től 4.5 mm-ig terjedhet. Az emberi kortex vastagsága 1.3-4.5 mm között van, átlagosan 2.5 mm vastag. Legvastagabb a szomatomotoros kéregben, míg a vizuális területen vékonyodik el a legnagyobb mértékben (Economo és Triarhou 2009). A kísérleti állatmodellként leggyakrabban használt egér és patkány agykérge az emberénél valamivel vékonyabb (az egéré átlagosan 1.5 mm, a patkányé pedig 1.8-2 mm vastag) és szinte teljesen sima felületű. Az emlősökről általánosságként elmondható, hogy azon fajoknak, melyeknek nagyobb térfogatú az agyuk, az agykérgük is vastagabb (Nieuwenhuys és mtsai 1998). Logaritmikus kapcsolatot találtak az agy súlya és az agykéreg vastagsága között is. Egy másik általános feltevés szerint a kéreg vékonyabb azokban az állatokban, ahol nagyobb a sejtsűrűség (Abeles 1991). Feltételezések szerint az agykéregben elhelyezkedő idegsejtek száma a fajok között nagyjából azonos, vagyis a vastagabb agykéreggel rendelkező elefánt is kb. ugyanannyi kérgi idegsejttel rendelkezik, mint a sokkal kisebb egér, csupán utóbbiban a sejtek sűrűbben helyezkednek el (Rockel és mtsai 1980; Abeles 1991). Nemcsak a fajok között, hanem a különböző agyterületek között is megfigyelhetőek különbségek a sejtdenzitásban. Példaként hozható fel a motoros kéreg, ahol a sejtek egymástól távolabb, ritkásan helyezkednek el, míg a szenzoros kérgi területeken a neuronok sűrűbben, egymáshoz közelebb találhatóak az átlaghoz képest (Abeles 1991).

3.1.2 Az agykéregben található sejttípusok morfológiai és elektrofiziológiai tulajdonságai

3.1.2.1 Gliasejtek

Az agykérgi szövet lényegében kétféle sejttípusból épül fel: idegsejtekből és gliasejtekből. A gliasejtek száma jelentősen meghaladja az agykérgi neuronokét: kb. 60 milliárd gliasejt jut a 14-16 milliárd neuronra (Azevedo és mtsai 2009). Ha csak a szürkeállományt tekintjük, akkor ez a glia-neuron arány már sokkal kisebb lesz. Ennek az az oka, hogy a szürkeállományban már sokkal kevesebb gliasejt (kb. 25 milliárd) helyezkedik el, viszont - a neuronokban szegény fehérállomány miatt - a fentihez hasonló nagyságrendű idegsejt található itt. Az agykéregben a gliasejtek nagy részét a neuronok

axonjára mielinhüvelyt adó oligodendrogliák teszik ki (75,6%), a másik két fő gliatípus, az asztrociták (17,3%) és a mikrogliák (6,5%) jóval kisebb arányban fordulnak itt elő (Pelvig és mtsai 2008). Az idegi folyamatokban a gliasejtekre általában passzív szereplőként tekintünk. Elsősorban a neuronokat támasztó, anyagcseréjüket támogató szerepükről ismertek, valamint mielinburkot adnak az axonokra. Az utóbbi években viszont egyre több kutatás jutott olyan eredményekre, melyek arra utalnak, hogy a gliasejtek is aktívan részt vesznek az idegrendszer működésében. Például hatással lehetnek az agyi fejlődési és növekedési folyamatokra, bizonyos esetekben fehérjét vagy RNS-t cserélhetnek az idegsejtekkel, de akár képesek a neurális funkció modulálására is (Barres 2008).

3.1.2.2 Az agykérgi neuronok csoportosításának szempontjai

Az agykéregben található sejteket nagyfokú diverzitás jellemzi, legalább 20 féle idegsejtet tudunk megkülönböztetni (Peters és Jones 1984; Sugino és mtsai 2006). A kortikális neuronokat több szempont alapján lehet csoportosítani, melyek a sejtek morfológiai, elektrofiziológiai és neurokémiai tulajdonságait veszik figyelembe. A kémiai kommunikációra használt neurotranszmittereik alapján megkülönböztethetjük a glutamátot ürítő serkentő sejteket, valamint a γ-amino-vajsavval (GABA) kommunikáló gátló interneuronokat. Ez az egyszerű felosztás tartalmaz azonban kivételeket, ugyanis léteznek például olyan GABA-t felszabadító interneuronok, melyek hiperpolarizáció helyett depolarizálják a posztszinaptikus sejtek membránpotenciálját, gátlás helyet serkentve azokat (Szabadics és mtsai 2006).

Egy másik klasszifikáció szerint - mely a sejtek közötti alakbeli különbségeket veszi figyelembe - vannak a piramissejtek (Golgi I-es típusú sejtek vagy hosszú axonnal rendelkező neuronok), melyek az asszociációs, komisszurális és projekciós pályák többségének létrehozásáért felelnek, valamint a csillagsejtek, vagy más néven szemcsesejtek (Golgi II-es típusú sejtek, rövid, helyileg elágazó axonnal), melyek lokális hálózatokat alakítanak ki. Egy harmadik felosztás a neuronokon található dendrittüskék sűrűsége alapján csoportosítja a sejteket. A sok dendrittüskével rendelkező neuronok közé tartoznak a piramissejtek és a tüskés csillagsejtek (spiny stellate cell, TCSS), a kevés dendrittüskét tartalmazó sejtek csoportját pedig a sima csillagsejtek (smooth stellate cell, SCSS) alkotják. Előbbi csoport neurotranszmittere a glutamát, vagyis ezek a serkentő sejtek, míg a sima csillagsejtek GABAerg, gátló interneuronok. Az agykéregben a sejtek

kb. 85-90%-a serkentő sejt (75% piramissejt, 10% tüskés csillagsejt), a maradék 10-15% pedig gátló interneuron (Abeles 1991).

Az idegsejteket elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján is csoportokba lehet osztani. Kismértékű depolarizáló áramimpulzusok intracelluláris injektálásával a sejtek különböző tüzelési mintázatokat mutatnak in vitro (Connors és mtsai 1982; Connors és Gutnick 1990) és in vivo körülmények között is (Nunez és mtsai 1993; Steriade és mtsai 2001; Steriade és McCarley 2005). Vannak gyorsan tüzelő (fast spiking, FS), szabályosan tüzelő (regular spiking, RS), burst tüzelő (intrinsic bursting, IB) és gyors, ritmikus burst tüzelést mutató (fast rhythmic bursting, FRB) neuronok (Steriade és mtsai 2001; Steriade 2003). A tüzelés lehet adaptálódó vagy nem adaptálódó. Előbbi esetben a folyamatos ingerlés hatására változik az intracellulárisan ingerelt sejt tüzelési rátája (általában csökken), míg utóbbi esetben az ingerlés nem befolyásolja a tüzelési frekvenciát.

Az FS neuronok rövid akciós potenciálokat (~0.3 ms) tüzelnek, és nagy tüzelési rátát (15-30 Hz) képesek fenntartani (tónikus tüzelés) frekvencia adaptálódás nélkül (Steriade és mtsai 2001). Általában a gátlósejtek mutatnak FS tüzelési mintázatot. Az RS sejtek gyorsan vagy lassan adaptálódó akciós potenciál sorozatokat tüzelnek az ingerlésre. A piramissejtek nagy része RS tüzelési mintázatot mutat. Az IB neuronok küszöbáramokkal ingerelve ún. burst-ökben (gyors egymásutánban jelentkező akciós potenciálok sorozata) tüzelnek, amiket egy relatíve hosszú utóhiperpolarizáció követ a tüzelés megszűnése után. IB tüzelési mintázatot mutató neuronokat minden kérgi rétegben találtak az I. réteg alatt, ezek többnyire olyan sejtek, melyek apikális dendritjei sok dendrittüskét tartalmaznak (Chagnac-Amitai és mtsai 1990; Nishimura és mtsai 1996). Az FRB (vagy ’chattering’) idegsejtek nagy gyakorisággal (30-50 Hz) kialakuló, magasfrekvenciás (300-600 Hz) burst-ökkel reagálnak a depolarizáló áramra. Az FRB neuronok egy része a mély kérgi rétegekben található, más típusai pedig lokális hálózatot alkotó sok vagy kevés dendrittüskét tartalmazó idegsejtek (Steriade 2003).

A sejtek fent bemutatott, tüzelési mintázatok alapján történő klasszifikációját bonyolítja, hogy a fenti négy tüzelési mintázat a membránpotenciál értékének változásával, a modulátoros rendszerek aktivitásának hatására vagy az éberségi szint megváltozásával átalakulhat egy másik csoportra jellemző tüzelési mintázattá (Steriade és McCarley 2005). Például az RS mintázattal tüzelő sejt a depolarizációs áram erejének növelésével átválthat FRB tüzelésre, további áramerősség-növeléssel pedig akár FS

mintázatot is mutathat (Steriade és mtsai 1998; Steriade 2003). Az IB tüzelési mintázat pedig átalakulhat RS tüzeléssé, például modulátoros neurotranszmitterek hatására vagy a membránpotenciál depolarizálódásával (Steriade és mtsai 1993a; Wang és McCormick 1993).

3.1.2.3 Neokortikális piramissejtek

A piramissejt a legismertebb és legkönnyebben felismerhető sejttípus az agykéregben, jól kivehető a Nissl-festett metszeteken. Piramis vagy kúp alakú sejttesttel rendelkezik, szómájának a csúcsa az agykéreg felszíne, alapja pedig a fehérállomány felé mutat. Egy vastag dendritnyúlvány ered a sejttest csúcsából, amely majdnem egyenesen a kéregfelszín felé tör (apikális dendrit vagy csúcsdendrit). Sok, II. rétegben elhelyezkedő piramissejt apikális dendritje ferdén vagy vízszintesen fut a sejttestből való kilépés után, ami nem messze az eredési helyétől el is ágazik és felszáll az I. rétegbe. A legtöbb piramissejt dendritfája eléri az I. réteget. Kivételek a szabály alól a VI. rétegben található piramisok, melyek csúcsdendritjei csak a IV. kérgi rétegig nyúlnak fel (Abeles 1991). A piramissejtek további dendritjei a sejttest bazális részéből nőnek ki (bazális vagy alapi dendritek) és ferdén haladnak lefelé, a fehérállomány irányába. A bazális denditek nem messze az eredési helyüktől több irányban, csillag alakban szétágaznak és szinte minden irányból körbeveszik a szómát. A III. rétegben elhelyezkedő piramissejtek bazális dendritjei sok esetben lenyúlnak egészen a IV. kérgi réteg felső részéig, ahol közvetlen talamokortikális (thalamocortical, TC) szinaptikus bemenetet kaphatnak. A VI. réteg változatos képet mutat a piramissejtek morfológiáját tekintve: a szokásos piramisokon kívül találhatóak itt még fejenálló, a sejttestük csúcsával a fehérállomány felé mutató piramissejtek, vízszintes dendritfával rendelkező piramissejtek, valamint bipoláris piramissejtek is (Abeles 1991). Utóbbiak egy felszálló és egy további, leszálló fődendrittel is rendelkeznek. A piramissejtek apikális dendritjei a dendrit vastagabb részénél (dendrittörzs) csupán néhány helyen ágaznak el. Ezek az elágazások ferdén, oldalirányban orientáltak (ferde dendritek). A felszín közelében (I. réteg) viszont az apikális dendritfa sűrűn elágazik, kialakítva az apikális dendritbojtot (dendritic tuft).

A piramissejtek dendritjeit sűrűn borítják dendritikus tüskék. Axonjuk a szóma bazális részéből ered, többször elágazik a sejttest közelében, amíg a fő axonág elhagyja az agykérget és a fehérállományba jut. A humán agykéregben egy piramissejt kb. 40.000 másik sejttel szinaptizál és kb. ugyanennyi sejttől kap bemenetet. A piramisok által

létrehozott szinapszisok szerkezetük alapján aszimmetrikusak és általában szimmetrikus, gátló szinapszisokat kapnak a szómájukra, axon iniciális szegmentumukra és a dendritjeik eredési helyére (proximális dendritek). A disztális dendritekre érkező szinapszisok elsősorban a dendrittüskéken találhatóak és nagyrészt aszimmetrikusak, de a disztális dendrittörzsön mindkét típusú szinapszis megtalálható. Ez az elrendezés arra enged következtetni, hogy a piramissejtekre érkező gátló hatások fő szerepe a sejt teljes inaktiválása, míg akciós potenciál csak sok, serkentő típusú preszinaptikus sejttől érkező szinaptikus bemenet szummációja útján alakulhat ki (Abeles 1991).

A sejttest mérete alapján a piramissejtek között megkülönböztethetünk kicsi (1-12 µm), közepes (20-25 µm), nagy (45-50 µm) és óriás (70-100 µm) piramisokat. Az óriás piramissejtek (Betz-sejtek) a motoros kéreg V. rétegében találhatóak és az idegrendszer legnagyobb sejtjei közé tartoznak (Abeles 1991).

Általánosságban elmondható, hogy a piramissejtek lehetnek szabályosan tüzelők (RS) és burst tüzelők (IB). Az V. rétegben elhelyezkedő RS piramissejtek vékony apikális dendritfával rendelkeznek ('slender-tufted' pyramidal cells), ami nem ágazik szét nagymértékben az I. rétegben (Chagnac-Amitai és mtsai 1990; Kasper és mtsai 1994). Az V. rétegi IB piramisok ezzel ellentétben a kéreg felszínéhez közel gazdagon elágaznak és vastag apikális dendritfájuk van ('thick-tufted' pyramidal cells) (Kasper és mtsai 1994).

3.1.2.4 Csillagpiramis sejtek

A csillagpiramis sejtek (star pyramidal cells) átmenetet képeznek a piramissejtek és a csillagsejtek között. A patkányok barrel kérgében a sejtek kb. 20%-a ilyen típusú sejt (Lubke és mtsai 2000; Staiger és mtsai 2004). Abban különböznek a tüskés csillagsejtektől, hogy van egy fő apikális dendritjük, amely hosszabb, mint a többi, radiálisan elhelyezkedő dendrit; valamint a csillagpiramisok bazális dendritjei a TCSS-ek dendritjeivel ellentétben szimmetrikusak. A piramissejtektől pedig abban térnek el, hogy a sejttestük nem piramis alakú. Az említett apikális dendritjük is viszonylag rövid, nem éri el az I. kérgi réteget és csak ritkásan ágazik el. Axonjuk a II., III. és IV. rétegekbe vetít, néhány elágazása eljut az V.-VI. rétegekbe is.

3.1.2.5 Csillagsejtek

A csillagsejteket tehát a dendrittüskék denzitása alapján feloszthatjuk sima csillagsejtekre, valamint tüskés csillagsejtekre. A TCSS-ek multipoláris, csillag alakú

sejttesttel rendelkeznek, melyből a dendritek minden irányba kiindulhatnak és már a szóma közelében szét is ágaznak (Abeles 1991). A dendritjeik sűrűn borítottak dendrittüskékkel. Az axonjuk a fehérállomány irányában hagyja el a sejttestet és a sejt közvetlen közelében bőségesen elágazik. Sok esetben egy további kollaterálist is ad, ami a felső kérgi rétegekben terminálódik. Aszimmetrikus, serkentő szinapszisokat képeznek a posztszinaptikus partnereikkel. Hasonlóan a piramissejtekhez, ezek a típusú sejtek is szimmetrikus, gátló szinapszisokat kapnak a sejttestükre és a dendritjeik proximális szakaszára. A disztális dendriteken a preszinaptikus sejtek főként dendrittüskékkel szinaptizálnak és elsősorban aszimmetrikusak, serkentő típusúak. A TCSS-ek az agykéreg középső rétegeiben (IV. vagy granuláris réteg) találhatóak meg legnagyobb számban. Gilbert és Wiesel szerint a TCSS-nek két altípusát különböztethetjük meg: a kicsi és a nagy TCSS-et (Gilbert és Wiesel 1979). A nagyobb változatnak az axonja a fehérállományba jut és távolabbi kérgi területekre vetít, míg a kicsi TCSS axonjának csak lokális, kérgi elágazásai vannak. Egyes kérgi területeken (pl. motoros kéreg) a TCSS-ek száma minimális, ezeken a területeken nem is definiálható a IV. réteg (agranuláris kéreg).

A sima csillagsejtek szómájának alakja és dendritikus morfológiája hasonló a TCSS-ekéhez. Szómájuk átmérője általában 10-30 μm nagyságú. Axonjuk csak helyileg, a kérgen belül ágazik el és szimmetrikus, GABAerg szinapszisokat képez. A lokális kiterjedésük miatt ezeket a sejteket interneuronoknak is nevezzük. Más mintázatú szinaptikus bemenetet kapnak, mint a piramis- és a tüskés csillagsejtek. A szómára keverten érkeznek gátló és serkentő szinapszisok, de ezek nagyobb része szimmetrikus, tehát gátló hatású. A disztális dendritjeik is vegyesen kapnak serkentő és gátló bemeneteket, azonban itt több aszimmetrikus szinapszis található. A SCSS-ek alkotják az eddig leírt sejttípusok közül a legheterogénebb csoportot: többféle felosztásuk létezik dendritikus és axonális morfológia (Somogyi és mtsai 1998; Markram és mtsai 2004), elektrofiziológiai tulajdonságaik (Gupta és mtsai 2000; Maccaferri és Lacaille 2003) és molekuláris markereik (Cauli és mtsai 1997) alapján (Ascoli és mtsai 2008). Általában minimum 7-8 gátló típusú sejtcsoportot lehet megkülönböztetni a morfológiai jegyek alapján, de ez a szám a valóságban sokkal magasabb lehet (Markram és mtsai 2004).

Egyes gátló interneuronok két dendritnyúlvánnyal rendelkeznek (bipoláris sejtek), más sejtek dendritjei két bojtot hoznak létre, ahol egyik a kéreg felszíne, a másik pedig a fehérállomány felé mutat (bitufted sejtek). Az axon eloszlása és végződési helye (axon,

dendrit, szóma) is használható klasszifikációra. Az elsősorban piramissejtek sejttestére szinaptizáló sejteket kosársejteknek hívják, melyeknek létezik kis, nagy és fészek típusa. A kandelábersejtek vagy csillársejtek axonjai a piramissejtek axonjának iniciális szegmentumán végződnek (Somogyi 1977; Peters és Jones 1984). A többi gátlósejt pedig legtöbb esetben a posztszinaptikus sejtek dendritjeit idegzi be (pl. bitufted, bipolar és double bouquet sejtek) (Markram és mtsai 2004). A gátlósejteket különböző immunhisztokémiai markerekkel is el lehet különíteni egymástól: erre főként kálcium-kötő fehérjéket (kalbindin, kalretinin, parvalbumin) vagy neuropeptideket (vazointesztinális peptid, kolecisztokinin, szomatosztatin stb.) használnak. A gátló interneuronok közé sorolható még néhány ismertebb sejttípus, mint például a Martinotti-sejtek vagy a Cajal-Retzius sejtek. Előbbiek multipoláris interneuronok, röviden elágazó dendritekkel, és a kéreg felszíne felé törő axonnal, mely más kérgi neuronokkal szinaptizál. A Cajal-Retzius sejtek olyan kis neuronok az I. kérgi rétegben, melyek ritkák vagy teljesen hiányoznak felnőttekben, axonjuk pedig párhuzamosan fut a kéreg felszínével. Az interneuronok a kémiai szinapszisok mellett elektromos szinapszisokkal (gap junction) is csatlakozhatnak más interneuronokhoz (Bennett és Zukin 2004).

Az interneuronok nemcsak morfológiájukban, hanem elektrofiziológiai tulajdonságaiban is nagyfokú változatosságot mutatnak. Spontán és kiváltott tüzelési mintázataik alapján általában nem adaptálódó FS sejtek vagy alacsony küszöbű tüzelést megvalósító, adaptálódó tüzelési mintázatot mutatnak, de több, mint 10 további tüzelési mintázat-típust is leírtak már (Ascoli és mtsai 2008).

3.1.3 Az agykéreg réteges szerkezete

Minden agykérgi területre jellemző a rétegzettség, de a rétegek vastagsága az agyterület funkciójától függően eltérő lehet. Általánosságban elmondható, hogy fő bemeneti interfészként az I.-IV. rétegek funkcionálnak, a fő kimenetet pedig az V.-VI. rétegek adják. A különböző rétegek különböző méretű és típusú idegsejtekből épülnek fel. A rétegzettség (lamináció) hasonló mintázata fedezhető fel egyazon faj különböző agykérgi területein és különböző fajok agykérge között is.

A kutatók az agykérget (neokortex) hat rétegre osztják, azonban a rétegek közötti határok meghúzásának szempontjai változhatnak kérgi területről kérgi területre, valamint szubjektíven, a kutató személyétől függően is (1. ábra). Az itt ismertett leírás részben

Lorente de No kutatásain alapszik (Lorente de No 1949). Az intenzív kutatásoknak, valamint a kísérleti technikák és a technológia fejlődésének köszönhetően bebizonyosodott, hogy a neokortex valójában hatnál több rétegből épül fel, ezért bizonyos agykérgi területeken több kérgi réteget további alrétegekre osztanak.

A kéreg legkülső rétege (I. réteg, molekuláris réteg, lamina molecularis) csupán nagyon kevés neuront tartalmaz. Főként a piramissejtek apikális dendritfáinak végződéseiből, elágazásaiból (dendritbojt) és a minden irányba futó vízszintes axonok hálózatából áll.

A II. réteg (külső szemcsesejtes réteg, lamina granularis externa) kisméretű, sűrűn elhelyezkedő csillagsejtekből, valamint kis piramissejtekből áll, melyek apikális dendritjei az I. rétegben végződnek, az axonjukat pedig az alsóbb kérgi rétegekbe küldik.

A III. rétegben (külső piramissejtes réteg, lamina pyramidalis externa) a nagy és közepes piramissejtek uralkodnak, melyek apikális dendritfája felnyúlik egészen az I. rétegig. Az axonjaik asszociációs, komisszurális és intrakortikális kapcsolatokat alakítanak ki.

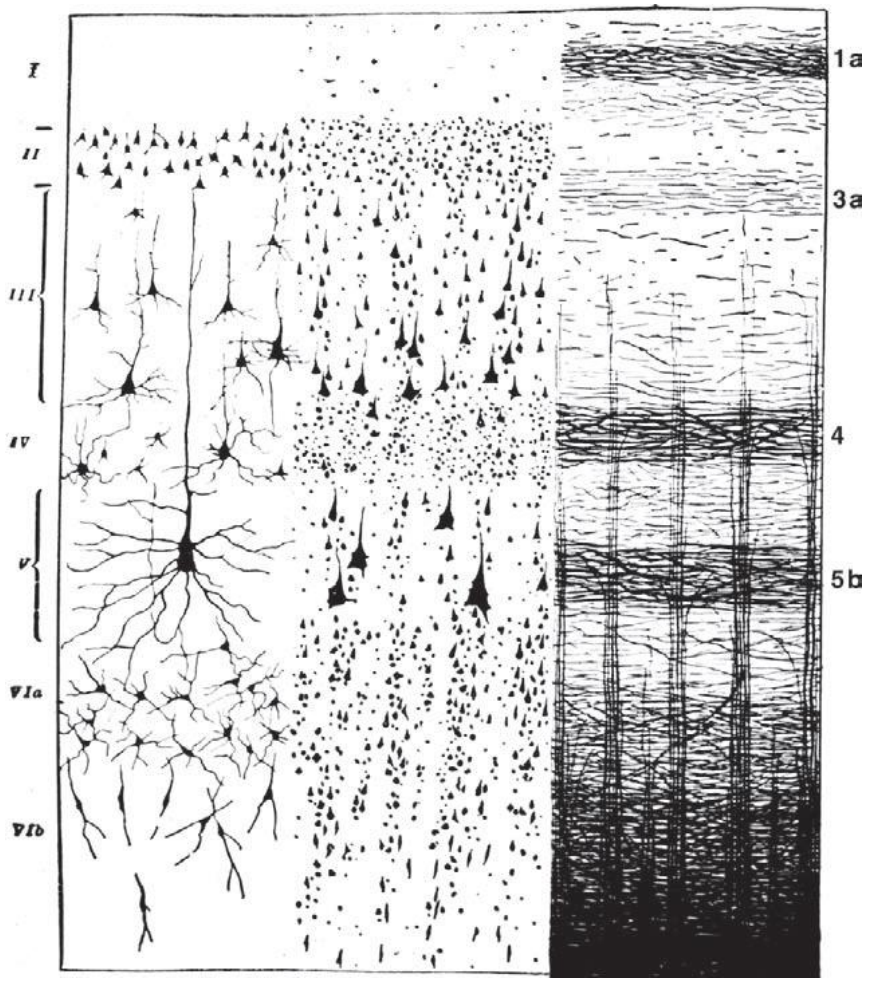
A IV. réteget (belső szemcsesejtes réteg, lamina granularis interna) sűrűn elhelyezkedő, tüskés csillagsejtek alkotják. A IV. réteg felső része (IVa alréteg) keverten tartalmaz közepes nagyságú piramissejteket és csillagsejteket, míg a mélyebben elhelyezkedő alsó része (IVb alréteg) szinte kizárólag csillagsejtekből áll. A IV. rétegben található még egy mielinhüvellyel borított rostokból álló sűrű, vízszintes köteg (külső Baillarger-sáv), mely a talamokortikális sejtek axonjainak szerteágazó terminálisaiból épül fel. Ezek a rostok a IV. rétegi csillagsejtek dendritjein, a III. rétegi piramissejtek bazális dendritjein, valamint az V. és VI. rétegi piramissejtek apikális dendritfáin végződnek.

Az V. rétegben (belső piramissejtes réteg vagy ganglionréteg, lamina pyramidalis interna) találhatóak az agykéreg legnagyobb piramissejtjei. Ez a réteg a kéreg alatti területekre vetítő rostok egyik fő forrása, elsősorban a törzsdúcokba, az agytörzsbe, a gerincvelő motoros területeire, valamint a talamusz bizonyos magvaiba vetít. Ezek mellett az V. rétegi piramissejtek sok intrakortikális kapcsolatot is kialakítanak axonkollaterálisok révén. Az axonrostok sűrű kötegéből álló belső Baillarger-sáv is itt halad át.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

A legalsó, VI. rétegben (multiform réteg, lamina multiformis) orsó alakú (vagy fuziform) sejtek, valamint kisebb piramis- és csillagsejtek keveréke található. A VI. réteg legmélyebben elhelyezkedő része különösen gazdag fuziform sejtekben. A VI. rétegben található sejtek dendritjei különböző kérgi rétegekbe nyúlnak fel. Az axonjuk vagy kilép a fehérállományba és rövid asszociációs rostokat alkot, vagy más kérgi rétegekbe vetít. A kortikotalamikus kapcsolatok nagy része is az ebben a kérgi rétegben található piramissejtektől ered.

Az agykéregben a IV. réteget az itt található sok és sűrűn elhelyezkedő szemcsesejt (csillagsejt) miatt granuláris rétegnek is hívjuk, míg az e fölött elhelyezkedő rétegeket összefoglalóan szupragranuláris rétegeknek, a IV. réteg alatt található rétegeket pedig infragranuláris rétegeknek nevezzük.



1. ábra – Az agykéreg lamináris szerkezete. *Az agykéreg réteges szerkezetét különféle szövettani festési eljárásokkal láthatóvá tehetjük: Golgi-festés (bal), Nissl-festés (közép) és mielin-festés (Weigert-módszer, jobb). I – molekuláris réteg, II – külső szemcsesejtes réteg, III – külső piramissejtes réteg, IV – belső szemcsesejtes réteg, V – belső piramissejtes réteg, VI – multiform réteg (Brodmann 1909; Jacobson és Marcus 2008).*

Az agykérget csoportosíthatjuk aszerint is, hogy a rétegek elkülöníthetőek-e festés után (homotipikus neokortex) vagy nem minden réteg látható tisztán (heterotipikus neokortex). Az utóbbira példa az elsődleges motoros kéreg, ahol a kis szemcsesejtekből felépülő II. és IVb rétegek nagyrészt hiányoznak. Ezt a kéregtípust hívják agranulárisnak. Ezzel szemben az elsődleges szenzoros kéregben ezek a rétegek sokkal kifejezettebbek. Ezeket a területeket granuláris kéregnek vagy koniokortexnek hívjuk.

3.1.4 Az agykéreg moduláris szerkezete

Feltételezések szerint minden agykéreggel rendelkező élőlényben minden kérgi terület hasonló elvek alapján, modulárisan dolgozza fel az információt, az ún. kérgi oszlopokban vagy kolumnákban. Az agykéreg kolumnáris szerkezetét először Mountcastle írta le a szomatoszenzoros kéregben (Mountcastle 1957). A kérgi kolumna az agykéreg alapvető funkcionális egységének tekinthető. A kolumnáris hipotézis szerint a neokortexet a lamináris szerkezetéhez képest ortogonálisan elhelyezkedő oszlopszerű sejtcsoportok építik fel. Minden kolumna kb. 300-600 µm átmérővel rendelkezik, a hengeres szerkezet magassága pedig megfeleltethető a kéreg vastagságának. Minden oszlopot egy néhány ezer sejtből álló archetipikus hálózat épít fel, mely hálózat minden oszlopban ismétlődik. A kérgi kolumnák tovább bonthatóak 80-100 darab ún. minikolumnára. Egy-egy ilyen minioszlopot 80-100 sejtből álló hálózat alkot (Mountcastle 1997).

A fő különbség a szomszédos oszlopok között, hogy más és más talamikus bemenetet kapnak. Például a barrel kortex esetén a szomszédos oszlopok (barrelek) az állat szomszédos bajuszszőreit reprezentálják. Egyes elméletek szerint minden kérgi kolumna ugyanazt az alapvető transzformációt hajtja végre a talamusztól kapott információkon. Ha tehát egy barrel megfeleltethető az agykéreg egy alapvető funkcionális egységének, vagyis egy kérgi oszlopnak, akkor a barreleket alkotó sejthálózat vizsgálatával és működésének megértésével sok információt megtudhatunk az agykéreg alapvető felépítéséről és működéséről (pl. kapcsolatok az oszlopon belül, oszlopok közötti kapcsolatok, a kolumnák szubkortikális kapcsolatai stb. (Fox 2008)).

3.1.5 Az agykéreg kapcsolatrendszere

Az emberben átlagosan 40.000 szinapszist kap egy kortikális neuron, majomban ez az érték 20.000 körül van, míg egérben kb. 8.000 szinapszis érkezik egy kérgi idegsejtre (Abeles 1991). A szinapszisok felét a fehérállományból érkező axonok hozzák létre, míg a másik fele lokális kapcsolat. Az I. kérgi rétegben futó axonok gyakran több milliméteres távolságokra is eljutnak. Ezek az axonok egyrészt a Martinotti-sejtek nyúlványai, másrészt a fehérállományon keresztül a kortexbe érkező axonkollaterálisok, valamint néhány, I. rétegben található neuron axonja. Kísérletes eredmények azt bizonyítják, hogy az I. rétegi axonoknak nincs szerepük az egymástól távolabb elhelyezkedő agyi területek között történő információ-továbbításban (Sperry 1947). A legtöbb külső kérgi kapcsolat a fehérállományból ered, melynek négy típusa van (Abeles 1991):

1. Különböző kérgi területek közötti kapcsolatok egy féltekén belül (asszociációs rostok)
2. Két félteke közötti kapcsolatok (komisszurális rostok)
3. Specifikus kérgi és kéreg alatti területek közötti kapcsolatok (projekciós rostok)
4. Diffúz kapcsolatok az agytörzs különböző területei és a kéreg kiterjedt részei között (neuromodulátoros rostok)

A fenti kapcsolatok alapvetően kölcsönösek, vagyis a kéreg afferenseket kap ezekről a területekről és efferenseket küld vissza.

A piramissejtek és a tüskés csillagsejtek is küldenek axonkollaterálisokat a fehérállományba. Emberben kb. 10 milliárd axon fut a kéregből a fehérállományba, amiből kb. 10-20 millió axon vetít kéreg alatti területekre és 100 millió rost a corpus callosumon keresztül az ellenkező hemiszfériumba. A fenti számok alapján látható, hogy az axonok nagyon nagy hányada egy féltekén belüli kérgi területről szállít információt valamelyik másik kérgi területre. A kortikokortikális afferensek minden rétegben alakítanak ki kapcsolatokat, de ezek a kapcsolatok a felső rétegekben a legsűrűbbek. A talamikus afferensek főként a középső rétegekben végződnek (a szomatoszenzoros kéregben a IV. réteg a talamorecipiens lamina, az asszociációs kérgi területeken pedig a III. réteg). A nemspecifikus afferensek minden kérgi réteget beidegeznek, de az I. és VI. rétegeket nagyobb sűrűségben.

A legtöbb kortikokortikális efferens a II. és III. réteg piramissejtjeitől származik. A talamikus magokba főként a VI. rétegi piramissejtek vetítenek (Jones 2007), míg az V. réteg nagy piramissejtjei az axonjaikat az agytörzsbe és a gerincvelőbe küldik vagy ún. ’driver’ bemenetet biztosítanak a talamusz magasabbrendű magjaiba (Veinante és mtsai 2000; Killackey és Sherman 2003). Általánosságként elmondható, hogy minden kérgi területhez tartozik egy talamikus mag, mellyel reciprok kapcsolatban áll.

Az agykéreg minden részébe érkeznek neuromodulátoros bemenetek: adrenerg bemenet a locus coeruleusból az V.-VI. rétegekbe, szerotonerg kapcsolat a raphe magvakból az I.-IV. rétegekbe, valamint kolinerg bemenet a bazális előagyból a II.-V. rétegekbe (Eggermann és Feldmeyer 2009).

3.1.6 A kitüntetett tulajdonságokkal rendelkező V. réteg

Egyes elméletek szerint az V. rétegi neuronhálózat jelentős mértékben képes a neokortex elektromos aktivitását befolyásolni és szinkronizálni (Gutnick és Mody 1995). Tehát az V. rétegben található piramissejtek belső membránfulajdonságaik, rétegek közötti kapcsolataik, neurotranszmitter-rendszerük és axonális kimeneteik révén egy erősen szinkronizált aktivitást képesek kialakítani, mely a kéreg többi idegsejtjének aktivitását is befolyásolhatja.

Eddigi kutatások alapján az V. rétegből a talamuszba irányuló bemenet ’driver’ hatású, míg a VI. rétegi kortikotalamikus bemenetek modulátoros hatással vannak a talamokortikális és a retikuláris neuronokra (Sherman 2012). Az V. rétegben található sejtek nagysága és alakja nagyfokú változatosságot mutat, és ahogy arról már korábban szó volt, ebben a rétegben helyezkednek el a neokortex legnagyobb idegsejtjei. A nagyméretű szóma feltehetőleg azért alakult ki, mert a sejtnek nagy mennyiségű axont és dendritet kell ellátnia építő- és tápanyaggal. Az V. rétegi sejtek apikális dendritfája emberben akár a 2500 μm-es nagyságot is elérheti (Marin-Padilla 1967). Fontos megemlíteni, hogy a talamusz patkány szomatoszenzoros rendszerében nem csak a IV. rétegbe vetít, hanem az Vb rétegben található neuronokon is szinaptizál (Armstrong-James és mtsai 1992). Az V. rétegben elhelyezkedő piramisok egyedülállóak abból a szempontból is, hogy sokan közülük mind a hat kérgi rétegben tartalmaznak sejtnyúlványokat, vagyis gyakorlatilag a kéreg minden rétegéből kaphatnak bemenetet.

Az V. rétegi piramissejtek változatos elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Találhatóak itt adaptálódó tüzelésű RS neuronok, IB tüzelési mintázatot mutató sejtek, de repetitív burst és ritmikus tüzelés is előfordul. Az IB sejtek nagy része kéreg alatti területekre vetít, de nagy kiterjedésű lokális kapcsolatokkal is rendelkeznek, így erős befolyással vannak az agykéregre is. Az V. rétegi piramissejtekből belső membrántulajdonságaik és a morfológiájuk alapján kétféle csoportot alkothatunk (Chagnac-Amitai és mtsai 1990; Kasper és mtsai 1994). Ezek a már korábban említett RS tüzelési mintázatot mutató vékony-bojtos piramissejtek, valamint az IB tüzelő vastag-bojtos piramissejtek.

Az V. rétegi sejtek bemenete főként a talamuszból vagy a kéregből érkezik. Az ebben a rétegben található piramissejtek akár 6-8 mm távolságra elhelyezkedő területekre is vetíthetnek, de nagyrészt a IV., V., és VI. rétegekben alakítanak ki kapcsolatokat. Egy V. rétegi neuron egy másik idegsejtre általában kisszámú szinapszist ad. Az eddigi kutatások arra utalnak, hogy a serkentő kapcsolatok az V. rétegben ritkábbak, viszont erősebbek a II./III. rétegben található serkentő kapcsolatokhoz képest (Thomson és mtsai 1988). További eredmények azt mutatják, hogy az V. rétegben az RS sejtek erősebb gátló bemenetet kapnak, mint az IB sejtek.

In vitro kísérletekben V. rétegi sejteken megfigyelték (Connors és Amitai 1993), hogy a gátlás kismértékű csökkentésével erősen szinkronizált, néha ritmikus aktivitás alakul ki, mely akár több milliméteren keresztül is terjedhet a kérgi szeleten (Chagnac-Amitai és Connors 1989b). Amennyiben a GABA receptorokat nagyobb mértékben blokkoljuk nagy koncentrációban jelenlévő antagonistákkal, akkor a spontán módon kialakuló szinkronizált események még gyakoribbak, és akadálytalanul haladnak végig a kérgi szeleten (Gutnick és mtsai 1982; Connors 1984; Chervin és mtsai 1988). Az eredmények arra utalnak, hogy ez a szinkronizált aktivitás az V. rétegből ered. Ezt bizonyítja az a megfigyelés is, hogy a szeletek - kérgi rétegekkel párhuzamos - elvágásával és GABA antagonista alkalmazásával az V. réteget tartalmazó mikroszeletek önállóan is képesek voltak szinkronizált események elindítására, melyek aztán a kiindulás helyétől tovaterjedtek (Silva és mtsai 1991; Telfeian és Connors 1998).

Szinkron aktivitás nemcsak a gátlás csökkentésével, hanem a szinaptikus serkentés növelésével is megvalósítható: például N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor-mediálta serkentés az extracelluláris Mg^{2+} koncentráció csökkentésével is elérhető. Ezzel a

módszerrel csökkenthető az NMDA csatornák feszültségfüggése (Nowak és mtsai 1984), ami a kéregben spontán, erősen szinkronizált és ritmikus, 4-7 Hz-es aktivitást mutató események kialakulásához vezet (Sutor és Hablitz 1989; Silva és mtsai 1991). A kérgi agyszelet V. rétegének már egy kis része is elégséges ahhoz, hogy hasonló, ritmikus és szinkron aktivitás kialakuljon, melyet a horizontális vágásokkal a többi rétegtől elkülönített V. réteg spontán aktivitása is bizonyított (Silva és mtsai 1991). Azokon a mikroszeleteken, melyek nem tartalmaztak V. réteget, nem alakult ki ritmikus, szinkron aktivitás. Az inaktív szeletek aktivitása inkább az aktivitás nélküli, kontroll szeletekre hasonlított. A fentiek alapján tehát kijelenthető, hogy az V. réteg szükséges és elégséges a ritmikus, szinkron aktivitás kialakulásához.

Az V. rétegben lokálisan kialakult szinkron események vertikálisan a rétegek között és horizontálisan a szomszédos kérgi területek között is továbbterjedhetnek (Chervin és mtsai 1988; Chagnac-Amitai és Connors 1989b). A kérgi rétegekkel párhuzamos terjedést az V. réteg közvetíti, azonban alternatív útvonalakon is eljuthat az aktivitás a szomszédos kérgi területekre, akár a felsőbb kérgi rétegeken keresztül (Telfeian és Connors 1998). Prince és Tseng áramforrás-sűrűség elemzéssel kimutatta, hogy a szinkronizált, epileptiform események is V. rétegi neuronoktól erednek (Prince és Tseng 1993).

Az IB tüzelési mintázatot mutató sejtek fontos szerepet játszhatnak a fent leírt folyamatokban. Többségben vannak az V. rétegben, erősen serkenthetőek és megvannak a szinkronizált és terjedő aktivitáshoz szükséges lokális kapcsolataik (Gutnick és mtsai 1982; Chagnac-Amitai és Connors 1989a; Silva és mtsai 1991). Az V. réteg ritmicitása fontos lehet a talamokortikális ritmusok kialakításában is.

3.1.7 A szomatoszenzoros kéreg

Kísérleteink során az agyi elektromos tevékenységet patkány elsődleges szomatoszenzoros kérgének törzsi és hátsó lábi régiójából regisztráltuk, ezért ebben a fejezetben, kiegészítve az előző fejezeteket, röviden ismertetem a szomatoszenzoros kéregre specifikus kutatási eredményeket,.

Az emlős neokortex legalább két szomatoszenzoros régiót tartalmaz: az elsődleges szomatoszenzoros kérget (S1) és a másodlagos szomatoszenzoros kérget (S2) (Zilles és Wree 1985), melyek a parietális kérgi régióban találhatóak. Ezeknek a területeknek eltérő a citoarchitektúrája és a testfelület különböző leképezését tartalmazzák. Patkány S1-ben

a bőrfelületet reprezentáló szomatotópiás térképet ('ratunculus') a bajuszszőröktől és a pofáról érkező taktilis információk feldolgozásáért felelős agyterületek dominálják. Az S1 részben átfed az elsődleges motoros kéreggel (M1), mely egy kb. 1 mm-es sávot jelent az állat első és hátsó mancsának reprezentálásáért felelős agykérgi területen. Ez a terület a ventrális poszterolaterális talamikus magtól (VPL) és a ventrolaterális talamikus magtól (VL) is kap talamokortikális bemenetet (Donoghue és mtsai 1979). Ennek a kéregterületnek az elektromos ingerlésével izommozgást válthatunk ki, az állat mancsán található bőr ingerlésével pedig kiváltott választ regisztrálhatunk itt. Az S2 laterálisan található az S1-től és a test egy második, teljes reprezentációját tartalmazza.

Az S1 patkányban S1FL (mellső láb), S1HL (hátsó láb) és Par1 (fej, bajuszszőrök, törzs) régiókra osztható (Zilles és Wree 1995; Palomero-Gallagher és Zilles 2004). A mellső lábnak nagyobb a reprezentációja, mint a hátsónak (Emmers 1988). A törzs (S1Tr) és a farok a Par1 régió legkaudálisabb részén van reprezentálva (Welker 1971; Hall és Lindholm 1974; Welker 1976). A Par1 zónában a granuláris régiókat perigranuláris (septa) és diszgranuláris zónák veszik körül (Donoghue és Wise 1982; Chapin és Lin 1990). A granuláris és perigranuláris régiókban a megfelelő bőrterület reprezentációi találhatóak meg, míg a diszgranuláris zónákba a bőrben, izmokban és ízületekben található proprioceptoroktól származó információk konvergálnak (Chapin és Lin 1984). Az S1 hatrétegű, viszont a II. és III. rétegek közötti határvonal nehezen meghatározható, ezért sokszor összevonják ezt a két réteget (Wise és Jones 1978). A granuláris zónákban a IV. kérgi réteg gazdag tüskés csillagsejtekben. Az V. réteg két alrétegre osztható: az Va réteg viszonylag kevés, míg az Vb réteg sok piramissejtet tartalmaz (Chapin és Lin 1984; Mercier és mtsai 1990; Bodor és mtsai 2005). Az S2 sejtes felépítése hasonlít az S1-éhez, azonban itt nincsenek granuláris aggregátumok és a IV. réteg is vékonyabb, mint az S1-ben.

3.1.7.1 A szomatoszenzoros kéreg bemenetei – szomatoszenzoros afferensek

A szomatoszenzoros kéreg törzsi és hátsó lábi régiói a VPL talamikus magtól kapják a taktilis bemenetüket a hátsó oszlopi magon és a gerincvelőn keresztül. Minden VPL sejt a szomatoszenzoros kéregbe küldi az axonját, melyek főként a IV. rétegben végződnek (Saporta és Kruger 1977; Herkenham 1980; Kharazia és Weinberg 1994), kisebb mértékben azonban az Vb és VI. réteg határán is terminálódnak. A magasabbrendű

talamikus magok közé tartozó poszterior talamikus mag (Po) is vetít az S1-be: a diszgranuláris és perigranuláris zónákat idegzi be (Koralek és mtsai 1988; Fabri és Burton 1991b; Lu és Lin 1993). A Po-ból érkező axonok főként az I. és Va rétegekben végződnek (Herkenham 1980). Mind a ventrobazális talamikus komplex (VB), mind pedig a Po TC neuronjai vetítenek a másodlagos szomatoszenzoros kéregbe és az S1-be is, de kevés olyan sejt van, mely mind a két kérgi területre küldene axonkollaterálisokat (Spreafico és mtsai 1987). További talamikus input érkezik a VL-ből és a ventromediális talamikus magból (VM) a korábban említett átfedő zónákba (Donoghue és mtsai 1979). Az intralamináris talamikus magok is vetítenek az S1-be, azonban ezek a kapcsolatok ritkák (Herkenham 1980; Berendse és Groenewegen 1991). Az S2 axonterminálisokat kap tehát a VB-ből és a Po-ból is (Carvell és Simons 1987; Spreafico és mtsai 1987; Pierret és mtsai 2000). A Po-ból érkező afferensek az S2 I. és IV. rétegében végződnek (Herkenham 1980). Neuromodulátoros afferenseket is kap a szomatoszenzoros kéreg több, kéreg alatti területről: szerotonerg bemenetet a raphe magokból (Kirifides és mtsai 2001) és noradrenerg inputot a locus coeruleusból (Devilbiss és Waterhouse 2000). A Meynert-féle bazális magból kolinerg bemenet érkezik (Baskerville és mtsai 1993). A zona incertából is érkeznek ide afferensek (Lin és mtsai 1997), azonban ennek a pályának a szerepe még nem tisztázott.

3.1.7.2 A szomatoszenzoros kéreg kimenetei – szomatoszenzoros efferensek

Általánosságként elmondható, hogy reciprok kapcsolat van a szomatoszenzoros kéreg és azon talamikus magok között, melyektől a bemenetüket kapják (Deschenes és mtsai 1998). A szomatoszenzoros kéreg az alábbi talamikus területekre vetít vissza: poszterior talamikus mag (Diamond és mtsai 1992b), a centrolaterális és parafascicularis mag, a submedius mag (Miletic és Coffield 1989; Yoshida és mtsai 1992) és a laterális ventromediális talamusz (Monconduit és mtsai 1999; Desbois és Villanueva 2001). Az S1-ben található V. rétegi sejtek kizárólag a Po dorzális részén terminálódnak (Veinante és mtsai 2000). A Po-ban is megfigyelhető a szomatotopikus organizáció, mely a VB-ben található elrendeződés egyfajta tükörképe. Kísérleti megfigyelések alapján feltételezhetjük, hogy a Po-ba jutó szenzoros bemenet a primer szomatoszenzoros kérgen keresztül éri el ezt a talamikus struktúrát (Diamond és mtsai 1992a), vagyis először az inger a VPL-en keresztül bejut az S1-be, majd az S1 V. rétegi piramissejtjei ezt

feldolgozás után továbbküldik a Po-ba. A Po tulajdonképpen egy modulátoros átkapcsoló állomás az egyik kérgi területről a másikra (Sherman és Guillery 2002), az S1-ből közvetíti az információt az S2-be.

A VB afferens terminálisokat kap a retikuláris talamikus magból (nRt) (Pinault és Deschenes 1998a; b) és a szomatoszenzoros kéreg VI. rétegéből (Land és mtsai 1995; Deschenes és mtsai 1998; Veinante és mtsai 2000). Utóbbi a TC neuronok aktivitását modulálja. A VI. rétegi piramissejtek kb. fele vetít a talamuszba, ezek a Po-ba és az nRt-be is projiciálnak. Kortikobulbáris axonok futnak a hátsó oszlopi magokba és a trigeminális magokba (White és DeAmicis 1977; Welker és mtsai 1988). Az S1 és az S2 is vetít a striátumba (Alloway és mtsai 2000; Wright és mtsai 2001), a hídi magokba (Leergaard és mtsai 2000a), a vörös magba (Ebrahimi-Gaillard és Roger 1993; Leergaard és mtsai 2000b), a vesztibuláris magokba (Nishiike és mtsai 2000) és a gerincvelőbe.

3.1.7.3 Kortikokortikális kapcsolatok

Reciprok kapcsolat van az S1 és az M1 között (Chapin és Lin 1990; Paperna és Malach 1991; Cauller és mtsai 1998), az S1 és a kiegészítő motoros kéreg között (Reep és mtsai 1990; Paperna és Malach 1991), az S1 és az S2 között (Koralek és mtsai 1990; Cauller és mtsai 1998; Kim és Ebner 1999), valamint az S1 és a parietális ventrális área között (Fabri és Burton 1991a). Az ellenoldali agyféltekéken található S1 és S2 a corpus callosumon keresztül kapcsolódik össze: III. és V. rétegi piramissejtek vetítenek a saját rétegükbe az ellenoldali féltekén (Akers és Killackey 1978; Olavarria és mtsai 1984).

3.2 Alvás

Az alvás egy spontán, külső ingerekkel visszafordítható, endogén folyamat, mely homeosztatikus és cirkadián szabályozás alatt áll (Pace-Schott és Hobson 2002), és létfontosságú a legtöbb, fejlett idegrendszerrel rendelkező élőlény számára. Egy olyan periódikusan visszatérő viselkedés, melyet külső ingerekre (hallás, szaglás, tapintás) csökkent válaszkészség, megszűnt motoros aktivitás és egy, az élőlényre jellemző testtartás felvétele jellemez. Alvás alatt az információfeldolgozás módja jelentős mértékben megváltozik az agyban az éber állapothoz képest. Az alvást vizsgálták már emlősökben, madarakban, halakban, hüllőkben, kétéltűekben, de sok rovar is alváshoz hasonló jelenségeket mutatott (Cirelli és Tononi 2008; Siegel 2008). Általánosságként elmondható, hogy a főként a látásuk révén tájékozódó állatok elsősorban éjjel alszanak (diurnális állatok), míg a fejlett szaglással rendelkező állatok, mint pl. az egér és a patkány, pedig nappal (nokturnális állatok).

Mind a cirkadián ritmicitás (C-process), mind pedig a homeosztatikus szabályozás (S-process) nagyon fontos kritériumai az alvás meghatározásának (Borbely 1982). A homeosztatikus szabályozás lényege, hogy az aktuális éber időszakot követő alvásszükséglet arányos az ébren töltött idővel, vagyis egy hosszabb ébrenléti periódust követően a szervezet az alvás hosszának megnövelésével pótolja a kimaradt alvás egy részét. Ezt bizonyítja az alvásmegvonás után tapasztalható kompenzáló (rebound - visszacsapás) folyamat is: hosszantartó ébrenlétre kényszerített kísérleti személyek valóban többet aludtak a kontroll alváshosszhoz képest (Bódizs 2000). A cirkadián ritmus fontos jellemzője, hogy az alváshajlandóság megnövekszik a nap bizonyos szakaszaiban. Diurnális állatfajok esetén az alváshajlandóság éjszaka nő meg, míg a nokturnális állatok esetén ez a nappali időszakra esik. Embernél az éjszakai álmosság mellett, egy kora délutáni álmossági periódus is megfigyelhető (szemicirkadián ritmus (Broughton 1989)).

3.2.1 Az alvás szerepe

Az alvás szerepével kapcsolatban jelenleg több hipotézis létezik. Feltehetőleg valamilyen alapvető, létfontosságú folyamatot kell szolgálnia, mivel annak ellenére, hogy az élőlény veszélynek teszi ki magát az alvással, egy nagyon is gyakori, mindennapos esemény. Az is ismert, hogy a hosszú távú alvásmegvonásnak nagyon súlyos, akár letális

következményei is lehetnek (Rechtschaffen és mtsai 1983). Az alvás funkciójával kapcsolatos teóriák közül az egyik az energiamegtakarítási hipotézis (Webb 1988; Berger és Phillips 1995). Az elmélet szerint mélyalvás során az anyagcsere kb. 10%-kal csökken az ébrenléti állapothoz képest, de alacsonyabb hőmérsékleten az energiamegtakarítás akár még ennél az értéknél is magasabb lehet. Az alvás feltételezések szerint fontos szerepet játszik a test energiaforrásainak megújításában és szövetek regenerációjában (Oswald 1980), a termoregulációban (Rechtschaffen és Bergmann 1995), az anyagcsere-szabályozásban (Knutson és mtsai 2007; Van Cauter és mtsai 2008) és az immunrendszer egyes folyamataiban (Lange és mtsai 2010). A regenerációs hipotézis azon a megfigyelésen alapszik, hogy hosszabb ideig tartó ébrenlét hatására gyengébb teljesítménnyel tudunk végrehajtani fizikai és mentális feladatokat, mint közvetlenül alvás után. Ez arra utal, hogy az alvás regenerálja a testet és mintegy visszaállítja a szervezetet az előző napi működőképességének szintjére.

A fenti folyamatokhoz azonban nem feltétlenül lenne szükséges az alvás során bekövetkező tudatvesztés, ezek már nyugalmi állapotban, nyugodt ébrenlét (quiet wakefulness) során is megvalósulhatnak. Vagyis feltételezhető, hogy az alvás valamilyen fontos agyi folyamatot is szolgál. Számos, erre utaló elméletet találhatunk a szakirodalomban. Például a mélyalvásban jelentkező lassú hullámú aktivitásnak jelentős szerepe lehet az ébrenlét során megszerzett emlékek konszolidációjában (a memóriakonszolidáció az emléknyomok stabilizálódásának és megerősödésének folyamata) és szinaptikus plaszticitási folyamatokban (Kavanau 1997; Tononi és Cirelli 2006; Diekelmann és Born 2010; Rasch és Born 2013; Tononi és Cirelli 2014).

Giulio Tononi és Chiara Cirelli szinaptikus homeosztázis elmélete szerint alvás során megváltozik a neuronok közötti kapcsolatok súlya, a szinaptikus súlyokat a szervezet visszaállítja az agy számára optimális értékekre (synaptic downscaling). A hipotézisük szerint a szinaptikus kapcsolatok a nappali tanulás során megerősödnek, míg éjszaka, mélyalvásban a lassú hullámú aktivitás hatására ezek a szinapszisok kisebbek lesznek, vagyis a neuronok közötti kapcsolatok gyengülnek. A teória szerint ez a folyamat biztosítja az újonnan kialakult emléknyomok stabilizálódását, valamint helyet csinál újabb emlékek számára (Tononi és Cirelli 2006; Tononi 2009; Hanlon és mtsai 2011; Tononi és Cirelli 2014). A kutatók szerint e nélkül az intelligens szabályozó

mechanizmus nélkül a szinapszisok száma és nagysága olyan méreteket öltene, melynek tápanyag- és energiaellátására a szervezet képtelen lenne.

Mára már széles körben elfogadott az az elmélet, hogy az alvás segíti a tanulást és a memóriakonszolidációt (Maquet 2001; Frank és Benington 2006; Rasch és Born 2013). Több tanulmány is azt találta, hogy több, különböző típusú memóriafeladat esetén is szignifikáns mértékben javul a teljesítmény az alvás hatására. Az azonban még mindig vitatott, hogy mely alvási fázisok vesznek részt a különböző memóriatípusok konszolidációjában és milyen folyamatok valósítják meg ezt. Egyes kutatócsoportok azonban nem találtak bizonyítékot az alvás memóriára és tanulásra kifejtett jótékony hatásával kapcsolatban (Siegel 2001; Vertes és Siegel 2005). Nincs egyértelmű bizonyíték arra vonatkozóan sem, hogy a gyors szemmozgásos (rapid eye movement, REM) alvás jelentős szerepet játszana a memóriakonszolidációban. Ezt támasztja alá az is, hogy nem voltak megfigyelhető tanulási problémáik azoknak a betegeknek, akik gyógyszerek (szerotonin-visszavétel gátlók) vagy lézió okozta REM-deprivációban szenvedtek (Rasch és mtsai 2009).

Létezik még néhány további elmélet az alvás és az agy kapcsolatával összefüggésben. Egyes kutatók szerint az alvás fontos szerepet játszik például az agy szabad gyököktől való detoxifikálásában (Reimund 1994; Inoue és mtsai 1995), glikogén pótlásában (Scharf és mtsai 2008) vagy az ébrenlét alatt felhalmozódott, idegi aktivitás nyomán kialakult bomlástermékek eltávolításában (Xie és mtsai 2013).

Az alvás több létfontosságú folyamatért is felelős, amit az alvásmegvonás káros következményei is megerősítenek. Patkányok hosszabb időn keresztül (több nap) folyamatosan ébren tartva fokozódó anyagcserével és csökkenő testtömeggel reagálnak az alvásmegvonásra, mely egy idő után az állat halálát eredményezheti (Rechtschaffen és mtsai 1983; Everson és mtsai 1989). Az alvásdepriváció legyekben és csótányokban is okozhatja az állat elpusztulását (Shaw és mtsai 2002; Stephenson és mtsai 2007). Viszont úgy tűnik, hogy a galambok képesek túlélni akár hosszabb távú alvásmegvonást is (Newman és mtsai 2008). Emberben a megszokottnál hosszabb távú ébrenlét álmossághoz és ún. mikroalvási periódusokhoz (nagyon rövid, alváshoz hasonló események az ébrenlét során) vezet (Cirelli és Tononi 2008). Többek között a kognitív funkciók gyengülése, remegés, hallucinációk jellemzik az alvásdeprivációt, de a hosszan tartó ébrenlét akár halálhoz is vezethet. Az alvásmegvonással kapcsolatos egyik jól

dokumentált eset során egy 17 éves gimnazista fiú 11 napig volt ébren, William Dement alváskutató felügyelete mellett (Gulevich és mtsai 1966). A fiú néhány rövid hallucinációs periódust leszámítva semmilyen szokatlan viselkedést nem mutatott, és a fiziológiás mutatói is az egészséges tartományon belül maradtak (Siegel 2002). Ezek az eredmények világosan rávilágítanak az egyéni alvásigényeink közti nagy különbségekre.

Nemcsak a túl kevés, hanem a túl sok alvás is káros lehet. Korreláció figyelhető meg az átlagos alváshossz és a halálozási ráta között: a sokat és a keveset alvók között is nagyobb a halálozási arány, mint azok között az emberek között, akik átlagosan napi 7-8 órát alszanak (Bódizs 2000). Azok, akik rendszeresen többet alszanak napi 8-9 óránál, általában feszültebbek és ingerlékenyebbek, mint kevesebbet alvó társaik. Ezzel ellentétben depressziós betegeknél jelentős hangulati javulást lehet elérni, ha megvonják tőlük az éjszaka második felére jellemző, REM-fázisban gazdagabb alvást (Vogel és mtsai 1980).

3.2.2 Az alvás makro- és mikrostruktúrája

A cirkadián és szemicirkadián ritmusokon belül az alvás további ritmicitást mutat, melyet ultradián ritmusnak nevezünk. Az alvás ultradián komponense emberben kb. 90 perc hosszú (Bódizs 2000) és két részre osztható: gyors szemmozgásos periódusra (REM) és gyors szemmozgás nélküli (non-rapid eye movement, NREM) fázisra. NREM alatt nagyfeszültségű, alacsony frekvenciájú, szinkronizált aktivitás detektálható az EEG-n, míg a REM fázist alacsony feszültségű, magas frekvenciás, deszinkronizált háttértevékenység jellemzi. Az NREM fázis további négy (Rechtschaffen és Kales 1968), illetve az újabb felosztás szerint három (Iber és mtsai 2007) fázisra osztható, melyek a felszínes alvástól a mélyalvásig terjednek. Az éjszaka első fele során az NREM-alvás dominál, amit az éjszaka második felében egyre hosszabb REM fázisok váltanak fel. Az alvási fázisok az élőlények között hasonló, de az adott élőlényre specifikus mintázatot követnek: a fázisok tulajdonságai (pl. hossz, dinamika) fajról fajra változhatnak. Az alvási stádiumok meghatározására különböző kritériumokat alkalmaznak: minden stádium rá jellemző agyi elektromos aktivitással, izomtónussal bír. Rechtschaffen és Kales 1968-ban írta le ezeket a kritériumokat. Az általuk felállított osztályozási rendszer négy NREM stádiumot különít el (Rechtschaffen és Kales 1968). Egészen a közelmúltig ezt a fajta klasszifikációt használták az alvásfázisok elkülönítésére, azonban 2007-ben az American

Academy of Sleep Medicine (AASM) egy új ajánlást adott ki, melyben az NREM-alvás 3. és 4. stádiumát összevonták egy közös NREM3-as stádiummá (Iber és mtsai 2007).

Az 1. stádium (NREM1) átmenet az ébrenlétből az alvásba. Ez a szakasz az össz-alvásidőnek kb. 5-10%-át teszi ki. A szendergő állapotra jellemző alfa hullámokat (8-12 Hz) fokozatosan felváltják a lassabb théta hullámok (4-8 Hz). Hirtelen izomrángások fordulhatnak elő ebben a stádiumban. Pozitív meredek tranziensek jelenhetnek meg az okcipitális elvezetéseken (Gibbs és Gibbs 1950), melyek kapcsolatban állhatnak az elalváskor jelentkező hipnagóg hallucinációkkal. NREM1 alatt csökken az izomtónus, szabályosabbá válik a légzés és a szívverés, valamint lassú, úszó szemmozgások figyelhetőek meg. Az agyi anyagcsere-folyamatok, a cerebrális véráramlás és az agy hőmérséklete is csökken.

A 2. stádium (NREM2) vagy felületes alvás teszi ki az alvással töltött időnk nagy részét (45-55%). A talamokortikális hálózatokban kialakuló alvási orsók (12-14 Hz) és spontán, vagy külső hangingerekre válaszként megjelenő K-komplexek jellemzik. Megszűnik a külső környezet tudatos észlelése. Az elektromos háttértevékenység lelassul, a théta hullámokat felváltja a delta ritmus (1-4 Hz). A fiziológiás mutatók (izomtónus, szívritmus, légzésritmus) értékei tovább csökkennek, megszűnnek a lassú szemmozgások.

A mélyalvásnak, vagy lassú hullámú alvásnak (slow-wave sleep, SWS) is hívott 3. stádiumban (NREM3) tovább nő az 1-4 Hz frekvenciájú delta hullámok teljesítménye, valamint megjelennek az 1 Hz alatti lassú hullámok. Csökken a K-komplexek és az alvási orsók gyakorisága, valamint tovább csökken az izomtónus. Az alvásban töltött időnk 15-25%-át töltjük ebben a stádiumban. Mélyalvás alatt az agy külvilággal való kapcsolata korlátozott, a szenzoros ingerek feldolgozása módosult az ébrenléti állapothoz képest. NREM3-ban alakul ki az alvajárás és az éjszakai felriadás (night terror) is. Bizonyos mennyiségű 3. stádiumú alvás után az alvás mélyülésének folyamata megáll, majd a korábbi stádiumok fordított sorrendben történő, újbóli megjelenésével az alvás egyre felületesebbé válik. Az alvás felszálló szára azonban rövidebb ideig tart és az esetek nagy részében az ébredés helyett a REM fázis következik.

A REM alvási fázist először Aserinsky és Kleitman írta le 1953-ban emberben (Aserinsky és Kleitman 1953; Gottesmann 2001). Néhány évvel később Dement is megfigyelte ezt az alvási fázist macskákon (Dement 1958). A teljes alvásidő kb. negyede

zajlik REM fázisban. Ezt a fázist az elektrookulogramon megfigyelhető gyors szemmozgások jellemzik, melyről a fázis a nevét is kapta. Az EEG aktivitás deszinkronizált, vagyis az alacsony amplitúdójú, magasabb frekvenciakomponensek dominálnak. A szakavatott szemnek nagyon hamar feltűnik, hogy a REM alatti agyi aktivitás sok tekintetben hasonlít az ébrenlét alatt megfigyelhető aktivitáshoz, ezért ezt az állapotot paradox alvásnak is hívják (Jouvet 2004). Az izomtónus teljes hiánya (izomatónia), ponto-genikulo-okcipitális (PGO) hullámok, valamint 4-10 Hz-es hippokampális théta ritmus jellemzik. Kisebb végtagmozgások és mioklónusos rángások is előfordulhatnak REM alatt. A szív- és légzésritmus felgyorsul és szabálytalanná válik, nő az agy hőmérséklete, fokozódik az agyi véráramlás. Általában az éjszaka második felében gyakrabban fordul elő és az egymást követő REM fázisok hosszúsága is növekszik. Eddigi kutatások alapján ez a fázis fontos szerepet játszik térbeli és procedurális emlékek konszolidációjában, valamint az álmodás is főként a REM-alvás alatt jelentkezik.

Az alvás a különböző stádiumokon belül is tovább tagolható kisebb egységekre: az alvási fázisok, mint makroállapotok, mikroállapotokból épülnek fel (Halasz 1998). Ezek a mikroösszetevők rövid idejű ébredési reakciókat vagy alvást fenntartó folyamatokat jelezhetnek (Bódizs 2000). A legismertebb mikroállapotok közé tartoznak a K-komplexek, a mikroébredések, az alvási orsók, a PGO hullámok és a ciklikusan váltakozó mintázatok (cyclic alternating pattern, CAP).

A K-komplexek az alvási EEG-n megfigyelhető olyan polifázisos, nagy amplitúdójú események, melyek főként az NREM-alvás 2. stádiumában fordulnak elő (Bódizs 2000). Általában két vagy három fázisból állnak, és egy rövid, az agykéreg felszínén pozitív polaritású tranziens komponenssel indulnak, amit egy lassú, nagy amplitúdójú, felszíni negativitás követ, 350 és 550 ms latenciájú csúcsokkal. A K-komplexeket gyakran kísérik alvási orsók, alfa orsók vagy delta hullámok. Több modalitás ingerlésével is kiválthatók, de spontán módon is kialakulhatnak (Colrain 2005; Halasz 2005). A K-komplexek szerepéről több elmélet is kialakult. Egyrészt ébredési folyamatokat is jelezhet, másrészt alvást védő folyamatként is szolgálhat. Az első esetben a K-komplexek ébresztő ingerekre adott kérgi válaszok lehetnek, perifériás szimpatikus aktivációval, megnövekedett szívritmussal és vérnyomással társulva. Amzica és Steriade szerint viszont ezek a jelenségek a mélyalvásban regisztrálható lassú oszcilláció egy-egy

ciklusának izolált megjelenései lehetnek (Amzica és Steriade 1998). Emberből elvezetett K-komplexek rétegelemzése is az „alvásvédő folyamat” elméletet támasztja alá (Cash és mtsai 2009), mivel ezeknek a jelenségeknek a kérgi mélységi profilja nagyon hasonlít a lassú oszcilláció hiperpolarizációs fázisának (down-state) rétegszerkezetére. A down-state-ek és a K-komplexek alatt is nagyon alacsony a sejtaktivitás az agykéregben, ami inkább az alvás fenntartására, mintsem ébredési reakcióra utal.

A mikroébredések néhány másodperc hosszúságú változások az elektromos háttértevékenységben, mely során delta hullámok, alvási orsók és K-komplexek jelenhetnek meg az EEG-ben, fokozódik a szív- és a légzésritmus, valamint szemmozgások és testhelyzet-változtatások is megfigyelhetőek. Ebben a rövid időszakban az alvó agy érzékenyebb a környezeti ingerekre és a feldolgozott ingerek jelentőségétől függően elősegíthetik az ébredést vagy az alvás fenntartását (Bódizs 2000). A spontán mikroébredések gyakorisága az alvásciklusok leszálló szárában csökken, a felszálló szárban viszont növekszik. Két típusát különböztethetjük meg: a lassú szinkronizációval kísért mikroébredéseket és a lassú szinkronizáció nélküli mikroébredéseket. Utóbbiakat hívják még átmeneti aktivációs mintázatnak is és az alvás bármely fázisában megjelenhetnek, míg előbbiek csak az NREM fázis alatt fordulhatnak elő (Bódizs 2000).

Az alvási orsók talamokortikális eredetű fázisos jelenségek az EEG-n. Ezek az általában 12-14 Hz-es, növekvő, majd csökkenő amplitúdójú hullámok az NREM fázisban jelennek meg, főként felületes alvásban (De Gennaro és Ferrara 2003). Számuk az éjszaka előrehaladtával folyamatosan csökken. Az alvási orsókat frekvencia alapján két csoportra szokták bontani: gyors (12-15 Hz) és lassú (9-12 Hz) orsókra (Molle és mtsai 2011).

A CAP az alvásmélységnek megfelelő háttértevékenység és különféle ébredési jelenségek percenkénti váltakozásából áll (Terzano és mtsai 1985; Bódizs 2000). Utóbbiak a CAP A-fázisát alkotják, előbbiek pedig a B-fázist. Az A-fázisnak különböző fokozatai vannak, ezek átlagos hossza 10-12 másodperc. Az A1-es fokozatot reaktív szinkronizációs folyamatok (alfa-hullámok, K-komplexek stb.) jellemzik, az A2-őt lassú szinkronizációval kísért mikroébredések, az A3-as fokozatot pedig lassú szinkronizáció nélküli mikroébredések képezik (Bódizs 2000). A B-fázisok kb. 20-30 másodperc hosszúságúak.

3.2.3 Alvás és ébrenléti központok az agyban

Egyes kutatók szerint az alvást az agyban található alvást támogató (Economo 1929) és ébrenlétet segítő (Moruzzi és Magoun 1949) központok kölcsönhatása alakítja ki, vagyis az alvás egy aktív és nem passzív folyamat (Steriade és McCarley 2005). Továbbá, több olyan kémiai anyagot (ún. alvásfaktort) is találtak, melyek hipnogén hatásúak, vagyis alvást idéznek elő (pl. tumor-nekrózis faktor (TNF), interleukin-1 (IL-1), adenozin, nitrogén-oxid, prosztaglandin D2 (Krueger és mtsai 2008)), ami szintén az aktív hipotézist támasztja alá.

Az egyik elsőként felfedezett alvás-ébrenlét szabályozásért felelős agyi központ a felszálló retikuláris aktiváló rendszer (ascending reticular activating system, ARAS) volt (Moruzzi és Magoun 1949). Többek között kimutatták, hogy az ARAS elektromos ingerlésével az altatás alatti szinkronizált elektromos tevékenység az ébrenlétre jellemző deszinkronizált aktivitásra vált át, mely az egész agykérgen megfigyelhető és az ingerlés időtartama alatt végig fennmarad. Az ARAS az agytörzsből kiinduló és a talamuszban, valamint az agykéregben végződő pályákból áll, és különböző neurotranszmitterek kibocsátását szabályozza. A rendszer több részre osztható: az acetilkolinerg pályák a pedunculopontine tegmentumból (PPT), a laterodorzális tegmentumból (LDT) és a bazális előagyból erednek. A noradrenerg pályák a hídban található locus coeruleusból (LC), a szerotonerg rendszer az agytörzsben található raphe magokból (dorsal raphe, DC), a hisztaminerg rendszer a poszterior hipotalamusz tuberomammilláris magjából (Szymusiak és mtsai 2007), az orexinerg/hipokretinerg pályák pedig a laterális hipotalamuszból (Ohno és Sakurai 2008) indulnak ki. Ezeknek a rendszereknek az együttműködése és aktivitása tartja fent az éber vagy alvó állapotot.

Ébrenlét során mind a kolinerg, mind a monoaminerg (noradrenerg, szerotonerg, hisztaminerg) rendszerek aktívak (Pace-Schott és Hobson 2002; Steriade és McCarley 2005; Jones 2008). NREM-alvás során mind a két rendszer hatása csökken, míg REM-alvás alatt a monoaminerg rendszer teljesen inaktiválódik, a kolinerg neuronok viszont megnövekedett tüzelési aktivitást mutatnak (Pace-Schott és Hobson 2002; Steriade és McCarley 2005). Az orexinerg neuronok serkentő bemenetet adnak az ébrenlétet fenntartó rendszereknek, valamint az agykéregnek. Az orexinerg rendszer nem megfelelő működése jelentős szerepet játszik a narkolepszia kialakulásában is (Chemelli és mtsai 1999; Nishino és mtsai 2000).

A poszterior hipotalamuszban leírtak egy alvást támogató központot is, a ventrolaterális preoptikus magot (ventrolateral preoptic nucleus, VLPO), melyben GABAerg neuronok találhatóak. Elektrofiziológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a VLPO-ban elhelyezkedő neuronok néhány másodperccel az SWS kialakulása előtt kezdenek el tüzelni, és az alvás mélyülésével növelik a tüzelési frekvenciájukat (Steriade és McCarley 2005). A VLPO oda-vissza összeköttetésekkel rendelkezik az ARAS hisztaminerg, orexinerg, szerotonerg és noradrenerg neuronjaival (Szymusiak és McGinty 2008). Ezek a reciprok kapcsolatok mindkét irányban gátló hatásúak, tehát egyrészt az alvást segítő VLPO gátolja az ébrenlétet támogató rendszereket, másrészt az utóbbi rendszerek is gátolják aktivitásukkal a VLPO magban található idegsejteket. Ez a kölcsönös negatív visszacsatoláson alapuló szerkezet egy egyszerű elektronikus áramkörre, az ún. „flip-flop”-ra emlékeztet. Ez a kétállapotú kapcsoló biztosítja a nap folyamán, hogy a két éberségi állapot közül egyszerre mindig csak az egyik legyen jelen (Saper és mtsai 2001; Lu és mtsai 2006). A kapcsoló aktuális állapota akár már egyetlen kérgi neuron nagyfrekvenciás burst tüzelése révén is átbillenthető egyik állapotból a másik állapotba (Li és mtsai 2009).

A VLPO mellett a laterális hipotalamuszban találtak még olyan GABAerg és melanin-koncentráló hormont (melanin-concentrating hormone, MCH) tartalmazó sejteket is, melyek alvás alatt tüzeltek (Hassani és mtsai 2009; Hassani és mtsai 2010). A bazális előagyban pedig a kolinerg sejtek mellett GABAerg sejtek is találhatóak, amelyek szintén alvás alatt aktívak (Jones 2008).

A REM-alvás kialakításában a hídi-nyúltvelői régiónak fontos szerepe van (Siegel és mtsai 1984; Vanni-Mercier és mtsai 1989). A hídi retikuláris formációban találhatóak olyan sejtek, melyek megnövelik a tüzelési rátájukat a REM-alvás kezdete előtt és REM alatt folyamatosan tüzelnek (REM-ON sejtek), míg más sejtek csökkentik a tüzelési frekvenciájukat a REM-alvás kialakulása előtt és REM alatt végig alacsonyabb frekvenciával tüzelnek (REM-OFF neuronok) (Hobson és mtsai 1975). A monoaminerg rendszer (LC, DR) REM-OFF sejteket tartalmaz: maximális aktivitás figyelhető meg ezekben a sejtekben ébrenlét alatt, mely nagymértékben csökken NREM-alvás alatt és majdnem teljesen megszűnik REM-alvásban (Aston-Jones és Bloom 1981; Lydic és mtsai 1987). Az LDT/PPT kolinerg neuronjai két alpopulációra oszthatóak: REM-ON sejtekre, melyek a REM-alvás kezdete előtt kezdenek tüzelni és wake-ON/REM-ON sejtekre

melyek ébrenlét és REM-alvás alatt is tüzelnek (Thakkar és mtsai 1998). Az LC ingerlése csökkenti, míg az LDT/PPT ingerlése növeli a REM-alvásban töltött időt (Thakkar és mtsai 1996; Datta és Siwek 1997). Az LC és az LDT/PPT között reciprok anatómiai kapcsolatok vannak és ez a neurokémiai kölcsönhatás a monoaminerg és kolinerg neuronok között alapvető szerepet játszik a REM-alvás generálásában és fenntartásában (Hobson és mtsai 1975; Steriade és McCarley 2005). Sok tanulmány azt mutatja, hogy a GABA-nak is központi szerepe van a REM fázis létrehozásában, feltételezhetően a hídi REM-OFF és REM-ON sejtek modulációja által (Pal és Mallick 2010). A GABA mind az LC-ben, mind a PPT-ben a REM-alvást elősegítő hatású (Nitz és Siegel 1997; Mallick és mtsai 2001; Torterolo és mtsai 2002; Pal és Mallick 2004; 2009).

3.2.4 Lokális alvás

Jelenlegi ismereteink szerint az alvás makroszkópikusan nézve egy globális jelenség, az egész organizmusra kiterjedő viselkedésbeli és fiziológiás változásokkal. A neuronhálózatok szintjén azonban a kérgi oszlopok lokálisan, akár egymástól függetlenül, önállóan is képesek lassú hullámú aktivitás kifejezésére. Ennek a lokálisan kialakuló lassú hullámú aktivitásnak a mértékét főként a terület múltbeli aktivitása határozza meg.

A lokális alvásra számos meggyőző kísérleti bizonyítékot találtak (Murphy és mtsai 2011; Nir és mtsai 2011; Vyazovskiy és mtsai 2011). Például az alvás lokális neuronhálózatokban történő megjelenésére utal, hogy az ébrenlét során nagymértékű aktivációnak kitett agykérgi terület a lassú hullámú aktivitás megnövekedését vonja maga után ugyanazon a kérgi területen alvás alatt (Kattler és mtsai 1994; Vyazovskiy és mtsai 2000). Mukhametov és munkatársai megfigyelték, hogy bizonyos tengeri emlősök agyának csak az egyik féltekéje alszik egyszerre (unihemiszférikus alvás) (Mukhametov és mtsai 1977), vagyis nem látható SWA mind a két agyféltekéjükben egy időben. A lassú hullámokat mutató agyféltekével ellentétes oldalon található szemük csukva van, míg a másik oldalon lévő nyitva.

Ha feltételezzük azt, hogy a lokálisan megnövekedett lassú hullámú aktivitás az ébrenlét során megerősödött szinaptikus kapcsolatok következménye, akkor feltételezhető ennek az ellenkezője is, vagyis a szinaptikus kapcsolatok gyengülése az SWA teljesítményének a csökkenését vonja maga után. Ennek a hipotézisnek az ellenőrzésére kísérleti személyek egyik karját mozgásképtelenné tették egy napra, mely a

megfelelő kérgi területen a szinaptikus súlyok csökkenését eredményezte (Huber és mtsai 2006). Az immobilitási periódust követő alvás során az SWA teljesítménye jelentősen csökkent a rögzített karhoz képest ellentétes oldalon elhelyezkedő kérgi terület fölött. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az alvás lokális szabályozása és az agykérgi plaszticitás között kapcsolat áll fenn, mely tanulás hiányában is megfigyelhető (Huber és mtsai 2006).

A fenti eredmények tehát azt mutatják, hogy az SWA mennyisége és teljesítménye korrelál a szinaptikus súlyokkal. Minél erősebbek a szinaptikus kapcsolatok, annál több lokális lassú hullám figyelhető meg és ennek a fordítottja is igaz. A Tononi és Cirelli által javasolt, korábban már említett elméletet szerint a lassú hullámok szerepe a szinaptikus súlyok csökkentése, és ezáltal a szinaptikus kapcsolatok erősségének homeosztatikus szabályozása (Tononi és Cirelli 2006; 2014).

3.2.5 A lassú hullámú alvás alatt kialakuló lassú oszcilláció

A lassú hullámú alvás tekinthető az alvás legmélyebb fázisának (NREM3), mely főként az éjszaka első felében dominál. Alacsony izomtónus, alacsony ébreszthetőség és az EEG-n látható nagy amplitúdójú, alacsony (< 2 Hz) frekvenciájú hullámok jellemzik.

A mélyalvásra jellemző 1 Hz körüli lassú oszcillációt (slow oscillation, SO) már 1981-ben leírták altatott patkányok striátumában (Wilson és Groves 1981), azonban az első részletes vizsgálatokat Mircea Steriade és munkatársai végezték el altatott macskákon (Steriade és mtsai 1993b; Steriade és mtsai 1993d; c). Később más emlősökben és emberben is kimutatták ezt a ritmust (Achermann és Borbely 1997; Crunelli és mtsai 2012). A lassú oszcilláció vagy lassú ritmus regisztrálható altatásban, természetes alvás során (Destexhe és mtsai 1999) és nyugodt ébrenlét alatt (Petersen és mtsai 2003). Az SO indukálható és vizsgálható agykérgi és talamokortikális agyszeletekben, in vitro körülmények között is (Sanchez-Vives és McCormick 2000; Hughes és mtsai 2002; MacLean és mtsai 2005; Blethyn és mtsai 2006; Cunningham és mtsai 2006; Mann és mtsai 2009; Rigas és Castro-Alamancos 2009; Fanselow és Connors 2010; Yassin és mtsai 2010; Tahvildari és mtsai 2012; Wester és Contreras 2012; Favero és Castro-Alamancos 2013; Neske és mtsai 2015; Salkoff és mtsai 2015). Különböző nagyságú, a többi agykérgi területtől izolált kérgi szövetrészben (cortical slab) is detektálható az SO, in vivo (Timofeev és mtsai 2000).

A lassú oszcillációt az agy több területén is lehet regisztrálni: gyakorlatilag minden neokortikális területen (gliasejtekben és neuronokban egyaránt (Steriade 2003; Poskanzer és Yuste 2011)), a talamuszban (minden talamokortikális és retikuláris idegsejtben (Steriade 2003)), a hippokampuszban (Wolansky és mtsai 2006; Dickson 2010; Sharma és mtsai 2010; Moroni és mtsai 2012), a törzsdúcokban (Tseng és mtsai 2001), a cerebellumban (Ros és mtsai 2009) és az amigdalában (Windels és mtsai 2010). Több agyterületen találhatóak még olyan sejtcsoportok, melyek valószínűleg a kérgi SO hatására maguk is 1 Hz körüli aktivitást mutatnak (Schweimer és mtsai 2011; Eschenko és mtsai 2012).

A lassú oszcillációt az idegsejtek membránpotenciáljának két érték közötti ingadozása hozza létre: egy depolarizált állapot (ahol a membránpotenciál közelebb van a tüzelési küszöbfeszültséghez) alternál egy hiperpolarizált állapottal (ahol a membránfeszültség negatívabb az átlagos értékhez képest és gyakorlatilag nem detektálható sejttüzelés) (Steriade és Timofeev 2003). A depolarizált állapotot aktív fázisnak vagy ’up-state’-nek nevezzük, a hiperpolarizált szakaszt pedig inaktív fázisnak vagy ’down-state’-nek hívjuk. Macska vagy patkány agykérgéből lamináris extracelluláris multielektródával elvezetett agykérgi lokális mezőpotenciál (local field potential, LFP) az aktív fázisok alatt a felső kérgi rétegekben pozitív előjelű, míg a mélyebb kérgi rétegekben negatív polaritású (Toth és mtsai 2008; Chauvette és mtsai 2010). Az inaktív fázisok során fordított helyzet áll fenn: a kéreg felszínéhez közel negativitás, infragranulárisan pedig pozitivitás figyelhető meg. Megfigyeléseink alapján patkányokban a polaritásváltás helye a II./III. rétegbe tehető. Az up-state-ek alatt gyorsabb oszcillációk is megjelennek (pl. orsók, gamma ritmus), míg a down-state nem tartalmaz más ritmusokat (Clemens és mtsai 2007).

Down-state alatt a kérgi neuronok membránpotenciálját főként a szivárgó kálium konduktanciák dominálják (Wilson és mtsai 1983; Metherate és Ashe 1993; Contreras és mtsai 1996; Timofeev és mtsai 1996; Wilson és Kawaguchi 1996; Timofeev és mtsai 2001). Az aktív fázisok alatt a serkentés és gátlás szintje lehet kiegyensúlyozott (Shu és mtsai 2003; Haider és mtsai 2006) vagy gátlás által dominált (Rudolph és mtsai 2007), a kísérleti körülményektől függően. A gátló interneuronok jelentős szinkronizáló hatással vannak a lassú oszcilláció alatti neuronális aktivitásra (Chen és mtsai 2012). Az up-state-ekről azt feltételezik, hogy mikroébredési szakaszok, mivel a sejtek tónikus, irreguláris

tüzelése hasonlít az ébrenlét alatt aktív sejtek tüzelési mintázataihoz (Destexhe és mtsai 2007). A down-state-eket pedig olyan inaktív állapotoknak tartják, melyek kiszűrik a kéregbe jutó ingereket, vagyis hasonlóan a K-komplexekre vonatkozó egyik elmélethez, alvásvédő jelenségeknek tekinthetőek.

A lassú hullámú alvás alatt kialakuló nagymértékben szinkronizált lassú oszcilláció egymástól távolabb elhelyezkedő kérgi területek között is nagyfokú időbeli korrelációt mutat (Destexhe és mtsai 1999). Az SO egy haladó hullámként is leírható, mely az agykéreg egy adott pontjáról indul és innen különböző irányokba terjedhet tovább. Ezt a haladó hullám tulajdonságot patkányokban (Luczak és mtsai 2007; Fucke és mtsai 2011) és emberben (Massimini és mtsai 2004; Hangya és mtsai 2011; Botella-Soler és mtsai 2012) is megfigyelték. Humán vizsgálatokban kimutatták, hogy az EEG-vel regisztrált lassú hullámok az agykéreg bármely területén kialakulhatnak, és tetszőleges irányba terjedhetnek. Leggyakrabban azonban a frontális területeken jöttek létre, majd anteroposzterior irányú terjedéssel a frontális agyi területekről a hátsó kérgi régiók felé haladtak. Hasonló hullámterjedés megfigyelhető volt állatokban is (Ferezou és mtsai 2007; Mohajerani és mtsai 2010; Mohajerani és mtsai 2013).

Nagy sűrűségű, 256 elektródát tartalmazó EEG elvezetésekkel és forráslokalizációs módszerekkel azt is kimutatták, hogy a lassú hullámok meghatározott kortikális struktúrákon keresztül terjednek, azonban az egyes hullámok lokalizációja egyedi (Murphy és mtsai 2009). A több csúccsal rendelkező hullámok több különböző helyről eredhetnek (Riedner és mtsai 2007). A hullám-indulások jellemző területeinek a laterális sulcust és a mediális cingulate gyrust találták. A terjedésben résztvevő fő területek az anterior cingulate, a cingulate, a poszterior cingulate, a precuneus, a bal inferior frontális gyrus és az insula voltak. Habár a legtöbb hullám anterior területekről poszterior struktúrák felé terjedt, az ellentétes irányba való terjedés is előfordult (Murphy és mtsai 2009).

A lassú oszcilláció spontán módon alakul ki altatás alatt és a természetes alvás mélyalvás fázisában, de külső ingerléssel is kiválthatók a lassú ritmus ciklusai. A korábban ismertetett K-komplexek is kiválthatók alvás alatt adott szenzoros ingerekkel. Kimutatták, hogy a hangingerlés képes vezérelni a lassú oszcillációt a talamuszban (He 2003; Gao és mtsai 2009), vagyis a lassú oszcilláció frekvenciájához hasonló ütemben érkező hangingerek az esetek nagy százalékában kiváltanak egy-egy up-state-et, és így az

SO fázisai az ingerekhez kötötten alakulnak ki. Az SO indukálható transzkraniális mágneses ingerléssel (TMS) és akusztikus ingerléssel emberben (Massimini és mtsai 2007; Ngo és mtsai 2013), valamint elektromos, optogenetikai, és szomatoszenzoros ingerléssel patkányban (Marshall és mtsai 2006; Hasenstaub és mtsai 2007; Vyazovskiy és mtsai 2009; Ozen és mtsai 2010; Civillico és Contreras 2012; Kuki és mtsai 2013). A TMS-el kiváltott lassú hullámok mind morfológiájukban, mind terjedési tulajdonságaikban hasonlítanak a spontán lassú hullámokhoz (Massimini és mtsai 2007).

3.2.5.1 A lassú oszcilláció lamináris generátorai

Az SO alatti idegi aktivitás átfogóbb, kérgi rétegek közötti vizsgálatát először vadászgörény vizuális és prefrontális kérgéből készített szeletpreparátumon vizsgálták, melyben a mesterséges agy-gerincvelői folyadék ionösszetételének kismértékű módosításával egy ~0.3 Hz körüli ritmikus, spontán hálózati aktivitást lehetett indukálni. Kimutatták, hogy up-state során legtöbb esetben először az infragranuláris rétegekben (főként az V. rétegben) tüzelnek a neuronok, és innen terjed tovább az aktivitás a szupragranuláris rétegek felé egy relatíve hosszan tartó (~100 ms körüli), laminák közötti késleltetéssel (Sanchez-Vives és McCormick 2000). In vivo kísérletekben azt találták, hogy az up-state kezdethez kötött kezdeti tüzelést, intracelluláris membránpotenciál- vagy LFP változást bármelyik rétegben detektálni lehetett, kicsi, rétegek közötti késleltetéssel (~10ms). A legkorábbi aktivitás azonban átlagosan az infragranuláris rétegekben alakult ki (Sakata és Harris 2009; Chauvette és mtsai 2010). Emberben nem találtak hasonló, infragranuláris dominanciájú up-state iniciációt (Csercsa és mtsai 2010).

A lamináris agyi struktúrákban (mint pl. a hippokampusz vagy az agykéreg) kialakuló ritmusok generátorainak vizsgálatához a lokális mezőpotenciálból számolható áramforrás-sűrűséget (current source density, CSD) használhatjuk, mellyel a lokálisan generált szinaptikus és transzmembrán áramok téridőbeli mintázatát becsülhetjük meg (Mitzdorf 1985). Ezek a szummált áramok folyhatnak az extracelluláris térből befelé a sejtbe, vagy az intracelluláris térből kifelé az sejtek közötti térbe. Előbbi áramokat áramnyelőknek (sink), utóbbiakat áramforrásoknak (source) nevezzük. Az idegrendszerben kialakuló áramokat különböző ionok (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-) mozgása hozza létre. Áramnyelő esetén pozitívan töltött ionok vándorolnak a sejtmembránon keresztül a sejtbe, vagy negatív töltésű részecskék a sejtből az extracelluláris térbe. Áramforrás esetén a folyamat ugyanez, csupán az áramot létrehozó részecskék áramlásának iránya

ellentétes az áramnyelőnél leírtakkal. A befelé folyó áram eredhet a membránok szinaptikus depolarizációjából (aktív CSD komponens), de jelentheti egy aktív áramforrás által meghatározott áramkör passzív záródását. Az áramforrás is értelmezhető aktív hiperpolarizációként, de akár passzív kiegyenlítődési áramot is jelenthet. Az aktív áramforrás lehet szinaptikusan hajtott hiperpolarizáció vagy nem szinaptikus eredetű utóhiperpolarizáció. Az áram passzív vagy aktív volta azonban pusztán a CSD-ből nem deríthető ki, ehhez egyidejű soksejt-aktivitás (multiple-unit activity, MUA) elvezetés vagy neurofarmakológiai manipuláció szükséges.

A lassú oszcillációt eddig főként macskákban, patkányokban és emberekben tanulmányozták. Altatott macskákban az agykéreg középső rétegeibe lokalizálták a legnagyobb mértékű áramnyelőt az aktív fázisok alatt (Steriade és Amzica 1996), míg természetes alvás során az infragranuláris rétegekben találtak a sejtekbe irányuló áramokat (Chauvette és mtsai 2010). K-komplexek esetén, melyek az SO egy individuális ciklusának tekinthetőek, egy erőteljes, a felső kérgi rétegben található áramnyelő és gyengébb mély rétegi áramnyelők jelentek meg macskákban (Amzica és Steriade 1998). Patkányok vizsgálata uretán altatásban a felső és középső kérgi rétegben mutatott ki áramnyelőt a hallókéregben (Sakata és Harris 2009) és a szomatoszenzoros kéregben (Toth és mtsai 2008) az aktív fázis során, melyet egy agyfelszínhez közeli és egy mély rétegi áramforrást határolt körbe. Természetes SWS alatt az áramok eloszlása hasonló volt (Sakata és Harris 2009). Emberben az up-state alatt egy markáns forrás-nyelő dipólust találtak a szupragranuláris rétegekben, míg az infragranuláris rétegekben nem volt detektálható jelentősebb szinaptikus aktivitás (Csercsa és mtsai 2010). A lassú oszcilláció inaktív fázisa alatt az áramok mintázata szinte teljesen megegyezett az up-state-ek alatti eloszlással, de a polaritásuk minden esetben ellentétes volt.

Több közelmúltbeli tanulmány is rámutatott a rágcsálók infragranuláris agykérgi rétegeinek a lassú oszcillációban betöltött fontos szerepére. Wester és Contreras lassú hullámú aktivitást kifejező patkány talamokortikális agyszeleteken intracelluláris elvezetésekkel és feszültségérzékeny festéken alapuló optikai képalkotással kimutatta, hogy az infragranuláris rétegek szükségesek az aktivitás horizontális terjedéséhez (Wester és Contreras 2012). Kísérleteik során blokkolták a mély kérgi rétegek lokális populációjának az aktivitását és megfigyelték, hogy az érintetlen II./III. rétegek nem voltak képesek önfenntartó aktivitást létrehozni vagy a szomszédos kolumnákból ide

érkező aktivitást továbbterjeszteni. Ezzel ellentétben a szupragranuláris rétegek blokkolása nem okozott nagymértékű változást az up-state-ek elindításában, és a terjedésben is csak egy kismértékű horizontális késleltetés volt megfigyelhető. Hasonló eredményeket mutattak ki in vivo optogenetikai ingerléssel is patkányokban: az V. rétegi piramissejtek fénnyel történő aktivációja a spontán up-state-ekhez hasonló hálózati aktivitást eredményezett, míg ugyanezeknek a sejteknek a fotoinhibíciója jelentős mértékben csillapította a spontán lassú oszcillációt (Beltramo és mtsai 2013). Ezzel ellentétben a szupragranuláris (II./III. rétegi) piramissejtek optikai serkentése vagy gátlása csak kismértékű hatással volt az aktuális hálózati aktivitásra. Az V. rétegben található neuronok jelentőségét Stroh és munkatársai által egérben elvégzett in vivo optogenetikai vizsgálatok is megerősítették (Stroh és mtsai 2013). Kimutatták, hogy az V. rétegi piramissejtek egy kis csoportjának rövid idejű fotoexcitációja már elégséges egy globális Ca^{2+}-hullám (up-state) létrehozására. Ezek a hullámok távoli agyi területekre is szétterjedtek.

A ’Megbeszélés és következtetések’ fejezetben a saját eredményeink és a szakirodalomban fellelhető eredmények összehasonlítása során bővebben is írok az V. réteg lassú oszcillációban betöltött szerepéről, valamint a lassú oszcilláció alatt kialakuló kérgi áramokról.

3.2.5.2 A lassú oszcilláció keletkezési mechanizmusa

A lassú oszcillációt hagyományosan a neokortikális hálózatok által generált ritmusnak tartják. Ennek okai a következők: egyrészt megmarad a neokortexben talamikus roncsolás után is (Steriade és mtsai 1993c), de megszűnik a talamuszban dekortikáció után (Timofeev és Steriade 1996). Az intrakortikális szinaptikus kapcsolatok megszüntetése pedig a távoli kérgi területek közötti szinkronizáció megszűnését vonja maga után (Amzica és Steriade 1995).

Az elmúlt pár év kutatási eredményei azonban megkérdőjelezték az oszcilláció tisztán kérgi eredetét (Crunelli és Hughes 2010; David és mtsai 2013; Sheroziya és Timofeev 2014; Crunelli és mtsai 2015). Crunelli és Hughes rámutatott a talamusz jelentős szerepére az SO generálásában (Crunelli és Hughes 2010). Azzal érveltek, hogy az a lassú oszcilláció, ami a talamusztól izolált agykéregben volt látható, már nem egyezik meg azzal, amelyiknél még az összes talamokortikális kapcsolat ép volt. Továbbá, talamikus agyszeleteken is regisztrálhatunk az SO-hoz hasonló aktivitást, amennyiben a

talamokortikális vagy retikuláris neuronok metabotróp glutamát receptorait (mGluR) aktiváljuk. A kutatók hipotézise szerint az SO kialakulásában három agyi struktúra játszik fő szerepet: a kérgi hálózatok, a talamokortikális idegsejtek, valamint a retikuláris neuronok. Ennek a három, egymástól független oszcillátornak az együttműködésére van szükség a lassú oszcilláció fiziológiás kifejeződéséhez.

Az up-state-ek elindulásához elengedhetetlen perzisztens Na^+ áramok aktiválódása megvalósulhat talamikus inputtal, spontán előforduló mini serkentő posztszinaptikus potenciálok (EPSP) időbeli egybeesésével, vagy néhány, alacsonyabb tüzelési küszöbbel rendelkező idegsejt akciós potenciáljával is. A tüzelési küszöb alatti membránpotenciál-fluktuációk azonban egyértelműen megelőzik a sejttüzelést az up-state kezdetekor, vagyis a tüzelés inkább a következménye, mintsem okozója az up-state kezdeteknek (Chauvette és mtsai 2010).

A down-state-eket generáló és fenntartó folyamatok is vitatottak. A neuronok bemeneti ellenállása down-state alatt a legnagyobb, az up-state kezdeti szakaszán a legalacsonyabb, és egészen az up-state végéig növekszik (Destexhe és mtsai 2003). Down-state alatt nemcsak a serkentő sejtek, hanem a gátló interneuronok sem tüzelnek. Ezek alapján a hiperpolarizáció egy aktív gátló folyamat helyett vagy diszfacilitáció (a bemeneti idegsejtek aktivitásának megszűnése) eredménye (Contreras és mtsai 1996), vagy az aktivitásfüggő K^+ konduktanciák felépülésének következménye (Sanchez-Vives és McCormick 2000), vagy pedig a két folyamat együttesének a hatása (Hill és Tononi 2005). Jelenlegi tudásunk szerint a K^+ az egyik fő eleme a down-state-ek kialakulásának, mivel a K^+ blokkoló Cs^+ alkalmazásával csökkenthető a hiperpolarizáció mértéke (Timofeev és mtsai 2001). Kimutatták, hogy a $GABA_B$ receptoroknak is fontos szerepük van az up-state-ek terminálásában (Mann és mtsai 2009). Továbbá az a megfigyelés, mely szerint a down-state-ek sokkal szinkronizáltabban kezdődnek, mint az up-state-ek, egy nagy kiterjedésű szinaptikus mechanizmusra utal (Volgushev és mtsai 2006).

3.2.5.3 A lassú oszcilláció szerepe a memóriakonszolidációban

Több tanulmány mutatott ki korrelációt az SWS mennyisége és a tanulási teljesítmény között. A tanulás alatt aktivált kérgi területek nagyfokú SWA-t mutattak lassú hullámú alvás alatt és a feladatbeli teljesítménynövekedés jól korrelált az SWA mennyiségével (Huber és mtsai 2004; Tucker és Fishbein 2009). Nemcsak a spontán kialakuló, de az ingerléssel indukált lassú oszcilláció is jó hatással van a memóriára: 0.75

Hz frekvenciával oszcilláló, transzkraniálisan adott áramok alkalmazásával növelni lehet a deklaratív memóriabeli teljesítményt emberben (Marshall és mtsai 2006), azonban magasabb frekvenciákat (pl. 5 Hz) alkalmazva ez a hatás már nem érvényesült (Marshall és mtsai 2011).

Jelenlegi tudásunk szerint az emlékek hosszú távú megőrzésében főként két agyi struktúra, a hippokampusz és a neokortex vesz részt. A hippokampusz egy rövid távú tároló, mely az emléknyomok kódolásának és előhívásának korai fázisaiban aktív. Az emléknyomok hosszú távú tárolásához azoknak azonban át kell kerülniük a hippokampuszból a neokortexbe. Több kísérleti bizonyíték is arra utal, hogy az emléknyomok SWS alatt tevődhetnek át előbbi struktúrából az utóbbiba.

Buzsáki György elmélete szerint ébrenlét alatt az információk az agykéregből a hippokampuszba áramlanak, és ez az irány alvás alatt megfordul (Buzsaki 1998). Több tanulmány eredményei alapján úgy tűnik, hogy SWS alatt a neokortex kezdeményezi a kommunikációt. Uretánnal altatott egér hippokampális CA1 interneuronjaiból és parietális kérgi neuronjaiból történő in vivo intracelluláris elvezetések egy konzisztens, 160 ms körüli hippokampális késést mutattak ki (Hahn és mtsai 2006). Ji és Wilson azt találták, hogy a neokortikális soksejt-aktivitás kb. 40 ms-al megelőzi a hippokampális populációs aktivitást (Ji és Wilson 2007). Mölle is hasonló eredményeket kapott, ő és munkatársai egy kb. 30 ms-os különbséget találtak a prefrontális kéregben és a hippokampuszban mért soksejt-aktivitás között, korábban induló kérgi MUA-val (Molle és mtsai 2006).

A hippokampuszban ébrenlét és SWS alatt megfigyelhető nagyfrekvenciás éleshullám-fodor eseményekről (sharp wave-ripple, SPW-R)(Chrobak és Buzsaki 1996), valamint az NREM-alvás alatt regisztrálható talamokortikális alvási orsókról úgy tartják, hogy különösen fontos szerepet játszhatnak a memóriakonszolidációs folyamatokban (Rasch és Born 2013). Időbeli kapcsolat figyelhető meg a hippokampális fodrok és a kérgi orsók között, mely arra utalhat, hogy ezen események alatt kapcsolat létesül a két struktúra között (Siapas és Wilson 1998). Kísérletekben igazolták, hogy a neokortikális lassú oszcilláció aktív fázisa állatokban és emberben is összefogja az orsókat (Contreras és Steriade 1995) és az éleshullámokat (Molle és mtsai 2006; Clemens és mtsai 2007). Több tanulmány is kapcsolatot mutatott ki a fodrok és az alvási orsók között (Sirota és mtsai 2003; Molle és mtsai 2009; Clemens és mtsai 2011). Ezen kívül a tanulás alatt

megfigyelt idegi mintázatok agykérgi visszajátszása elsősorban hippokampális éleshullámok alatt fordul elő (Peyrache és mtsai 2009). A fenti oszcillációk memóriakonszolidációban betöltött fontos szerepét több kutatás eredménye is igazolta. Az alvási orsók sűrűbben fordulnak elő tanulás után (Gais és mtsai 2002) és a visszaemlékezési teljesítmény is korrelál az orsók számával (Clemens és mtsai 2005). A hippokampális fodrok is korrelálnak a memóriabeli teljesítménnyel (Axmacher és mtsai 2008), a fodrok alatti sejtaktivitás kísérleti perturbációja pedig memóriaromlást okozhat (Girardeau és mtsai 2009; Ego-Stengel és Wilson 2010).

A hosszú távra eltárolt emléknyomok az eddigi kutatások alapján felállított elmélet szerint az idegsejteket összekapcsoló szinapszisokban tárolódnak. Nagymértékben növelheti az emlékek kialakulására vonatkozó tudásunkat, ha megismerjük a szinaptikus kapcsolatok ébrenlét és alvás alatt zajló változásainak mechanizmusát. Tononi és Cirelli korábban már ismertetett modellje (Tononi és Cirelli 2006; 2014) szerint a szinaptikus szabályozás folyamatai a következők: először a szinaptikus kapcsolatok az ébrenlét alatti tanulás során megerősödnek, aminek a hatására alvás alatt megnő az SWA teljesítménye a megfelelő kortikális területeken. A tanulással töltött ébrenléti periódust követő alvás alatt a szinaptikus kapcsolatok erőssége csökken az SWA hatására. Végül, ahogy a szinaptikus súlyok visszatérnek az alapértékeikre, lecsökken a lassú hullámú aktivitás. A hipotézis szerint a szabályozási folyamat arányosan csökkent minden szinaptikus súlyt, vagyis csökkenti az erős kapcsolatok súlyát, a gyenge kapcsolatokat pedig megszünteti, ezzel javítva a többi szinaptikus kapcsolat közötti jel-zaj arányt.

3.2.6 A ketamin-xylazin által indukált lassú ritmus

Altatás során az érzékelés, a mozgás és a tudatműködés visszafordítható módon felfüggesztődik (Bódizs 2000). Ma a műtéti és kísérleti gyakorlatban számos altatót használnak. Állatkísérletekben a leggyakrabban alkalmazott narkotikumok az izoflurán, az uretán és a ketamin. Ezeknek az anyagoknak az idegrendszerre gyakorolt hatásáról már sokat tudunk, de még sok a tisztázatlan kérdés (Franks 2006; Mashour 2006; Alkire 2008a; b; Alkire és mtsai 2008). Mindhárom anyag képes egy, a lassú oszcillációhoz hasonló agyi ritmust generálni. Ezek az indukált oszcillációk egymástól, és a természetes mélyalvás alatt megfigyelhető SWA-tól is eltérnek, többnyire frekvenciájukban, szabályosságukban és amplitúdójukban (Steriade és mtsai 1993d; Crunelli és Hughes

2010; Chauvette és mtsai 2011). A ketamin (xylazinnal kombinálva) például a természetes lassú hullámokhoz képest egy gyorsabb frekvenciájú, szabályosabb ritmust generál, melynek csúcsfrekvenciája patkányban és macskában is 1-2 Hz között van (Chauvette és mtsai 2011). Ezzel szemben az uretán által indukált lassú ritmus frekvenciája lassabb, 0.5 Hz körüli (Steriade és mtsai 1993d). Sok kutatócsoport ezen anesztetikumok által létrehozott oszcillációkat használja a természetes SWS alatt elvezethető SWA modelljeként. A saját kísérleteink során ketamin-xylazin keveréket használtunk a lassú oszcilláció indukálására. A xylazin egy nyugtató, fájdalomcsillapító hatású, az állatorvosi gyakorlatban a ketaminnal kombinálva gyakran használt szer. A ketamin főként nonkompetitív NMDA receptor antagonista tulajdonságáról ismert (Harrison és Simmonds 1985), míg a xylazin egy α_2 adrenerg receptor agonista (Drew és mtsai 1979; Hedler és mtsai 1981).

A ketamin általános anesztézia kiváltására és fenntartására használt anyag, többnyire valamilyen nyugtatóval kombinálják (pl. xylazin). Kisebb dózisban fájdalomcsillapító hatású. A ketamint általában intravénásan vagy intramuszkulárisan adják és disszociatív anesztéziát idéz elő (Bergman 1999). Növeli a szívritmust és a vérnyomást, vagyis inkább stimulálja, mintsem depresszálja a keringési rendszert. Néhány esetben használták már hosszantartó epilepsziás rohamok alatt is, ugyanis vannak rá bizonyítékok, hogy a ketamin NMDA receptor blokkoló hatása védi a neuronokat a glutamát által okozott károsodásoktól hosszantartó rohamok során (Fujikawa 1995). Gyors antidepresszáns hatása van, ezért hatékony lehet depressziós betegek kezelésénél. A ketamin hosszú távú hatásai között szerepel a kognitív deficit és memóriazavarok okozása (Morgan és mtsai 2012).

A ketamin több agyterületre hatva hozza létre a lassú oszcillációt, azonban a folyamat pontos mechanizmusa még nem ismert. Az NMDA receptor blokkoló tulajdonsága miatt a glutamáterg neurotranszmisszió részleges blokádját okozza. (MacDonald és mtsai 1991; Liu és mtsai 2006). A serkentő konduktanciák számának csökkentésével nő a down-state-ek hossza és a down-state-ben töltött idő aránya is, ami pedig az up-state-ek hosszának csökkenését vonja maga után (Chauvette és mtsai 2011). Ezek megfelelnek annak a megfigyelésnek, hogy az NMDA csatornák alulműködése növeli a down-state-ek hosszát (Fellin és mtsai 2009). Ketamin alkalmazása hiperpolarizálja a kérgi idegsejteket a HCN1 (hiperpolarizáció által aktivált, ciklikus

nukleotidok által szabályozott nem-szelektív 1-es kation csatorna) csatornák blokkolásán keresztül, növeli a szinaptikus válaszokat (Chen és mtsai 2009), valamint in vitro növeli a kálcium tüskéket, és a dendritikus serkenthetőséget piramissejtekben. In vivo azonban már nincs ilyen hatása a ketaminnak, mivel a szinaptikus aktivitás csökkenti a dendritikus tüzelést a kérgi sejtekben (Potez és Larkum 2008).

A ketamin gátolja a nikotinos acetilkolin-receptorokat is (Rudolph és Antkowiak 2004), azonban mivel a kolinerg neuronok tüzelése természetes SWS és altatás alatt is alacsony (Steriade és McCarley 2005; Boucetta és Jones 2009), nem valószínű, hogy a ketamin ezeken keresztül fejti ki a lassú oszcillációt kiváltó hatását. A ketamin felerősítheti a GABA-ra adott válaszokat is (Rudolph és Antkowiak 2004; Alkire és mtsai 2008), azonban anesztézia indukálására használt dózisban csak az α6β2δ és α6β3δ receptorokon hat (Hevers és mtsai 2008), melyek emlősök agyában csak a cerebellum szemcsesejtes rétegében találhatóak (Pirker és mtsai 2000). Ezek alapján tehát valószínűtlen, hogy ez a narkotikum a GABAerg hatásával hozzájárulna a talamokortikális lassú oszcilláció generálásához. A ketamin többek között csökkenti az acetilkolin felszabadulását az agytörzsi hálózatos állományban (Lydic és Baghdoyan 2002). Magas dózisban patkányokban a szigma-1 receptorokhoz is hozzákötődik (Narita és mtsai 2001). A kolinészteráz gátló physostigmin intravénás adagolása szignifikánsan csökkentette a ketamin hatásait (Toro-Matos és mtsai 1980), orexin alkalmazása pedig csökkentette a ketamin indukálta anesztéziában töltött időt (Tose és mtsai 2009).

A ketaminnal kombinált xylazinnak is lehet hatása a lassú oszcilláció bizonyos tulajdonságaira. A xylazin egy α2 adrenerg receptor agonista, mely receptor bőségesen megtalálható a neokortexben (Hedler és mtsai 1981; Nicholas és mtsai 1993). Az α2 adrenoreceptor agonista clonidine a K^+ áramokat aktiválja patkány gerincvelőjében található neuronokban (Sonohata és mtsai 2004). A noradrenalin növeli a K^+ konduktanciát egér entorhinalis kérgében (Pralong és Magistretti 1995). A locus coeruleusban a noradrenalin és az α adrenoreceptor agonisták aktiválják a K+ áramokat, míg az α2 antagonisták blokkolják ezeket (Arima és mtsai 1998). Az α2 adrenoreceptor aktivációja növeli a kérgi aktivitást a h-csatornák bezárásával (Wang és mtsai 2007). Ezek alapján a xylazin hatása is hozzájárulhat mind a down-state-ek hosszúságához, mind az aktív és inaktív fázisok közötti nagy amplitúdókülönbséghez, melyet megfigyeltek az altatott macskákon (Chauvette és mtsai 2011).

DOI:10.14753/SE.2017.1961

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az alvás legmélyebb fázisában kialakuló lassú hullámú alvás alatt regisztrálható lassú (< 1 Hz) hullámok jelentős szerepet játszanak több élettani folyamatban, mint például a memóriakonszolidációban is. Ezért az ezeket a jellegzetes, nagy amplitúdóval jelentkező hullámokat létrehozó és fenntartó mechanizmusok megértése fontos feladata az alváskutatásnak és az idegtudománynak. Jól ismert, hogy a lassú, 1 Hz-es oszcilláció egy erős szinaptikus és sejtaktivitással jellemezhető aktív fázis (up-state) és egy szinte teljesen aktivitás-mentes inaktív fázis (down-state) ritmikus váltakozásaként jelentkezik az agykéregben. A két fázis alatt kialakuló áramok és sejtaktivitás rétegek szerinti eloszlásáról azonban még kevés szakirodalmi adat áll a rendelkezésünkre és ezek több helyen is ellentmondásosak.

Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a lassú oszcilláció aktív fázisa legnagyobb valószínűséggel az infragranuláris kérgi rétegekben keletkezik. Azonban léteznek olyan kísérleti bizonyítékok is, melyek arra utalnak, hogy a talamusznak is jelentős szerepe van a lassú hullámok szabályozásában. Ez utóbbi agyi struktúra erőteljes, reciprok összeköttetésben van az agykéreggel: az elsődleges szenzoros kérgi áreák IV. rétegét idegzi be a legnagyobb mértékben, valamint az V. és VI. kortikális rétegekből kap bemenetet. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy az agykéreg bizonyos területein a spontán módon az infragranuláris rétegekben kezdődő up-state-ek mellett a granuláris rétegből is kiindulhatnak up-state-ek, melyek a talamikus aktivitás következményei lehetnek.

A fentiek ismeretében kísérleteinkben a következő célokat tűztük ki magunk elé:

1. Meghatároztuk patkányok elsődleges szomatoszenzoros agykérgének törzsi és hátsó lábi régiójából elvezetett, ketamin-xylazin által indukált lassú ritmus generátorainak rétegek közötti eloszlását a lokális mezőpotenciál (LFP), a lokális mezőpotenciál grádiens (GRD), az áramforrás-sűrűség (CSD) és a soksejt-aktivitás (MUA) vizsgálatával. Az aktív fázisokat hosszúság szerint három csoportra osztottuk, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vannak-e hossz-specifikus különbségek az up-state-ek generátorainak rétegek közötti eloszlásában.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

2. Meghatároztuk ugyanezekben az agykérgi régiókban a szomatoszenzoros ingerrel kiváltott up-state-ek generátorainak rétegek közötti eloszlását a CSD és a MUA vizsgálatával és összehasonlítottuk ezeket a spontán módon keletkező up-state-ekkel.

3. Megvizsgáltuk, hogy a soksejt-aktivitás alapján mely kérgi rétegekben kezdődhetnek a spontán kialakuló és a szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott up-state-ek.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

5. MÓDSZEREK

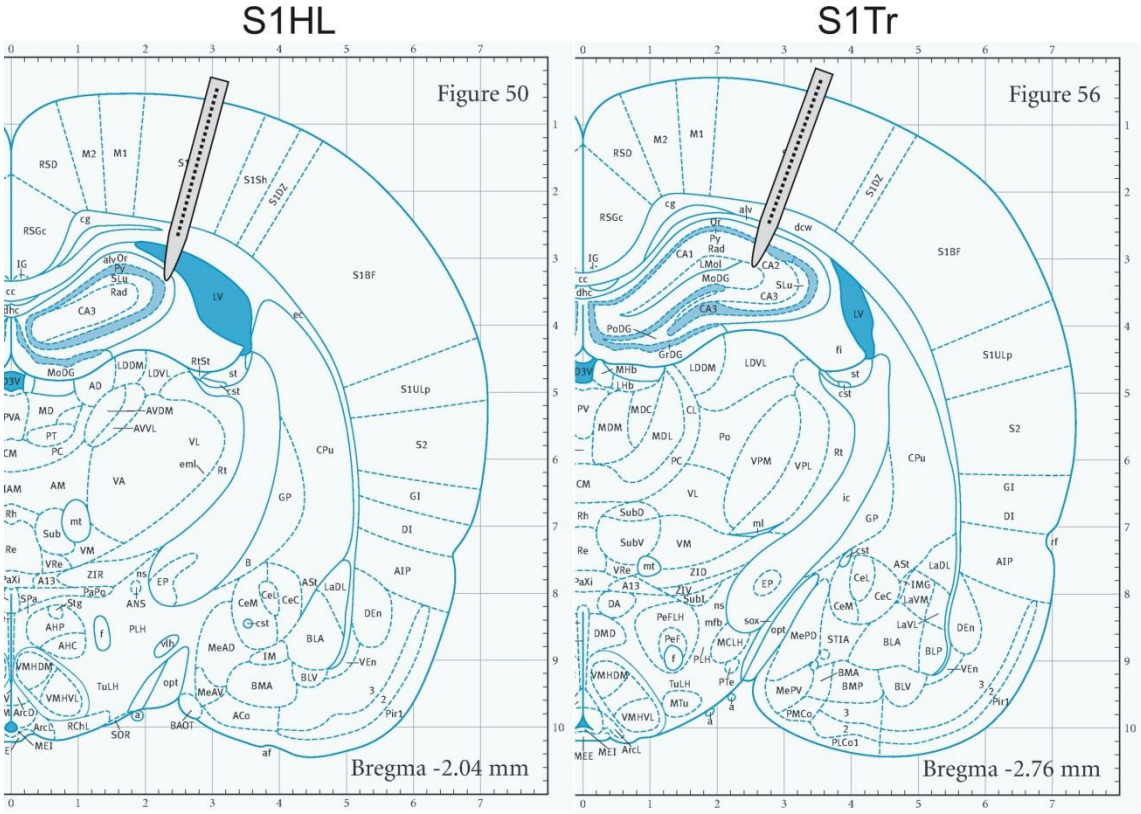
5.1 Műtét és altatás

Az akut kísérleteket felnőtt Wistar patkányokon végeztük (n = 20, súly: 308±88 g, hímek és nőstények egyenlő arányban). Minden eljárást a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetének etikai bizottsága által felállított szabályzat szerint végeztünk (engedély száma: 22.1/4228/003/2009), törekedve a kísérleti állatokat érő stressz és fájdalom minimalizálására. A patkányokat intraperitoneálisan adott ketamin-xylazin keverékkel altattuk (ketamin: 37.5 mg/ml, xylazin: 5 mg/ml) a testtömegükhöz viszonyított mennyiséggel (0.2 ml/100 g). A kísérletek során az állatok további ketamin-xylazin adagokat kaptak intramuszkulárisan (0.3 ml/óra) az altatás megfelelő mélységének fenntartása érdekében. A megfelelő anesztetikus mélység kialakulása után (szemhéjzárási és farokcsípési reflexek hiánya; szabályos, lassú légzés) az állatokat sztereotaxiás célzókészülékbe helyeztük (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). A testhőmérsékletüket egy homeotermikus fűtőpárnával és egy hőmérsékletszabályozó (Supertech, Pécs, Magyarország) segítségével tartottuk állandó 37 °C-on. A fejbőrön ejtett bemetszés után eltávolítottuk a koponya felett található kötőszöveteket és csonthártyát. A koponyát 1%-os hidrogén-peroxid (Hyperol, Meditop, Pilisborosjenő, Magyarország) oldattal tisztítottuk le, majd egy kb. 3x3 mm-es ablakot fúrtunk fogászati fúróval az elsődleges szomatoszenzoros kéreg törzsi (S1Tr, n = 15, kraniotómia: anterior-poszterior irány – AP: [-1.5 -4.5], mediális-laterális irány – ML: [+1 +4], a bregmához képest) vagy hátsó lábi (S1HL, n = 5, kraniotómia: AP: [0 -3], ML: [+1.5 +4.5], a bregmához képest) régiója fölé. Az elvezetésekhez használt elektródát a sztereotaxiás célzó mikromanipulátorának segítségével a megfelelő célterület fölé mozgattuk (S1Tr, AP: -2.7, ML: +3.3; S1HL, AP: -2, ML: +3 a bregmától; (Paxinos és Watson 2007)) és lassan (1 mm/perces sebességgel) beszúrtuk kb. 3 mm mélyre az agyszövetbe. Annak érdekében, hogy az implantált elektróda merőleges legyen az agyfelszín síkjára és párhuzamos az agykéreg piramissejtjeinek apikális dendritfáival, a mikromanipulátort kb. 20 fokkal megdöntöttük a koronális síkban, laterális irányban (2. ábra). Egy mikroszkóp

DOI:10.14753/SE.2017.1961

segítségével vizuálisan ellenőriztük, hogy az első három elvezetési kontaktus a kemény agyhártya (dura mater) felett helyezkedjen el.

A kemény agyhártya a teljes kísérlet során az elektróda által átszúrt részt leszámítva sértetlen maradt. Közvetlenül a beszúrás előtt kisebb korrekciókat (néhány tíz mikrométer) végeztünk a célterület helyének meghatározásában, hogy elkerüljük a nagyobb vérereket, ezzel is csökkentve a szövetben okozott sérülést. Az agy kiszáradásának megakadályozása érdekében óránként szobahőmérsékletű Ringer-oldatot fecskendeztünk az agyhártyákra.



2. ábra – A kísérletek során megcélzott területek*. A primer szomatoszenzoros kéreg törzsi (S1Tr) és hátsó lábi (S1HL) régiójából vezettük el a lassú hullámú aktivitást. Az elvezetésekhez használt szilícium elektródát kb. 20°-kal megdöntöttük, hogy a tű párhuzamos legyen az agykéregben található piramissejtek apikális dendritfáival. A multielektródát kb. 3 mm mélyre szúrtuk be az agykéreg felszínétől, hogy a kontaktusai a kortex minden rétegéből elvezessék az elektromos aktivitást. A legfelső három elvezetési pont a kemény agyhártya felett helyezkedett el, melyet vizuálisan, mikroszkóp alatt ellenőriztünk. Az ábra a Paxinos és Watson-féle patkány agyatlaszban található két, koronális síkú agytérkép módosításával készült (Paxinos és Watson 2007).*

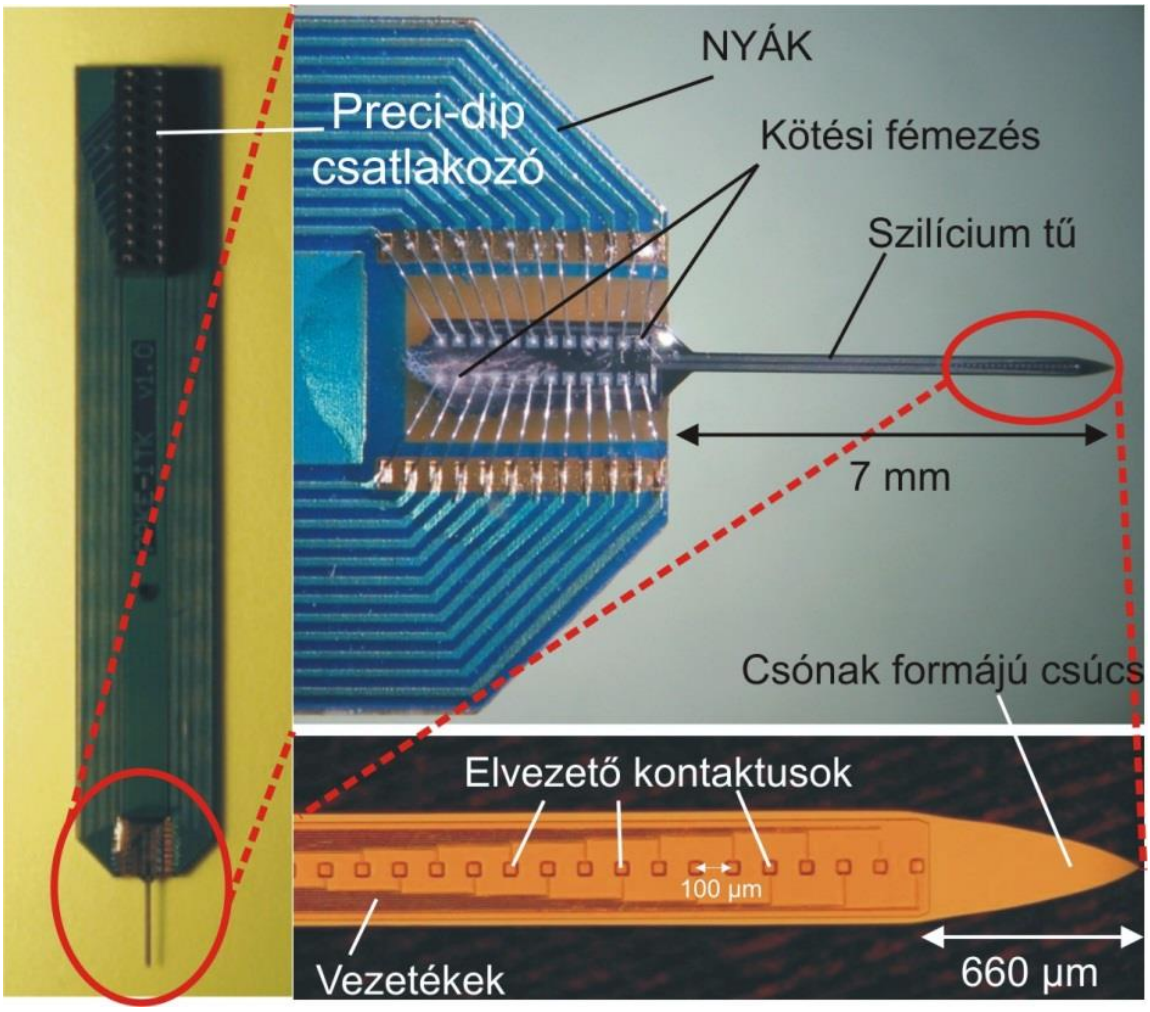
5.2 Elektródák és elektrofiziológiai elvezetések

Az elvezetésekhez használt lamináris szilícium elektróda részletes leírását egy, a csoportunk által publikált közlemény tartalmazza (Grand és mtsai 2011). Röviden összefoglalva, a multielektróda egy 7 mm hosszú szilícium tűből áll, mely 80 µm vastag, 280 µm széles és 24 darab, négyzet alakú (30x30 µm) platina elvezetési kontaktussal rendelkezik (3. ábra). A lineárisan elhelyezkedő elvezetési pontok középpontjai között 100 µm távolság van, az első kontaktus pedig 660 µm távolságra helyezkedik el az elektróda csúcsától. Mivel a patkány agykérge átlagosan kb. 2 mm vastag, ezért az elektróda első és utolsó szenzora közötti 2300 µm-es távolság lehetővé teszi, hogy egyidejűleg tudunk regisztrálni elektromos tevékenységet a patkány agykérgének mind a hat rétegéből. Az elvezető kontaktusok impedanciájának átlaga és szórása 343±66 kΩ-nak (9 elektróda mérési eredménye) adódott Ringer-Laktát oldatban (Teva Gyógyszergyár, Debrecen, Magyarország) 1 kHz-en mérve (BAK model EASI-1 elektroanalitikus aktiváló és érzékelő műszer, BAK Electronics, Sanford, FL, USA) egy ezüst/ezüst-klorid referencia elektróddal szemben. A kemény agyhártya és az agykéreg tetejének pontos lokalizációja érdekében az elektródát egészen addig toltuk le az agykéregbe, míg már csak az utolsó három kontaktus volt látható a mikroszkóppal az agy felszíne felett. Ezzel a módszerrel szinte biztosra vehettük, hogy a negyedik kontaktus már a kéreg I. rétegében helyezkedett el. A többi mérőpont nagy része a szomatoszenzoros kéreg különböző rétegeiből vezette el az elektromos aktivitást. Az állat nyakizmába szúrt két rozsdamentes acél tű szolgált földelő és referencia elektródaként.

A multielektróda a beszúrás során - a kéreg ventrális része felé irányuló - nyomást gyakorol az agykéregre, kis mértékben deformálva azt. Mivel a kortikális szövet torzulása hatással lehet a normális, fiziológiás aktivitásra, ezért egy órát vártunk mielőtt elkezdtük az agyi elektromos jelek regisztrálását. Ez az idő elegendő volt arra, hogy az agykéreg visszanyerje az eredeti alakját. Az agyi jeleket egy saját készítésű elő- és főerősítővel (Ulbert és mtsai 2001) erősítettük fel (erősítés: 1000, sáváteresztő szűrő: 0.1-7000 Hz), majd az analóg jeleket 24 csatornán, 20 kHz-es mintavételezési frekvenciával mintavételeztük és 16 bites felbontással digitalizáltuk (PCI-6259, National Instruments, Austin, TX, USA). Az elektromos agyi jeleket egy LabVIEW környezetben készített szoftverrel (National Instruments, Austin, TX, USA) rögzítettük, majd a kapott fájlokat egy személyi számítógép merevlemezén tároltuk utólagos feldolgozásra. Átlagosan 15

DOI:10.14753/SE.2017.1961

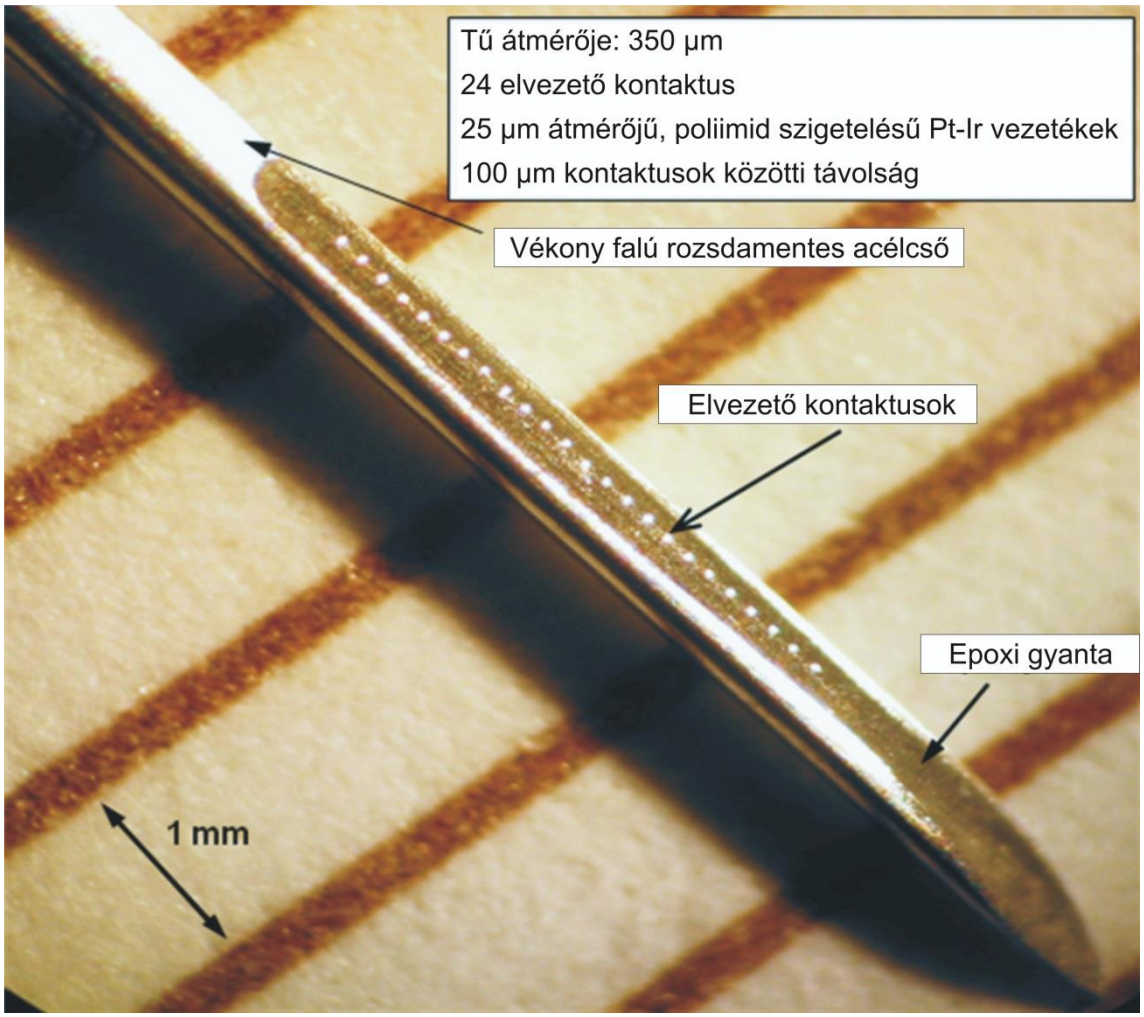
perc hosszúságú felvételeket készítettünk és egy kísérleti alkalommal történő adatgyűjtés körülbelül 3-5 óráig tartott. Több kísérlet (n = 4) esetén az elvezetések után gyenge pozitív áramot (1.5 µA) vezettünk 1-2 percen át három vagy négy, egymástól meghatározott távolságra (500, 600, 700 vagy 800µm-re) található kontaktuson keresztül léziókat létrehozva a szövetben, a kérgi rétegek határainak későbbi, pontosabb meghatározása érdekében. Az elektróda csúcsától legtávolabb elhelyezkedő kontaktusról nem vezettünk el, mivel a 24. csatorna a szomatoszenzoros ingerlés során keletkező ingerimpulzusokat regisztrálta (triggercsatorna).



3. ábra – Az elvezetésekhez használt szilícium elektróda. *A multielektróda 24 darab négyzet alakú, platina elvezetési kontaktussal rendelkezik. Minden szomszédos elvezetési pont között 100 µm a távolság. Az elektróda hegye speciális kialakítású, a csónak alak lehetővé teszi az implantálás során keletkező szöveti sérülések minimalizálását, valamint könnyedén áthatol a kemény agyhártyán is (Grand és mtsai 2011).*

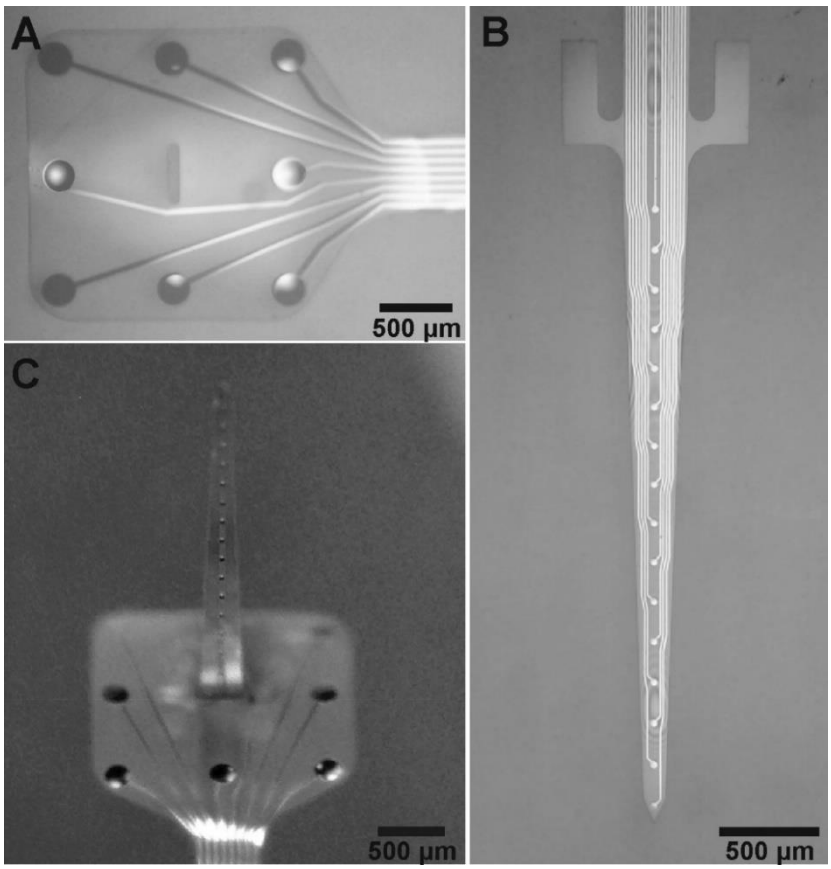
Megvizsgáltuk azt is, hogy vajon befolyásolja-e az elektróda típusa, anyaga vagy geometriája a kapott eredményeket. Ehhez két, a használt szilícium-alapú regisztráló

eszköztől eltérű paraméterekkel rendelkező lineáris multielektródával is elvégeztünk néhány kísérletet (rozsdamentes acél multielektróda: n = 5; SU-8 polimer-alapú multielektróda: n = 4). Az egyik típusú lineáris multielektróda (standard acélcsöves elektród, Neuronelektród, Budapest, Magyarország) rozsdamentes acél házzal és 24 platina-irídium kontaktussal rendelkezik, melyek között - a szilícium elektródánál látottakhoz hasonlóan - 100 µm távolság van (4. ábra). Különbség a két elektróda között az alakjukban (henger vs. téglatest), a tű anyagában (fém vs. szilícium), vastagságában (350 µm vs. 280 µm), valamint a kontaktusaik nagyságában és formájában (kisebb, kör alakú vs. nagyobb, négyzet alakú) van.



4. ábra – Az elvezetésekhez használt lineáris fémelektróda. *Az acélcsöves fémelektróda valamivel vastagabb a szilíciumelektródánál, azonban kisebb felületű elvezetési kontaktusokkal rendelkezik. A platina-irídium vezetékek epoxi gyantába vannak ágyazva. A szabad vezetékvégek (kontaktusok) között 100 µm-es távolság van.*

A másik típusú elektróda, mely egy továbbfejlesztett változata az emberben is alkalmazott rajzszög-elektródának (Ulbert és mtsai 2001), polimerből (SU-8) készült (5. ábra; (Marton és mtsai 2015)). A polimer-alapú elektródák a szilícium és fémelektródák merevségével szemben hajlékonyak, ezáltal követni tudják az agy kis mozgásait és pulzálását. Ennek következtében ezek az eszközök jobb biokompatibilis tulajdonságokkal rendelkeznek. A használt eszköz két részből áll, egy beültethető lamináris mélyelektródából, valamint az agyfelszínre helyezhető elektródamátrixból. Előbbin 16 platina elvezetési pont található egymástól 200 µm-re és a lokális mezőpotenciálok mellett sejtaktivitás elvezetésére is alkalmas. A mélyelektródán található elvezetési pontok 30 µm átmérőjűek. A 200 µm átmérőjű felszíni elektródák egymástól 800 µm távolságra vannak és az agyfelszíni LFP rögzítésére alkalmasak. Az elektród gyártási folyamatának lépései Márton és munkatársai közleményében olvashatóak (Marton és mtsai 2015). A két komponens a gyártás után kerül összeszerelésre, epoxival ragasztják össze őket. A kísérleteink során csak a mélyelektródával regisztrált adatokat elemeztük.



5. ábra - Az elvezetésekhez használt multimodális, hajlékony, polimer-alapú (SU-8) elektróda. *(A) 8 elvezető kontaktussal rendelkező felszíni elektródamátrix. (B) 16 kontaktussal rendelkező mélyagyi elektróda. (C) A kész szenzor a felszíni és a*

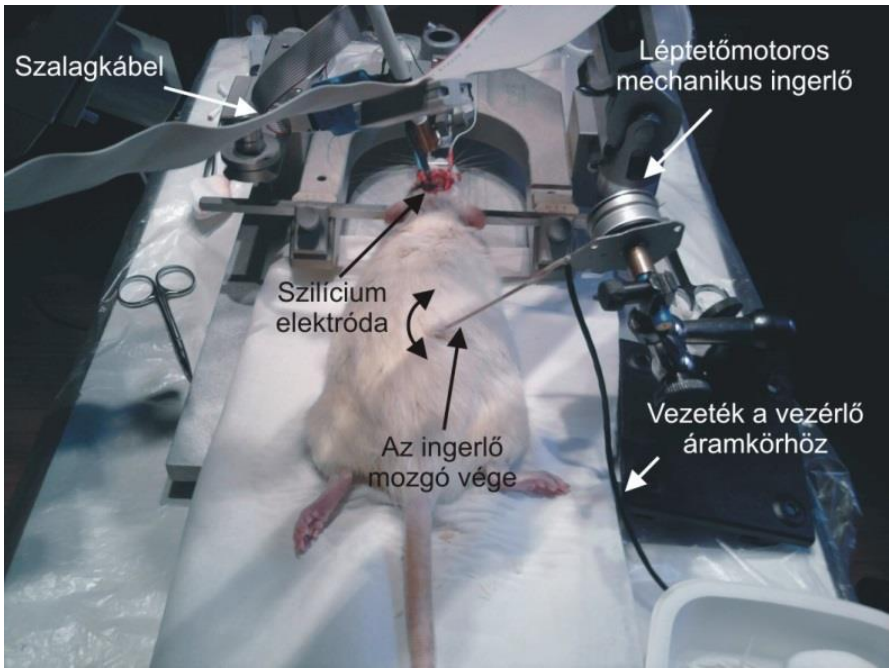
mélyelektródás részek összeillesztése után. Az elektródán kisebb felületű platina-kontaktusok találhatóak, mint a szilícium-alapú elektródán. A mélyelektródán az elvezető kontaktusok 200 µm-re találhatóak egymástól.

A fém- és polimer-alapú elektródákkal végzett kísérletek menete és az adatfeldolgozás folyamata teljesen megegyezett a szilícium elektródánál ismertetettekkel. A polimer-alapú elektródák a szomatoszenzoros kéreg hátsó lábi és törzsi régiója helyett a barrel kéregbe lettek implantálva.

5.3 Szomatoszenzoros ingerlés

A bőrön található receptív mezőket a következő módszerrel azonosítottuk. Hangszórón keresztül hallgattuk a regisztrált agyi elektromos tevékenységet az 500-5000 Hz-es frekvenciasávra megszűrve (sejttüzelés) az állat testének fülpiszkálóval történő mechanikus ingerlése során. Amennyiben a fülpiszkálóval közeledünk az elektróda közelében elhelyezkedő neuronok receptív mezőjéhez, azok jól hallhatóan tüzelni kezdenek. Távolabbi, a receptív mezőn kívül eső területek ingerlésre esetén viszont csak a lassú oszcilláció alatti háttéraktivitás hallható. Miután megtaláltuk a legerősebb választ kiváltó helyet, azt megjelöltük az állat testén, majd a továbbiakban egy saját készítésű léptetőmotoros mechanikus ingerlővel (10 cm hosszú fa pálcika a motorhoz ragasztva) ingereltük a megjelölt pozíciót, ritmikusan hozzáérintve a pálcika végét az állat bőréhez (6. ábra). Az ingerlés paramétereit egy PC-n keresztül lehetett szabályozni egy LabVIEW alapú szoftverrel. Az ingerimpulzusok 50 vagy 100 ms hosszúak voltak. Ez azt jelentette, hogy ennyi idő alatt mozdult el a pálcika kb. 10°-ot lefele az állat irányába, majd tért vissza a kezdeti állapotba. Az ingerlés során több frekvenciát is alkalmaztunk az 1-2 Hz-es tartományban (1, 1.25, 1.5, 2 Hz), a legtöbbször azonban a 1.5 Hz-es ingerlési gyakoriságot használtuk. Egy kísérletben az ingerlést kvázivéletlen hosszúságú ingerek közti időintervallumokkal végeztük. A véletlen számok a 0.5-0.7 másodperces időtartományból kerültek ki, ami az 1.43-2 Hz-es frekvenciatartománynak felel meg. A fa pálcika kb. 5 mm távolságra helyezkedett el az állatok bőrétől és a felhasználó által megadott frekvenciával érintette meg az állat bőrét egy-egy rövid pillanatra, az inger hosszúságától függő szögsebességgel (50 ms – 400°/s, 100 ms – 200°/s). Az

ingerimpulzusok időpontja az elektrofiziológiai jelekkel együtt került rögzítésre, egy külön triggercsatornán.



6. ábra – A kísérleti felállás szomatoszenzoros ingerlés során. *A kép felső részén látható az állat fejébe ültetett szilícium elektróda az előerősítővel, valamint a nyakizomba szúrt földelő és referencia elektródákkal. Az ábra jobb oldalán a léptetőmotoros mechanikus ingerlőt és a motor által mozgatott fa pálcikát láthatjuk. Az ingerlő ritmikusan - a felhasználó által megadott frekvenciával - megérintette az állat bőrét a kijelölt helyen.*

5.4 Hisztológia

A kísérletek után eltávolítottuk az elektródát, majd az állatok egy nagyobb adag altatót kaptak az anesztézia elmélyítésére. Ezt követően transzkardiálisan perfundáltuk a patkányokat először 100 ml fiziológiás sóoldattal, melyet 300 ml, 4%-os paraformaldehid oldat követett (0.1 M foszfát pufferben (PB), pH = 7.4). Az agyakat eltávolításuk után posztfixáltuk 4 °C-on, 4%-os paraformaldehid oldatban egy éjszakán keresztül. A fixált agyakat ezután vibratómmal (Leica VT1200, Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Németország) lemetszettük 60 µm vastag koronális szeletekre, majd a lemetszett szeletek egy krómzselatinnal feltöltött Petri-csészébe kerültek. Ezt követően a szeleteket tárgylemezre helyeztük, krezilibolyával megfestettük, majd dehidráltuk xilolban (2 x 10 perc). Végül lefedtük őket fedőlemezzel DePex (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország) alkalmazásával. A tárgylemezeken található metszeteket egy DP70 digitális kamerával (Olympus, Tokyo, Japán) felszerelt Axioplan 2 típusú

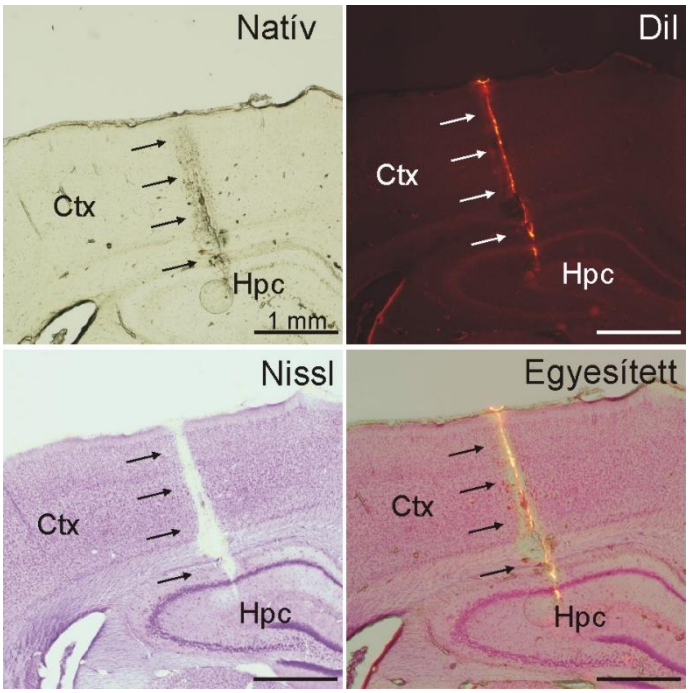
mikroszkóp (Zeiss, Jena, Németország) alatt lefényképeztük, hogy meghatározhassuk az elektróda által szúrt csatorna helyét és megbecsülhessük, milyen agyterületről vezettünk el, valamint, hogy meghatározhassuk a kérgi rétegek határait. Négy kísérlet során az elektródák hátsó oldalát vörös színű fluoreszcens festékkel (DiI, D-282, ~10% etanolban) kentük be, hogy pontosan meghatározhassuk az elektróda csúcsának pozícióját az agyszövetben (7. ábra). Az ezek után a kísérletek után készült metszeteket a festés előtt fluoreszcens mikroszkóp alatt lefényképeztük (Cy3 szűrő, 530-560 nm hullámhossz).

Hisztológiai feldolgozás során az agyszövet mérete megváltozhat, a metszet zsugorodhat vagy megduzzadhat. A szövettani módszertől függően ez a változás akár elérheti a 10-25%-ot is (Turner és mtsai 1995; Wellman és mtsai 1995; Pyapali és mtsai 1998a; Tukker és mtsai 2013). Az ismeretlen nagyságú méretbeli változás jelentősen megnehezítheti a kérgi rétegek és az elektróda elvezető kontaktusai közötti viszony pontos meghatározását. Fixálás során az agy megkeményedik, vizet veszít és ennek hatására megváltoztatja a méretét. Ha újabb szövettani lépések során az agyat tovább dehidrálják, a zsugorodás mértéke is tovább nőhet. Nissl-módszerrel festett és paraffinba ágyazott kérgi szövet esetén a lineáris csökkenés faktorát 0.67-0.81-nek találták (Schuz és Palm 1989). Nem tudni, hogy ez a csökkenés homogén-e minden irányban, de ha igen, akkor 1 mm^3 szövet kb. 2.9 mm^3 friss szövetnek felel meg. Ezen okok miatt megvizsgáltuk a paraformaldehiddel fixált és Nissl-módszerrel festett agyszeleteink méretbeli változásait.

A lemetszett szeleteket több kísérlet során (n = 8) a Nissl-festés előtt (natív szelet) és festés után is lefényképeztük, hogy külön tudjuk vizsgálni a fixálás és a Nissl-festés agyszövet méretére gyakorolt hatását (7. ábra). Koronálisan metszett szeletek esetén mediolaterális és dorzoventrális irányban tudtuk vizsgálni a szövet méretbeli változásait. A mediolaterális irányban történő méretbeli változások meghatározására több kísérlet (n = 4) során az elvezetések végeztével kihúztuk az elektródát az agyszövetből, majd az első penetráció helyétől párhuzamosan (laterálisan vagy mediálisan), kimért távolságra (600, 700, 800 vagy 900 μm) ismét beszúrtuk és kihúztuk azt, egy új nyomot kialakítva (8. ábra). Végül a fent leírt protokollnak megfelelően fixáltuk az agyat. A lemetszett, tárgylemezre helyezett és kiszárított, azonban még festés előtt álló natív szeleteket lefényképeztük mikroszkóp alatt, amit a Nissl-festés után újra megismételtünk. Ebből meg tudtuk határozni a szövet fixálás utáni, valamint a Nissl-festés utáni mediolaterális

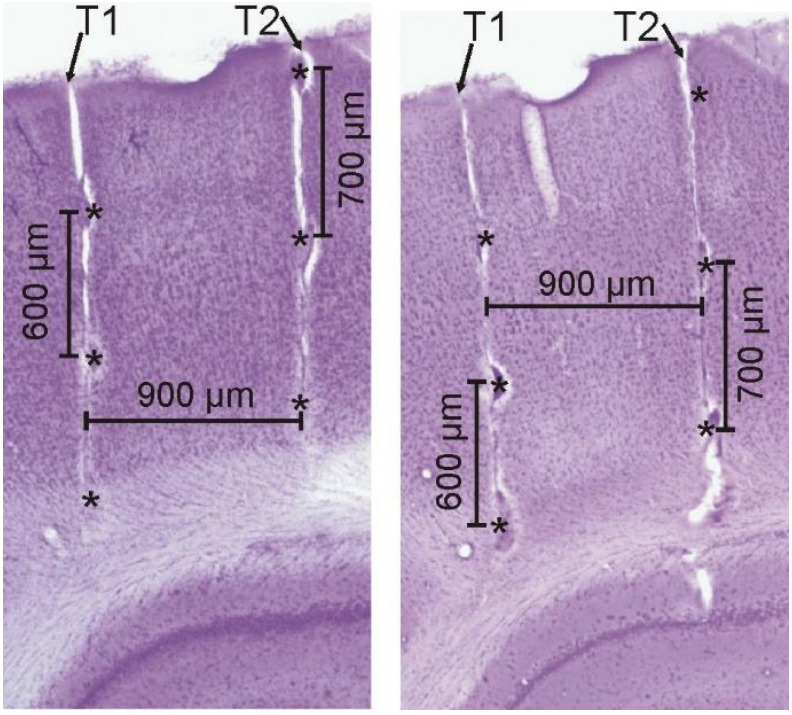
DOI:10.14753/SE.2017.1961

méretváltozását. A dorzoventrális iránybeli eltéréseket pedig az „Elektródák és elektrofiziológiai elvezetések” című alfejezetben ismertetett elektromos lézió alkalmazásával határoztuk meg (8. ábra). Az elektromos lézió létrehozására használt kontaktusok közötti távolság ismert volt (500. 600, 700 vagy 800 µm), így a fixált szöveten látható - a kontaktusokon átvezetett áram által okozott - szöveti sérülések közötti távolságból kiszámítható a dorzoventrális irányú szöveti változás.



7. ábra – Az agyszövet méretbeli változásának összehasonlítása Nissl-festés előtt és után. *A képeken ugyanannak a koronális szeletnek a natív, natív fluoreszcens és Nissl-festett változata látható. A jobb alsó képen (Egyesített) a háromféle kép egymásra van helyezve. Megfigyelhető, hogy a képek jól átfednek egymással, vagyis a szövet mérete nem változott jelentős mértékben a Nissl-festés során. A nyilak mutatják az elektróda helyét a szövetben. Kalibráció: 1 mm mind a négy képen. Ctx – kortex, Hpc –hippokampusz.*

DOI:10.14753/SE.2017.1961



8. ábra – Az agyszövet hisztológiai vizsgálatok során bekövetkező méretbeli változásának meghatározására alkalmazott módszerek. *Két, egymás után lemetszett, 60 µm vastag koronális agyszelet (bal és jobb kép) kérgi része látható az ábrán. A mediolaterális irányú méretváltozás megbecslése érdekében az eredeti beszúrással (T1) párhuzamosan, 900 µm-re ismét beszúrtuk az elektródát az agykéregbe, egy második szúrt csatornát létrehozva (T2). A két nyom közötti távolság több helyen történő lemérése alapján képet kaphatunk arról, hogy a szövet mennyit zsugorodott vagy duzzadt a fixálás és a hisztológiai protokoll elvégzése után a mediolaterális irányban. A dorzoventrális irányú méretváltozást az egymástól ismert távolságra lévő kontaktusokon átvezetett áramok hatására kialakuló léziók távolságának mérésével próbáltuk megbecsülni. A fekete csillagok jelölik a léziók helyét. Mindkét szúrt csatorna mentén három léziót készítettünk, a bal oldalin metszeten egymástól 600 µm távolságokra, a jobb oldalin pedig 700 µm-re.*

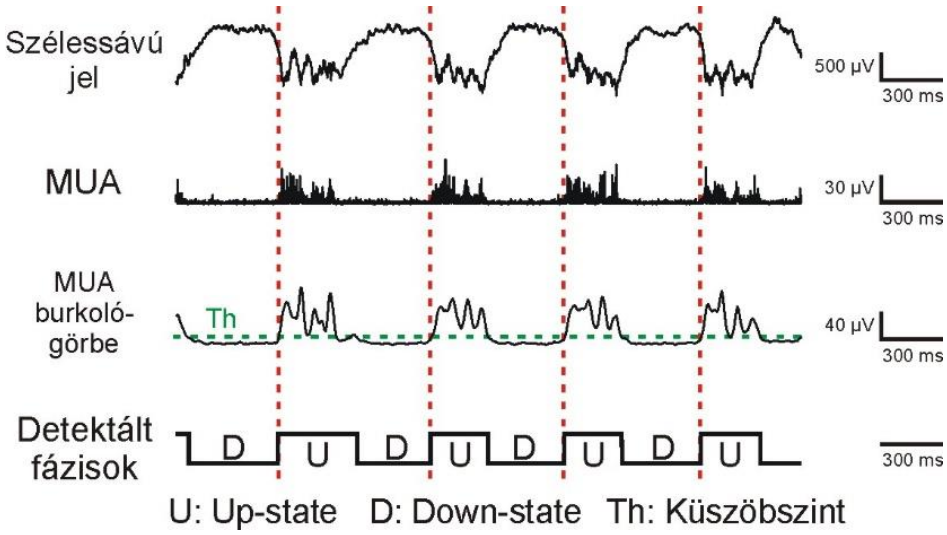
5.5 Adatfeldolgozás

A nyers adatokat a NeuroScan szoftver 4.3-as verziójával (Compumedics, El Paso, TX, USA) és saját készítésű MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) programokkal dolgoztuk fel és elemeztük.

5.5.1 A lassú oszcilláció fázisainak detektálása

A up- és down state-eket intracelluláris elvezetésekből a membránpotenciál bimodális eloszlása alapján lehet detektálni (Volgushev és mtsai 2006), viszont

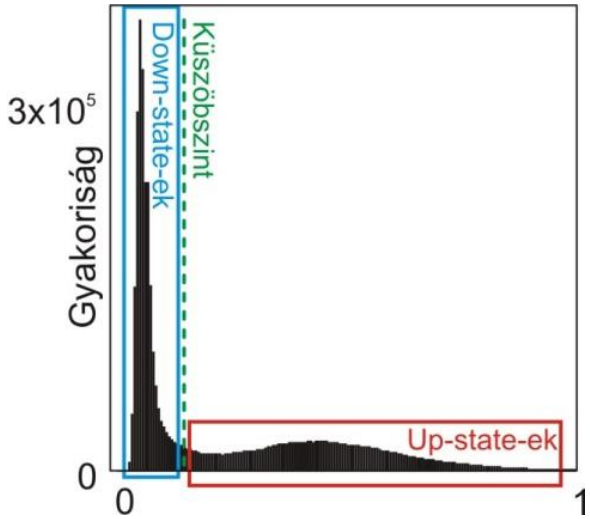
extracelluláris jelekből a lassú oszcilláció fázisainak meghatározása már komplexebb feladat. Több módszert is kidolgoztak az elmúlt évek során, melyek nagy része a lokális mezőpotenciálok feldolgozásán alapszik. Mukovski és csoportja a gamma sávot (20-100 Hz) használta detekcióra (Mukovski és mtsai 2007), míg Saleem és munkatársai a megfelelő kérgi állapotot a mély kérgi LFP fázisa alapján határozták meg patkányok hallókérgéből (Saleem és mtsai 2010). Csoportunk humán adatokon a Hilbert-transzformációt alkalmazta az LFP jelek pillanatnyi fázisának kiszámolásához, melyből azután már meghatározhatóak az up és down-state-ek (Csercsa és mtsai 2010). Sakata és Harris LFP helyett a MUA görbék simított változatát használta az aktív fázisok detekciójára (Sakata és Harris 2009).



9. ábra – A soksejt-aktivitás alapú állapotdetekciós algoritmus lépései. *Az elvezetett szélessávú jelből (fent) szűréssel kinyerjük a MUA-t (500-5000 Hz). Ezt követően a MUA-ból egy további szűréssel kinyerjük a MUA burkológörbéjét (30 Hz-es aluláteresztő szűrő), majd manuálisan kiválasztott down-state-ek átlagos amplitúdójának és szórásának értékeiből számolt küszöbértékkel (Th, szaggatott zöld vonal) meghatározzuk az up-state-ek (U) és down-state-ek (D) kezdőidőpontjait. Végül ezeket az időértékeket eltároljuk későbbi feldolgozásra. A detektált fázisokat az alsó görbe mutatja. A szaggatott piros vonalak a 'down-up' átmenetet jelölik.*

Az általunk alkalmazott módszer, mellyel a lassú oszcilláció fázisainak kezdetét detektáltuk, a 9. ábrán látható. Röviden összefoglalva az algoritmus a következőképpen működik: az elvezetett szélessávú jelből (0.1-7000 Hz) megfelelő szűréssel szétválasztottuk az alacsonyabb frekvenciakomponenseket tartalmazó lokális mezőpotenciált (frekvenciatartomány: 0.6-500 Hz) és a soksejt-aktivitást

(frekvenciatartomány: 500-5000 Hz). A soksejt-aktivitás kinyeréséhez egy 500 és 5000 Hz közötti fázistolás nélküli sáváteresztő szűrőt használtunk, 24 dB/oktávos meredekséggel. A szűrt jelet egyenirányítottuk, majd a kapott fájlokat a rövidebb feldolgozási idő és kisebb tárolási kapacitás érdekében alulmintavételeztük az eredeti 20 kHz-es mintavételezési rátáról 2 kHz-re. Ezt követően egy további szűrővel kinyertük az egyenirányított MUA jel burkológörbéjét (30 Hz-es aluláteresztő szűrő, véges-impulzusválasz, zéró-fázistolás, 24 dB/oktáv). Végül a 23 szűrt csatornából kinyert burkológörbék értékeit mintapontonként összeadtuk, mely az intracellulárisan elvezetett lassú oszcillációhoz hasonló görbét eredményezett (9. ábra). A csatornák értékeinek összeadásával robusztusabban, kisebb detekciós hibával működött az algoritmus, mintha csak egy csatornán próbáltuk volna meg detektálni a fázisokat. A csatornák összeadása után kapott görbén pozitív csúcsok felelnek meg az erős sejtaktivitással járó up-state-eknek, a lapos, nullához közeli szakaszok pedig a sejttüzelés-mentes inaktív fázisokat jelzik. A végeredményül kapott idősor amplitúdó-hisztogramjának kiszámolásával egy jól láthatóan bimodális eloszlást kapunk (10. ábra).



10. ábra – A detekciós algoritmussal kapott görbe amplitúdó-hisztogramja. *A hisztogram bimodális eloszlást mutat, ahol a nullához közeli, nagyobb és keskenyebb csúcs felel meg a down-state-eknek, a laposabb és szélesebb csúcs pedig az up-state-ekhez tartozó értékeknek. Az értékeket normalizáltuk. A szaggatott zöld vonal jelöli a számolt küszöbérték helyét. Jól látható, hogy a küszöbérték a bimodális eloszlás két csúcsa közé esik.*

Utolsó lépésként egy küszöbértéket kell kiszámolnunk, mely megadja az up- és down-state kezdeteket. A küszöbértéket a következőképpen kaptuk meg: kiszámoltuk 50

véletlenszerűen kiválasztott (100 ms-nál hosszabb) down-state esetén ezek hosszának felénél található MUA értékek átlagos amplitúdóját (AVG) és szórását (STD). Ez egy jó becslést eredményezett az adott elvezetésben található összes down-state amplitúdóértékére (Mivel a down-state alatt nincs, vagy csak nagyon minimális a sejtaktivitás, ezért ezeknek az értékeknek nulla közelinek kellene lennie, azonban, a csatornánként jelenlévő és eltérő nagyságú háttérzaj miatt a végeredmény valamivel nagyobb lesz nullánál). A detekcióhoz használt küszöbértéket ezt követően AVG + 3 * STD (9. ábra, szaggatott zöld vonal) értékre állítottuk be, mellyel megfelelő minőségű MUA jel esetén a számunkra szükséges és elégséges pontossággal detektálni tudtuk az up- és down-state-ek kezdőidőpontjait. Ennél alacsonyabb küszöbértékek esetén az algoritmus gyakran hamis up-state-eket talált az inaktív fázisokon belül, a magasabb küszöbértékek használata pedig pontatlanabbul detektálta az up-state kezdeteket. Az előzetes vizsgálataink és tapasztalataink alapján a detekciós algoritmusban a minimális up-state hosszt 50 ms-ra állítottuk be, míg a legrövidebb down-state-eket 100 ms-nak választottuk. Ennél kisebbre választott down-state hosszúság esetén gyakran előfordult, hogy az algoritmus rövid down-state szakaszokat detektált egy hosszabb up-state-en belül. Ennek az az oka, hogy a szomatoszenzoros kéregben az up-state-ek alatt egy valószínűleg talamikus eredetű orsó aktivitás is detektálható 10 Hz körüli frekvenciával, ami hasonló frekvenciájú fluktuációt okoz a sejtaktivitásban is az aktív fázisokon belül, néhol átlépve a detekcióhoz meghatározott küszöbértéket.

Az up-state-ek kezdő és befejező időpontjai azok a mintapontok lettek, ahol a származtatott burkológörbe metszette a kiszámolt küszöbértéket (9. ábra, piros és zöld szaggatott vonalak metszőpontja). Ezek az időértékek elvezetésenként külön fájlokba kerültek mentésre. A MUA és LFP jelek azon szakaszait, melyek műtermékeket tartalmaztak (szaturáció, elektromos zaj stb.) kizártuk a további feldolgozásból egy, a NeuroScan szoftverben implementált műtermék-szűrő módszer segítségével. 1300 ms hosszú szakaszokat (epoch) vágtunk ki a folytonos LFP és MUA jelekből a detektált fáziskezdetek körül. A kivágott epochok 500 ms hosszú részt tartalmaztak a detektált fáziskezdetek előtt és egy 800 ms hosszú szakaszt utána. Egy végső műtermék-eltávolító és ellenőrző folyamattal meggyőződtünk a feldolgozott adatok megfelelő minőségéről. A műtermék-eltávolítás után megmaradt szakaszokat az up-state-ek hossza alapján csoportosítottuk, majd átlagoltuk őket. Az aktív fázisok három csoportját vizsgáltuk:

rövid (50-200 ms), átlagos hosszúságú (200-400 ms) és hosszú (> 400 ms) up-state-eket. A három up-state csoporton kívül analizáltuk még a 200-400 ms-os hossztartományba eső down-state-eket is.

5.5.2 Áramforrás-sűrűség és lokális mezőpotenciál grádiens analízis

A lokális mezőpotenciál főként az elvezető kontaktusokhoz közeli neuronok szinaptikus aktivitását tükrözi. Két további jel származtatható az LFP-ből, melyekkel a mezőpotenciálhoz képest pontosabban tudjuk lokalizálni a szinaptikus áramok helyét (Freeman és Nicholson 1975; Nicholson és Freeman 1975; Mitzdorf 1985; Vaknin és mtsai 1988). A lokális mezőpotenciált szűréssel kaptuk meg az eredeti, szélessávú jelből (0.3–500 Hz-es sáváteresztő szűrő, zéró fázistolással és 24 dB/oktáv meredekséggel). A lokális mezőpotenciál grádiens (GRD) az LFP jel első térbeli deriváltja és a szomszédos elektróda-kontaktusok közötti feszültségkülönbségekből számolható. A tanulmány során azért is volt szükség a grádiens kiszámolására, hogy összehasonlíthassuk az itt kapott eredményeket egy, a csoportunk által végzett humán tanulmány eredményeivel (Csercsa és mtsai 2010).

Az áramforrás-sűrűség (CSD) elemzés a lamináris neurális struktúrákból eredő LFP-ből becsült szinaptikus/transzmembrán áramok eloszlását mutatja meg. A CSD jól közelíti a makroszkópikus áramsűrűséget egységnyi térfogatban, mely az individuális mikroszkópikus membránáramok eredője (Freeman és Nicholson 1975; Nicholson és Freeman 1975; Mitzdorf 1985). A CSD az LFP negatív második térbeli deriváltjaként becsülhető meg. Mi a következő hárompontos formulát alkalmaztuk az áramforrás-sűrűség kiszámolására:

$$CSD_j = -(u_{j-1} - 2u_j + u_{j+1})/rh^2,$$

ahol u_j a mezőpotenciál értéke a j-edik kontaktuson µV-ban megadva, r a szövet fajlagos ellenállása Ω*cm-ben, h pedig az elektróda kontaktusai közötti távolság (100 µm). Jelen tanulmányban homogén szöveti konduktivitást feltételeztünk. A számítások során mind az r és h konstansok voltak, értéküket az 1 mértékegység nélküli számmal helyettesítettük, ami nem befolyásolta sem a becsült áramok eloszlását, sem az áramerősségek egymáshoz képesti arányát. A magas térbeli frekvenciákból adódó zajt és a határhatásokat Hamming-ablak alapú simítással és interpolációval csökkentettük

(Rappelsberger és mtsai 1981; Ulbert és mtsai 2001). A két származtatott jel kiszámolásának módjából adódóan a GRD egy, a CSD jelek pedig kettő csatornával tartalmaznak kevesebbet az LFP és a MUA görbék csatornaszámához képest. Mind a CSD-t, mind pedig a GRD-t mikrovoltban fejeztük ki és a teljes hosszúságú LFP jelből számoltuk. Ezután a GRD és a CSD jeleket az LFP és a MUA jelekhez hasonlóan dolgoztuk fel.

5.5.3 A különböző kérgi rétegekben induló aktív fázisok detektálása

A korábban leírt állapotdetekciós algoritmus csak azt mondja meg, hogy mikor kezdődött egy adott fázis, azt azonban nem, hogy melyik kérgi rétegből indult az adott detektált up- vagy down-state. Az up-state kezdetek pontosabb térbeli lokalizációja érdekében minden csatornán detektáltuk a fáziskezdeteket a kinyert MUA burkológörbéket felhasználva, vagyis ebben az esetben nem adtuk össze a csatornákat. A kiszámolt küszöb minden csatorna esetén az adott csatornán számolt átlagos down-state amplitúdó és egy fix, minden csatornára vonatkozó globális érték összege volt. A különböző csatornák között akár jelentős variabilitás is lehetett down-state amplitúdókban, ezért a szórások helyett ennek a fix értéknek az alkalmazása biztosította, hogy azonos szinten detektáljuk a lassú oszcilláció fázisait a különböző csatornákon. Mivel a MUA szintje ketamin-xylazin altatás alatt nagyon alacsony az I. és II. kérgi rétegekben, valamint a VI. réteg fehérállományhoz közeli, alsó felében, azokat a csatornákat, melyek ezeknek a területeknek az elektromos aktivitását vezették el, figyelmen kívül hagytuk az elemzés során a pontatlan eredmények elkerülése érdekében. Ezután minden detektált up-state-re meghatároztuk, hogy melyik csatornán indult legkorábban. Az összehasonlításokat mindig egy referencia csatorna up-state-jeihez képest végeztük. Ez a referenciacsatorna mindig a legerősebb és legnagyobb fluktuációt mutató MUA szinttel rendelkező csatorna volt (leggyakrabban az egyik V. rétegi csatorna), ahol az állapotdetekció a legpontosabb eredményt adta. A legjobb MUA csatornát a következőképpen határoztuk meg: minden csatorna esetén kinyertük az egyenirányított MUA burkológörbéjét, majd elkészítettük ezeknek az amplitúdó-hisztogramjait (10. ábra). A hisztogramokon detektáltuk az aktív és az inaktív fázisokat reprezentáló két csúcs maximumát. A két csúcs közötti távolság jól jelzi a két fázis közötti amplitúdóbeli különbségeket. Minél távolabb helyezkednek el egymástól a csúcsok,

annál erősebb az aktivitás az aktív fázisban a down-state-hez képest, vagyis annál jobb a jel-zaj viszony.

Az állapotdetekciót elvégeztük spontán aktivitást és szomatoszenzoros ingerlést tartalmazó elvezetéseken is, majd összehasonlítottuk az eredményeket. A kapott eredményeket felvételenként hisztogram formájában ábrázoltuk, ami megmutatta, hogy hány darab aktív fázis indult először egy adott csatornán. Ezt követően a különböző csatornákon kapott értékeket összeadtuk aszerint, hogy melyik kérgi rétegben helyezkedett el az adott csatorna. Az összes detektált up-state számának ismeretében meghatároztuk, hogy mekkora valószínűséggel indult egy aktív fázis egy adott rétegből. Az I. és II. rétegek nem szerepeltek az analízisben, az innen kiinduló up-state-ek valószínűségét az alacsony sejtaktivitás miatt nullának feltételeztük.

5.5.4 Idő-frekvencia analízis

A relatív spektrogramokat wavelet analízissel számoltuk ki az LFP epochokból (Delorme és Makeig 2004). Az epochok 10 másodperc hosszúságúak voltak, az állapotkezdettel a szakasz közepén. Az alapvonal a 10 másodperc hosszú szakasz első 500 ms-os része volt. A spektrogramon csak egy 1300 ms hosszú szakasz látható a 10 másodperces szakasz közepéről, ahol az 500 ms az adott fáziskezdet előtti intervallum, míg a maradék 800 ms hosszú rész az adott fázis kezdete utáni intervallumot tartalmazza.

5.5.5 Szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott up-state-ek elemzése

A lassú ritmus fázisait szenzoros, elektromos, mágneses és optikai ingerléssel is ki lehet váltani (Hasenstaub és mtsai 2007; Massimini és mtsai 2007; Vyazovskiy és mtsai 2009; Kuki és mtsai 2013). A kísérleteink során mechanikus szomatoszenzoros ingerlést alkalmaztunk: előre beállított frekvenciával ritmikusan megérintettük az állat bőrét. Az ingerléssel kiváltott aktív fázisok kinyeréséhez először detektáltuk az up-state-eket a detekciós algoritmusunkkal. Az ingerek időpontjaiból és a detektált up-state kezdetekből esemény-körüli időhisztogramot (peristimulus time histogram, PSTH) készítettünk, mely megmutatta a kiváltott aktív fázisok mennyiségét és ezek időbeli késését az ingerkezdetekhez képest. A PSTH mellett fázishisztogramot is készítettünk, mely

megmutatta, hogy az adott szomatoszenzoros ingerek a lassú oszcilláció melyik fázisba estek. Egy lassú oszcillációs ciklust 10 részre osztottunk.

A kiváltott up-state-eket az ingert jelző, triggercsatornán látható jel időpontja és az up-state kezdete közötti időkülönbség alapján határoztuk meg. Azokat az up-state-eket tekintettük kiváltott up-state-eknek, melyek 10-60 ms-al az ingerlés időpontja után kezdődtek és minimum 50 ms hosszúságúak voltak. Ezeket az eseményeket kiválogattuk, majd külön elemeztük a kiváltott up-state kezdethez kötött CSD és MUA mélységi profilok elkészítése után. Az eredményeket összehasonlítottuk a spontán kialakuló aktív fázisok mélységi profiljaival. Egy adott felvételben minden olyan detektált up-state-et, ami nem felelt meg a kiváltott up-state definíciójának, spontán aktív fázisnak osztályoztunk.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a kiváltott up-state-ek mennyiségét hogyan befolyásolja, ha az állat testének különböző területeit ingereljük. Ehhez kiválasztottunk nyolc, egymástól minimum 2 cm-re található pontot a patkány testén (hátsó láb, törzs, mellső láb), majd egymás után minden ponton ingereltünk (min. 300 inger/pont) az elektromos tevékenység egyidejű regisztrálásával. Ezt követően meghatároztuk a kiváltott MUA válasz maximumát egy, az V. kérgi rétegben található csatornán, valamint az ingerléssel kiváltott up-state-ek arányát (az ingertől számított, 60 ms-on belül detektált up-state-ek száma osztva az összes inger számával).

5.6 Statisztikai elemzés

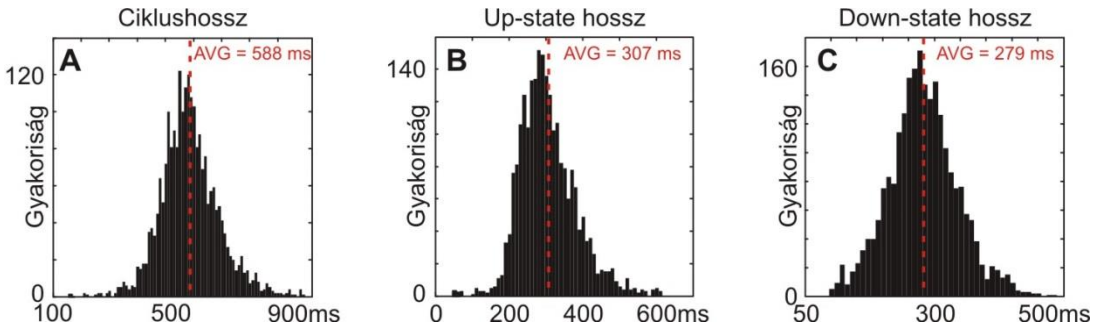
A Statistica 11 szoftvert (StatSoft, Tulsa, OK, USA) használtuk a statisztikai elemzésekhez. Az értékek átlag ± szórás vagy a főátlagok esetén átlag ± standard hiba (SE) ± szórás (SD) alakban vannak kifejezve. A két populációból származó adatok összehasonlítására a független, kétmintás t-próbát alkalmaztuk. A normális eloszlás tesztelésére Kolmogorov-Smirnov próbát használtunk Lilliefors szignifikancia korrekcióval. A 0.05 vagy ennél kisebb *p* értékeket tekintettük szignifikánsnak.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

6. EREDMÉNYEK

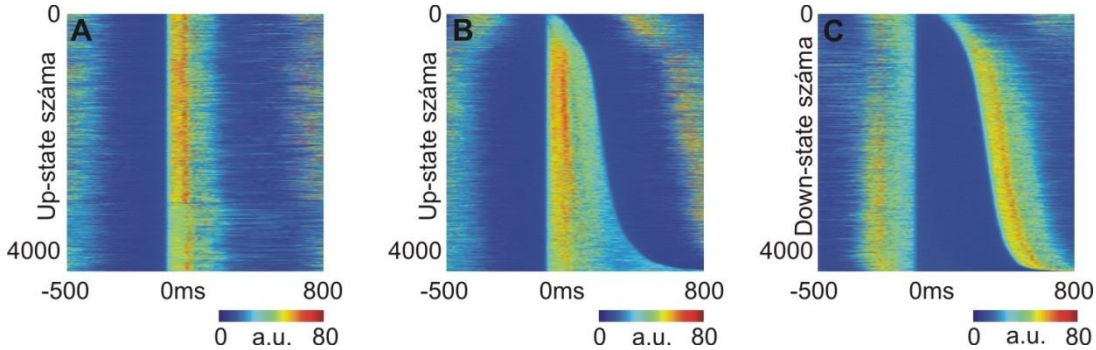
6.1 *Patkány szomatoszenzoros agykérgéből elvezetett, ketamin-xylazin által indukált spontán lassú hullámú aktivitás fázisainak időtartam szerinti eloszlása*

Az állapotdetekciós módszer során a MUA-ból kinyert burkológörbe amplitúdóértékeiből készített hisztogram bimodális eloszlást mutat (10. ábra). Az eloszlásgörbén látható két csúcs az up- és a down-state-eknek felel meg. A detekciós algoritmus által kiszámolt küszöbérték, amivel az aktív és inaktív fázisok pontos kezdőidőpontjait határoztuk meg, a hisztogram két csúcsa közé esett. A detekciós algoritmusunk számolt eredményei alapján az átlagos up-state hossz 292.77±111.73 ms-nak adódott (időtartomány: 50-894 ms), míg a down-state-ek átlagosan 305.29±94.17 ms hosszúak voltak (időtartomány: 100-819 ms). Egy teljes lassú oszcillációs ciklus 601.73±162.15 ms hosszú volt átlagosan (időtartomány: 151-1473 ms). A 11. ábra egy reprezentatív kísérletben detektált up- és down-state-ek, valamint a teljes lassú-hullámú ciklus hosszértékeiből készített hisztogramokat mutatja. Az altató folyamatos adagolása mellett a ketamin-xylazin által indukált lassú oszcilláció hosszú ideig stabil marad, az up- és down-state-ek időbeli hossza nem ingadozik jelentős mértékben (12. ábra/A). A detekciós módszer megfelelő eredménye a 12. ábrán látható képeken jól megfigyelhető: a kékes területek felelnek meg a down-state-eknek, a sárgás-pirosas részek pedig az aktív fázisoknak. A képeken szinte minden up-state előtt és után is megtalálható a vele szomszédos down-state, valamint minden detektált fázis eleje valóban a 0 ms-hoz tartozó időpontba esik.



11. ábra – A lassú oszcilláció fázisainak átlagos hossza és a fázisok hosszúságának eloszlása egy reprezentatív kísérletben. A *- Lassú oszcillációs ciklusok (up- és down-state) hosszának eloszlása.* ***B*** *- Up-state-ek hosszának eloszlása.* ***C*** *– Down-state-ek hosszának eloszlása. x- tengely: a fázisok hossza (10 ms nagyságú rekeszek), y-tengely: az adott rekeszben található események száma. A szaggatott piros vonalak mutatják az adott fázis átlagos hosszát. Az átlagos hosszúság értéke a jobb felső sarokban látható.*

Egy 46 perc hosszú felvétel körülbelül 4500 up-state-et tartalmazott, melyeknek a hossza nagyrészt a 200-400 ms közötti időtartományba esett (12. ábra/B). Összesen 56263 up-state-et detektáltunk (n = 20 állatból), amiből 35520 (61.77%) eseménynek a hosszúsága esett 200 és 400 ms közé (átlagos hosszúságú up-state-ek). Két másik csoportot is vizsgáltunk: az 50-200 ms hosszú up-state-eket (n = 11629; 20.43%, rövid up-state-ek) és a 400 ms-nál hosszabb aktív fázisokat (n = 9114; 17.8%, hosszú up-state-ek). A műtermékek eltávolítása és az adatok ellenőrzése után (csak azokat az up-state-eket elemeztük, melyeket legalább 200 ms hosszú down-state-ek követtek és előztek meg) a megmaradt up-state-ek száma kb. 30%-al csökkent az eredeti értékekhez képest (átlagos: 24513 db (66.6%), rövid: 5434 db (14.8%), hosszú: 6858 db (18.6%)). Ezeket az up-state-eket dolgoztuk fel és elemeztük a továbbiakban. Mivel nem találtunk szignifikáns különbséget a szomatoszenzoros kéreg törzsi és hátsó lábi régiójából elvezetett adatok elemzésének eredményei között, ezért a két régió eredményeit összevontuk.



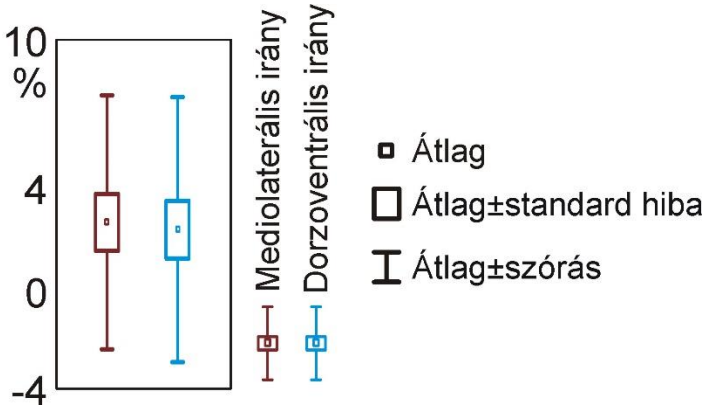
12. ábra – A detekciós algoritmus helyes működésének ellenőrzése. A *– A detektáláshoz felhasznált jelből készített hőtérkép, mely a detektált up-state-eket (n = 4337, 46 perces regisztrátum, ami három 15 perces felvételből lett összefűzve) mutatja, az aktív fázisok megjelenésének valós sorrendjében (az y-tengely mentén, fentről lefele). Az up-state-ek a 0 ms-nál kezdődnek és meleg színekkel vannak jelezve. A down-state-eket a hideg színek jelölik.* ***B*** *– Az* ***A*** *panelen látható up-state-ek hosszúság szerint sorba rendezve. Az ábra felső részén a rövid, alsó részén a hosszú up-state-ek láthatóak.* ***C*** *– A 46 perces felvételen detektált down-state-ek hosszúság szerint sorba rendezve. Az ábra felső részén a rövid,*

alsó részén a hosszú down-state-ek láthatóak. Megfigyelhető, hogy az up- és down-state-ek hossza és hosszának eloszlása hasonló volt. x-tengely: idő, y-tengely: az adott fázis száma, z-tengely: a MUA burkológörbéjének színkódolt amplitúdója (a.u. – arbitrary unit).

6.2 *A vizsgált szomatoszenzoros agykérgi területek rétegeinek vastagsága*

A ’Módszerek’ fejezet ’Hisztológia’ alfejezetében leírt módon megbecsültük, hogy a szövettani protokoll során milyen dorzoventrális, illetve mediolaterális irányú méretbeli változás történt a koronálisan metszett agyszeleteken. Fontos megemlíteni, hogy mindkét vizsgált irányban van egy bizonyos nagyságú hibája a becslésnek. Egyrészt az elektróda vastagsága 80 µm, valamint a sztereotaxiás célzásnak is van valamekkora hibája. Mindkét tény a mediolaterális irányú változás mérésének hibáját növelheti. Másrészt, az elvezető kontaktusok felülete is viszonylag nagy, ezért az elektromos áram alkalmazása során keletkező szöveti lézió kiterjedése is relatíve nagy lesz, ami pedig a dorzoventrális irányú eredmények bizonytalanságát növelheti.

A 13. ábrán látható eredmények egy kb. 2-3% nagyságú szöveti duzzadást mutattak, mind a mediolaterális (2.76 ± 4.68%), mind pedig a dorzoventrális (2.42 ± 5.3%) tengely mentén. A natív és a Nissl-festett agyszeletek között nem találtunk jelentős méretbeli eltéréseket (7. ábra), így azt feltételezzük, hogy a méretbeli változás a krómzselatin hatása lehet, ami odatapasztja a metszeteket a tárgylemezre. Mivel a hisztológiai procedúrák során bekövetkező szöveti változás ilyen kismértékűnek adódott, ezért az elemzéseink során nem alkalmaztunk korrekciós faktort.



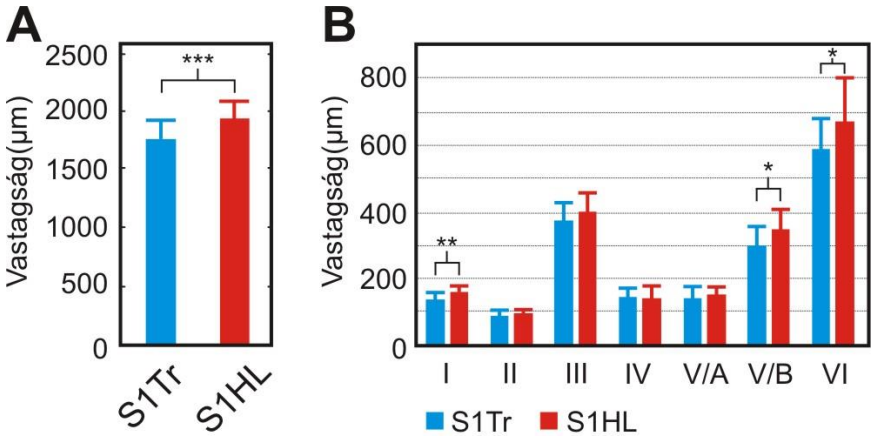
13. ábra – Az agyszövet méretének változása a hisztológiai folyamatok hatására. *Piros szín jelöli a mediolaterális irányban történő változást, kék pedig a dorzoventrális irányú*

változást. A középső kis négyzet jelzi az átlagot, a körülötte lévő doboz az átlag±standard hibát, a bajszok pedig az átlag±szórás értékeit jelölik.

A kérgi elektromos jeleket elvezető csatornákat a Nissl-festett koronális metszetek (egy anatómus számára viszonylag könnyen azonosítható réteghatárok) és a szomatoszenzoros ingerlés (legkorábbi sejtaktivitás és áramnyelő a talamorecipiens IV. rétegben regisztrálható) eredményei alapján rendeltük a megfelelő kérgi rétegekhez. A kemény agyhártya felett és a kérgi VI. réteg alatti fehérállományban található kontaktusokról elvezetett adatokat kihagytuk az elemzésből. A Nissl-festett agykérgi metszeteken aránylag könnyen be lehet azonosítani a hat fő kérgi réteget (14. ábra, 17. ábra). Az ebben a tanulmányban vizsgált szomatoszenzoros kérgi régiókban az I. réteget (layer I) körülbelül 150 µm vastagnak mértük (S1Tr: 137 ± 23 µm; S1HL: 160 ± 23 µm). Ez a réteg egy relatíve világos és sejtekben ritka sáv, melyet a vékony (~100 µm), nagy sejtdenzitású II. réteg követ (layer II, sötétebb sáv; S1Tr: 88 ± 20 µm; S1HL: 95 ± 16 µm). A II. réteget gyakran egybevonják a III. réteggel (layer III). Utóbbinak átlagos vastagsága ezen a kérgi területen kb. 400 µm és főként piramissejteket tartalmaz (S1Tr: 375 ± 56 µm; S1HL: 401 ± 59 µm). A III. réteg alatt található kb. 150 µm vastag, sötét sáv a főként tüskés csillagsejtekből álló talamorecipiens IV. réteg (layer IV, S1Tr: 146 ± 29 µm; S1HL: 143 ± 18 µm). Ez alatt helyezkedik el az V. réteg (layer V), melyben az összes réteg közül a legnagyobb méretű piramissejtek találhatóak. Az V. réteget a szomatoszenzoros kéregben két alrétegre oszthatjuk, a vékonyabb és kevesebb sejtet tartalmazó, világosabb, kb. 150 µm vastag Va rétegre (layer V/A, S1Tr: 142 ± 36 µm; S1HL: 153 ± 24 µm), mely elsősorban kisméretű dendritbojttal rendelkező (slender-tufted) piramissejteket tartalmaz (Schubert és mtsai 2006), valamint a kb. 300 µm vastagságú, nagyobb sejtsűrűségű Vb rétegre (layer V/B, S1Tr: 300 ± 59 µm; S1HL: 347 ± 64 µm), mely főként nagyméretű dendritbojttal rendelkező (thick-tufted) piramissejtekből áll (Chagnac-Amitai és mtsai 1990; Kasper és mtsai 1994). A VI. réteg (layer VI), mely legventrálisabban és közvetlenül a fehérállomány felett található, a legvastagabb az összes közül, több mint fél mm-es átlagos vastagsággal (S1Tr: 589 ± 91 µm; S1HL: 669 ± 136 µm).

Szignifikáns különbséget találtunk a két vizsgált terület vastagságában: a hátsó lábhoz tartozó szomatoszenzoros régió átlagosan kb. 200 µm-el volt vastagabb a törzsi

régiónál (S1Tr vs S1HL; 1777 vs 1969 µm; p=0.0009; 14. ábra). Ez a különbség elsősorban az Vb és VI. rétegek közötti méretkülönbségekből adódik (Vb réteg: 300 µm vs 347 µm, p=0.0243; VI. réteg: 589 µm vs 669 µm, p=0.036).

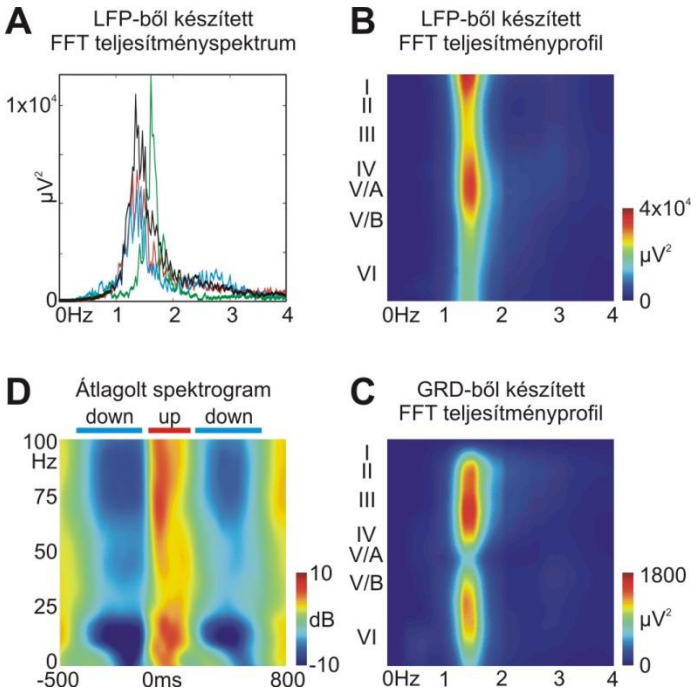


14. ábra – A vizsgált elsődleges szomatoszenzoros kérgi régiókban mért rétegvastagságok. A – *A törzshöz (kék, n = 23 mérés) és a hátsó lábhoz tartozó (piros, n = 15 mérés) kérgi régiók vastagsága. A két terület vastagsága szignifikánsan különbözött egymástól, a hátsó lábhoz tartozó szomatoszenzoros területet minden esetben vastagabbnak találtuk (S1Tr vs. S1HL, p = 0.0009, független, kétmintás t-próba).* ***B -*** *A törzshöz (kék) és a hátsó lábhoz (piros) tartozó kérgi régiók rétegeinek vastagsága. A két terület közötti vastagságkülönbség főként az Va és VI. rétegek közötti vastagságkülönbségből ered. (S1Tr I. réteg vs. S1HL I. réteg, p = 0.0044; S1Tr II. réteg vs. S1HL II. réteg, p = 0.3072; S1Tr III. réteg vs. S1HL III. réteg, p = 0.1744; S1Tr IV. réteg vs. S1HL IV. réteg, p = 0.7266; S1Tr Va réteg vs. S1HL Va réteg, p = 0.2955; S1Tr Vb réteg vs. S1HL Vb réteg, p = 0.0243; S1Tr VI. réteg vs. S1HL VI. réteg, p = 0.0361, független, kétmintás t-próba). *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.*

6.3 A ketamin-xylazin által indukált spontán lassú hullámú aktivitás spektrális tulajdonságai

Ketamin-xylazin altatás alatt a lassú oszcilláció frekvenciája valamivel magasabb a lassú hullámú alvás során megfigyelt lassú hullámok frekvenciájánál és általában ritmikusabb is (Crunelli és Hughes 2010; Chauvette és mtsai 2011). A saját kísérleteinkben 1.5 ± 0.26 Hz-es átlagos csúcsfrekvenciát mértünk, mely valamivel magasabb, mint a macskákban megfigyelt 0.6-1 Hz-es frekvenciatartomány (Steriade és mtsai 1993d), azonban megfelel más csoportok által patkányokban talált eredményeknek (Sharma és mtsai 2010; David és mtsai 2013). Négy kísérlet regisztrátumain gyors Fourier transzformációval (fast Fourier transform, FFT) számolt V. rétegbeli teljesítményspektrum látható a 15. ábra A paneljén. A spektrum csúcsa mind a négy

esetben az 1-2 Hz-es tartományba esett. Ez jellemző volt az összes kísérletre, a csúcsfrekvenciák minden esetben e között a két érték között helyezkedtek el (tartomány: 1.098-1.952 Hz). A 15. ábra B és C paneljén az egyik kísérlet során elvezetett LFP és az ebből származtatott GRD jelek teljesítményspektrumának lamináris profilja látható. A teljesítményprofilt az összes csatornán a 0.6-4 Hz közötti frekvenciatartományban számolt FFT teljesítményspektrum térbeli interpolálásával kaptuk meg (köbös spline interpoláció). Az LFP teljesítményprofilján megfigyelhető, hogy a teljesítmény viszonylag egyenletesen oszlott meg a rétegek között (egy I. rétegi és egy V. rétegi csúccsal), míg a grádiens jel teljesítményprofilján két nagyobb csúcs volt látható: az első a II.-IV. rétegekben található, míg a második, kisebb csúcs a VI. rétegben helyezkedett el. Az up-state kezdetekhez kötött epochokból számolt relatív spektrogramok erős teljesítménynövekedést mutattak az aktív fázisok alatt a 0.6-100 Hz-es frekvenciasávban, míg a down-state-ek alatt teljesítménycsökkenés volt látható (15. ábra/D), mely megfelel a szakirodalomban található adatoknak.

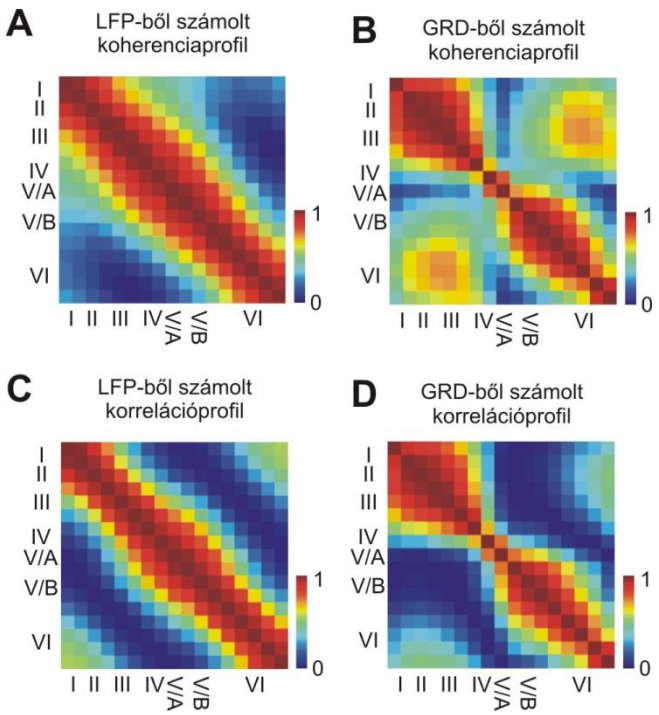


15. ábra – A ketamin-xylazin által indukált lassú oszcilláció spektrális tulajdonságai. ***A –*** *Négy állatból elvezetett V. rétegi LFP jel FFT-vel készített teljesítményspektruma. A jelek 80 másodperc hosszúak voltak, a frekvencia felbontása 0.0125 Hz. A regisztrált lassú oszcilláció csúcsfrekvenciája minden esetben az 1 és 2 Hz közötti tartományba esett.* ***B –*** *Az LFP FFT-vel számolt teljesítményspektrumából interpolációval készített mélységi eloszlás profil egy reprezentatív állatban. x-tengely: frekvencia, y-tengely: kérgi mélység,*

jelezve a rétegeket, z-tengely: színkódolt FFT teljesítmény. ***C*** *- A GRD FFT-vel számolt teljesítményspektrumából térbeli interpolációval készített mélységi eloszlás profil egy reprezentatív állatban. x-tengely: frekvencia, y-tengely: kérgi mélység, jelezve a rétegeket, z-tengely: színkódolt FFT teljesítmény.* ***D*** *– V. rétegi LFP up-state kezdethez kötött szakaszainak átlagolt, relatív spektrogramja. Jól látható, hogy up-state alatt széles sávban megnövekszik a spektrális teljesítmény, míg down-state alatt lecsökken. x-tengely: idő, y-tengely: frekvencia, z-tengely: színkódolt relatív spektrális teljesítmény dB-ben.*

6.4 *A lassú hullámú aktivitás szomatoszenzoros kérgi rétegek közötti korrelációja és koherenciája*

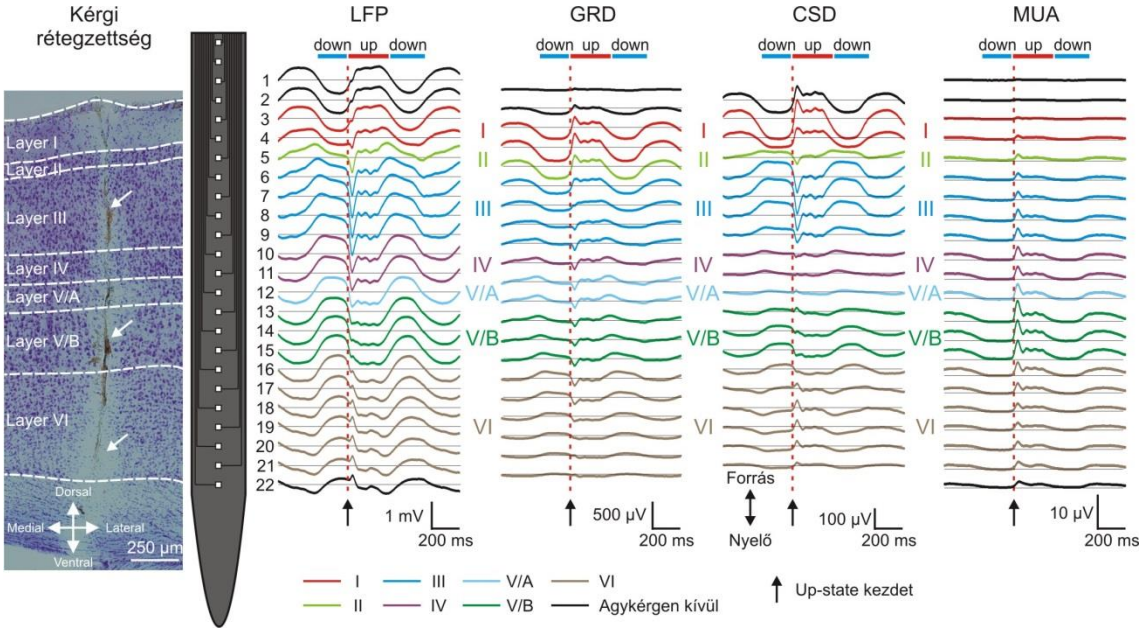
A lassú hullámok hullámalakjainak rétegek közötti hasonlóságát a csatornák közötti korreláció és a 0.3-3 Hz-es sávban számolt koherencia kiszámolásával vizsgáltuk (Csercsa és mtsai 2010). Az LFP-t vizsgálva a szomszédos vagy egymáshoz közel elhelyezkedő csatornák között a korreláció és koherencia magas értékeket eredményezett, mely azt jelzi, hogy az LFP fokozatosan változik a távolság függvényében (16. ábra/A, C). A GRD-nél számolt korreláció és koherencia-értékek alapján azt találtuk, hogy a szupragranuláris kérgi rétegek között erősebb kapcsolat van, de magas a két számolt mennyiség értéke a VI. réteg és a szupragranuláris I.-III. rétegek között is (16. ábra/B, D). Hasonló eredményeket láttunk minden kísérletnél. A legkisebb értékeket az V. réteg és a szupragranuláris rétegek között kaptuk.



16. ábra – Korreláció és koherencia a kérgi rétegek között. *Az LFP* ***(A)*** *és a GRD* ***(B)*** *rétegek közötti koherenciájának mélységi profilja a 0.3-3 Hz-es frekvenciatartományban. x- és y-tengely: kérgi mélység a megfelelő rétegekkel, z-tengely: a jelek színkódolt, csatornapáronként számolt koherenciája. Az LFP* ***(C)*** *és a GRD* ***(D)*** *rétegek közötti korrelációjának mélységi profilja. x- és y-tengely: kérgi mélység a megfelelő rétegekkel, z-tengely: a jelek színkódolt, csatornapáronkénti korrelációja.*

6.5 A spontán kialakuló aktív fázisok lamináris mélységi profilja a szomatoszenzoros kéregben

Az up-state kezdetek meghatározása után a folytonos jelekből 1300 ms hosszú szakaszokat vágtunk ki, melyek 0 ms-os időpontja jelölte az up-state kezdetet. Mind az LFP-re, mind a MUA-ra és a két származtatott jelre (GRD, CSD) kiszámoltuk az up-state kezdethez kötött átlagokat (17. ábra).



17. ábra – Az elektróda elvezető kontaktusainak hozzárendelése a kérgi rétegekhez és az up-state kezdethez kötött elektrofiziológiai jelek átlagainak mélységi eloszlás profilja. *Bal oldalon egy Nissl-festett koronális metszet látható az elektróda nyomával (fehér nyilak). A kérgi rétegek határait szaggatott fehér vonalak jelzik. Középen a kísérletekhez használt 24 kontaktusú szilícium elektróda vázlatos képe látható, méretarányosan a koronális metszet dimenzióihoz képest. Jobb oldalon az LFP, GRD, CSD és MUA görbék up-state kezdethez kötött átlagai helyezkednek el, minden csatornán kiszámolva. Az átlagok 1300 ms hosszúak és egy up-state-et és két down-state-et tartalmaznak (egy az up-state előtt és egy utána). Az up-state kezdetének helyét a fekete nyilak és a szaggatott piros vonalak jelzik. A különböző rétegek különböző színekkel*

vannak jelölve. Az elektróda legfelső három kontaktusa az agykérgen kívül helyezkedett el. Az elektróda és a görbék a bal oldali metszeten látható kérgi rétegekhez vannak igazítva. LFP – lokális mezőpotenciál, GRD – lokális mezőpotenciál grádiens, CSD – áramforrás-sűrűség, MUA – soksejt-aktivitás.

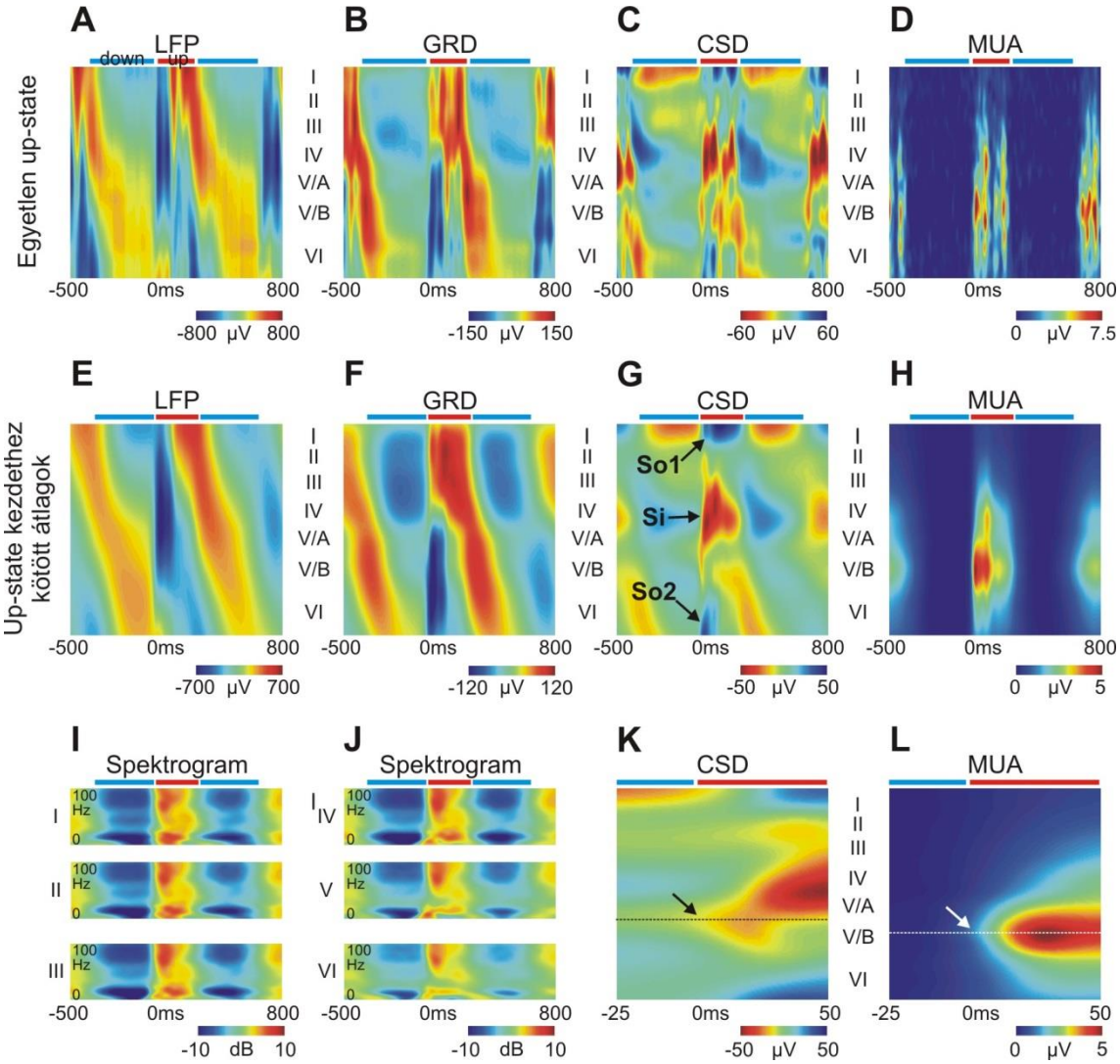
Egy reprezentatív kísérlet eredményei láthatóak a 17. ábrán. A csatornákat a Nissl-festett metszetek segítségével a megfelelő kérgi rétegekhez rendeltük. Az 1300 ms hosszú, átlagolt szakaszok egy up-state-et tartalmaznak, ami a szakasz közepén helyezkedik el, valamint ezt az up-state-et megelőző és azt követő down-state-eket. Az átlagolt görbékből a szomszédos csatornák értékeinek térbeli interpolálásával hőtérképeket készítettünk (köbös spline interpoláció) a lassú oszcilláció fázisai alatt kialakuló áramok és sejtaktivitás téridőbeli eloszlásának könnyebb átláthatósága és megértése érdekében (18. ábra).

A szomatoszenzoros kéregből elvezetve az elektromos aktivitást, 10-16 Hz-es orsó aktivitás figyelhető meg az aktív fázisok során. Az orsó egy hulláma, hasonlóan a lassú hullám ciklusához, egy erősebb sejtaktivitással járó, rövid aktív (~40 ms) és egy alacsonyabb sejtaktivitást mutató (~40 ms) fázisból állt. A vizsgált átlagos hosszúságú (200-400 ms) up-state-ek esetén ez átlagosan 3-5 db orsó hullámot jelentett. Az átlagolás után legtöbb esetben az orsó aktivitás már nem volt látható az átlagban (18. ábra), azonban néhány kísérlet során (n = 4) olyan mértékben szinkronizált és fáziskapcsolt volt a lassú oszcillációval, hogy az átlagban is láthatóak voltak az egyes orsóhullámok (20. ábra). Főként a MUA-n voltak jól megfigyelhetőek a nagyobb és kisebb aktivitású szakaszok váltakozásai.

Az up-state kezdetekhez kötött főátlagok esetén az aktív fázisok két részét vizsgáltuk (19. ábra/A): az up-state elejét (átlagoltuk az up-state kezdet utáni 25-50 ms-os szakaszt) és az up-state közepét (átlagoltuk az up-state kezdet utáni 125-175 ms-os szakaszt). A főátlagok elkészítéséhez az időbeli átlagokat az egy rétegbe tartozó csatornák szerint is átlagoltuk. Az így kapott értékeket normalizáltuk, végül a kísérletek között is átlagoltunk, megkapva a főátlagot. Ezeket az LFP, GRD, CSD és MUA jelekre egyaránt kiszámoltuk. A MUA értékek pontosabb meghatározása érdekében először kiszámoltuk az egyes csatornákhoz tartozó zajszintet, melyet a down-state-ek alatti aktivitás-mentes tartományból becsültünk. A zaj értékét utána levontuk a MUA átlagokból.

Az átlagos hosszúságú up-state-eket rétegelemzéssel megvizsgálva a következő eredményeket kaptuk a reprezentatív kísérlet hőtérképein, valamint a 20 kísérlet eredményéből készített normalizált főátlagokon. A lokális mezőpotenciál mélységi profiljában az up-state elejét negatív potenciál jellemezte, IV. rétegi csúccsal, mely csak a VI. rétegben fordult át pozitivitásba (18. ábra/A,E; 19. ábra/B). Röviddel az első 50 ms után a felső rétegekben az up-state már pozitív polaritásra váltott. Az aktív fázis közepén a polaritásváltás valahol a II.-III. rétegek között található. Az ezek alatt elhelyezkedő rétegekből már negatív amplitúdójú up-state-eket vezettünk el. Ebben az időtartományban (125-175 ms) voltak megfigyelhetőek az LFP jelek maximális amplitúdóértékei is. A grádiens jelet megvizsgálva azt találtuk, hogy az up-state elején egy pozitív polaritású, II. rétegbeli csúcs fordul át negatívba a III.-IV. rétegben, melynek legmagasabb értéke az V. rétegben található (18. ábra/B, F; 19. ábra/C). Az aktív fázis közepén ez a mély rétegi negativitás pozitivitásba váltott át, csupán az V. réteg alján és a VI. rétegben maradt a grádiens kismértékben negatív. A CSD mélységi profilja egy nagykiterjedésű és erős áramnyelőt (Si) mutatott az up-state elején, főként a III. és IV. rétegekben, valamint az V. réteg felső szegmensében (18. ábra/C, G, K; 19. ábra/D). Ezt a - feltehetőleg aktív - áramnyelőt két passzív áramforrás vette körül, egy erősebb az I. rétegben (So1), a kéreg tetején és egy gyengébb a VI. rétegben, a kéreg alján (So2). Az átlagolt CSD profilokon a mély kérgi áramforrás az up-state közepére megszűnt, míg a felső, I. rétegi áramforrás kitartott az up-state végéig. Az áramnyelő amplitúdója lecsökkent és az up-state előrehaladtával a mélyebb kérgi rétegek felé tolódott. Az up-state kezdetekhez kötött átlagokon vizsgált MUA mélységi profilján azt találtuk, hogy a legnagyobb mértékű populációs aktivitás az V. kérgi rétegben alakult ki (azon belül is az Vb alrétegben) és az aktivitás erőssége fokozatosan csökkent mind a ventrális, mind pedig a dorzális irány mentén (18. ábra/D, H, L; 19. ábra/E). Az I. és II. rétegekben a kísérletek többségében csak minimális mértékű sejtaktivitás volt detektálható. A populációs aktivitás az idő előrehaladtával is csökkent: az up-state elején körülbelül 30%-al volt erősebb a sejtaktivitás minden rétegben, mint az up-state közepén mért aktivitás. Az up-state-ek alatt az LFP jelek spektrális teljesítményében minden rétegben erős teljesítménynövekedést találtunk az 1-100 Hz-es frekvenciatartományban az up-state-eket megelőző down-state-ekhez képest (18. ábra/I, J).

DOI:10.14753/SE.2017.1961

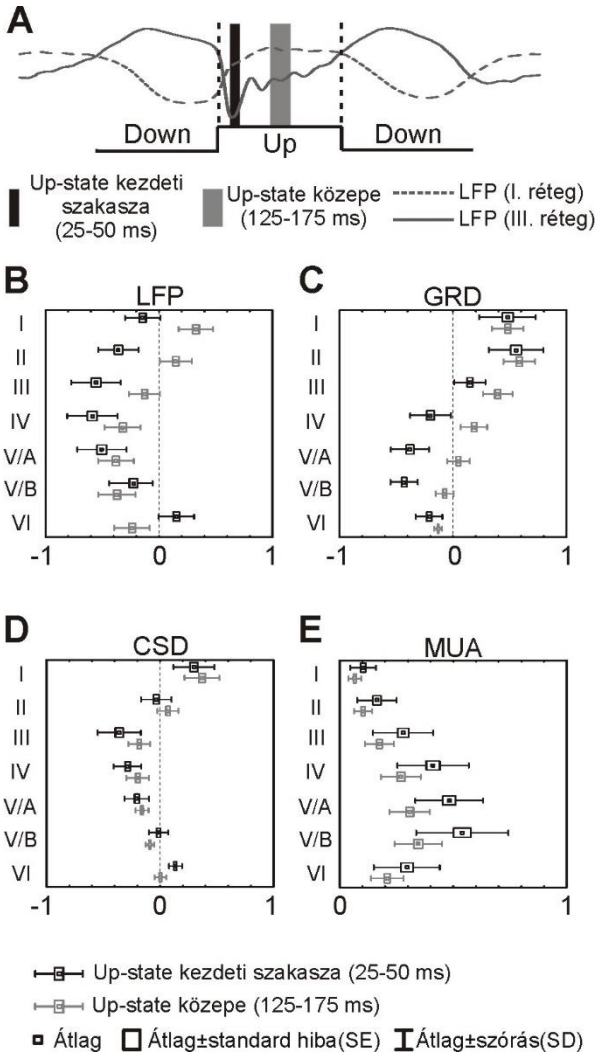


18. ábra – Az átlagos hosszúságú (200-400 ms) up-state-ek rétegelemzése. *(A-D) Egyetlen up-state rétegelemzése. (E-H) Az egyes up-state-ek (n = 3082) átlagolásával kapott up-state kezdethez kötött mélységi profiltérképek. (A,E) lokális mezőpotenciál (LFP), (B,F) LFP grádiens (GRD), (C,G) áramforrás-sűrűség (CSD), (D, H) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdó-értékek. Az LFP és GRD profilok esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja (So1: szupragranuláris áramforrás, Si: áramnyelő, So2: infragranuláris áramforrás). MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. (K-L) A CSD (K) és MUA (L) átlagokhoz tartozó mélységi profilok nagyobb időbeli felbontásban, az up-state kezdeténél kialakuló áramok jobb megjelenítése érdekében. Jól látható, hogy első áramnyelő és a sejtaktivitás is az V. rétegben indul be (nyilak és pontozott vonalak). (I-J) A felső (I) és mély (J) kérgi rétegekből elvezetett LFP-ből számolt up-state kezdethez kötött és átlagolt relatív spektrogramok. x-tengely: idő, y-tengely: frekvencia, z-tengely: színkódolt átlagos relatív spektrális teljesítmény dB-ben kifejezve. Minden panelen a mélységi profilok felett*

elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő lassú oszcillációs fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont az up-state kezdetét jelzi.

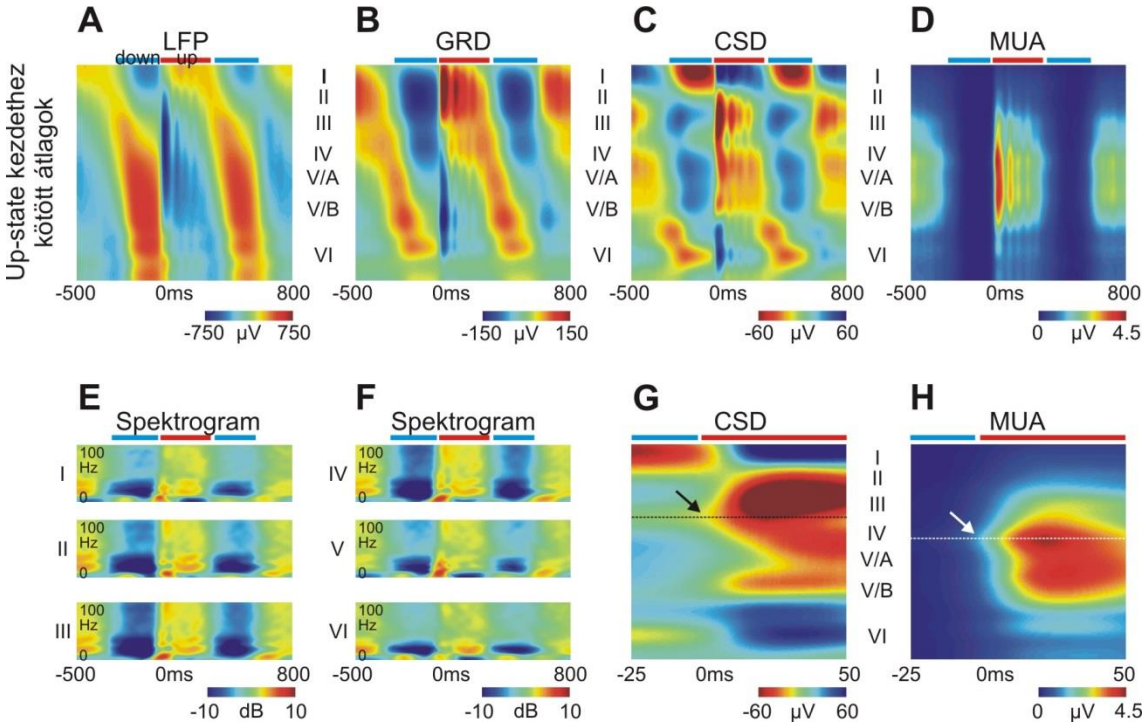
Mind a CSD, mind a MUA mélységi profilok arra utalnak, hogy az up-state első 50 ms-os szakasza során, vagyis lényegében az első orsóhullám aktív fázisa alatt a legerősebb az aktivitás, mely aztán az idő előrehaladtával csökken. Az up-state közepe utáni csökkenés viszont részben már a különböző hosszúságú up-state-ek összeátlagolásának következménye, ezért erről a szakaszról nem is készítettünk főátlagokat. A spontán kialakuló aktív fázisok elejét megvizsgálva azt láttuk, hogy átlagosan az V. kérgi rétegben indult el legelőször a sejtaktivitás, melyhez egy gyenge áramnyelő társult (18. ábra/K, L). A soksejt-aktivitás innen terjed tovább a szupragranuláris és infragranuláris rétegek irányába. Néhány kísérlet (n = 4/20) esetén azonban az átlagolt MUA IV. rétegi indulást mutatott, és a legkorábbi áramnyelő is ebben a rétegben volt megfigyelhető (20. ábra/G, H). Ezeket a kísérleteket általában nagymértékben szinkronizált, ritmikus orsó aktivitás jellemezte az aktív fázisok alatt.

DOI:10.14753/SE.2017.1961



19. ábra – Up-state kezdethez kötött főátlagok az összes kísérlet (n = 20) adataiból számolva. *(A) Az aktív fázisok főátlagok kiszámításához használt szakaszai. (B-E) Az up-state kezdeténél (25-50 ms, fekete) és az up-state-ek közepénél (125-175 ms, szürke) mért értékek normalizált főátlagainak doboz-bajusz ábrái. (B) lokális mezőpotenciál (LFP), (C) LFP grádiens (GRD), (D) áramforrás-sűrűség (CSD), (E) soksejt-aktivitás (MUA). Átlag: kis doboz, átlag±standard hiba (SE): nagy doboz, átlag±szórás (SD): bajusz.*

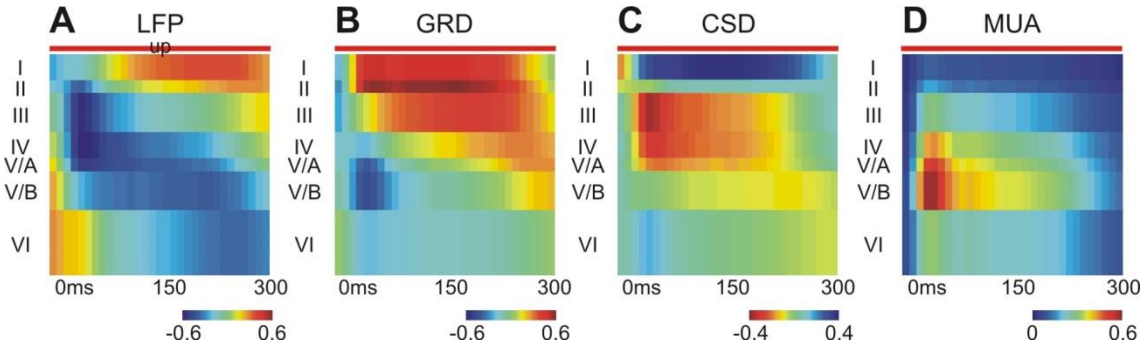
DOI:10.14753/SE.2017.1961



20. ábra – Szinkronizált, ritmikus orsó aktivitást tartalmazó átlagos hosszúságú (200-400 ms) up-state-ek rétegelemzése. *(A-D) Up-state kezdethez kötött átlagolt mélységi profiltérképek. (A) lokális mezőpotenciál (LFP), (B) LFP grádiens (GRD), (C) áramforrás-sűrűség (CSD), (D) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi.(G-H) A CSD (G) és MUA (H) átlagok nagyobb időbeli felbontásban, az up-state kezdeténél kialakuló áramok jobb vizualizációja érdekében. Jól látható, hogy első áramnyelő és a sejtaktivitás a IV. rétegben indul (nyilak és pontozott vonalak). (E-F) A felső (E) és mély (F) kérgi rétegekből elvezetett LFP-ből számolt up-state-hez kötött és átlagolt relatív spektrogramok. x-tengely: idő, y-tengely: frekvencia, z-tengely: színkódolt átlagos relatív spektrális teljesítmény dB-ben kifejezve. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont az up-state kezdetét jelzi.*

A 18. ábra E-H paneljein látható mélységi profilok egy reprezentatív kísérlet up-state kezdethez kötött átlagait mutatja. Ha nemcsak az up-state elejéhez és a közepéhez tartozó főátlagokat számoljuk ki, hanem az aktív fázis minden 10 ms-os időintervallumához tartozó átlagokat is, akkor a 18. ábrán látható hőtérképekhez hasonló hőtérképeket kapunk (21. ábra). A hőtérképek elkészítése a következőképpen történt: az up-state elejétől indulva (0 ms) egészen 300 ms-ig minden 10 ms-os időablak értékeit

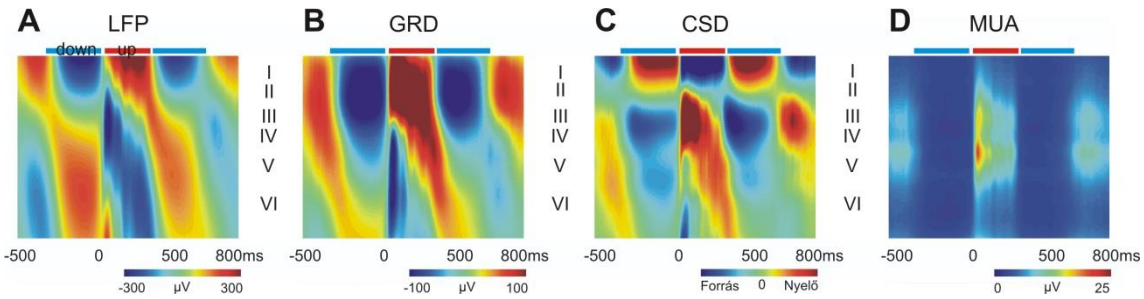
először átlagoljuk az idő szerint (20 mintapont), majd a megfelelő rétegekbe tartozó csatornák között, végül normalizáljuk az értékeket és átlagoljuk azokat a kísérletek (n = 20) között is. A végső hőtérképekhez az up-state kezdete előtti 10 ms-os szakasz átlagát is kiszámoltuk. Az eredményül kapott mélységi profilokon hasonló téridőbeli eloszlásokat kapunk vissza, mint amit a 18. ábrán látható reprezentatív kísérlet mélységi profiljain is megfigyelhettünk. Jól látható például a teljes up-state alatt végigvonuló áramnyelő a kéreg tetején, mely az up-state elején egy forrás-nyelő-forrás konfigurációt alkot a kéreg középső rétegeiben található nagy kiterjedésű és erős áramnyelővel, valamint a rövid ideig tartó és gyenge infragranuláris áramforrással (21. ábra/C). Az V. rétegi nagymértékű populációs aktivitás és annak térbeli és időbeli csökkenése is jól látható a 21. ábra D paneljén.



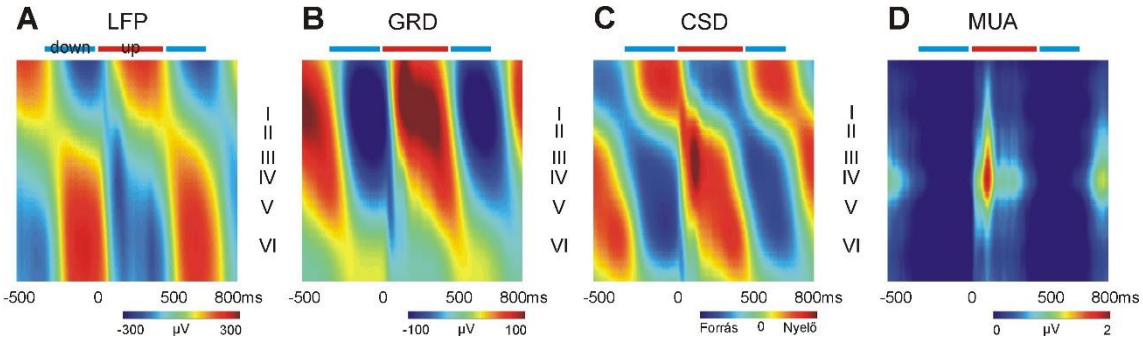
21. ábra – Az összes kísérlet átlagából számolt normalizált mélységi profilok az átlagos hosszúságú aktív fázisok esetén. *Minden 10 ms-os intervallumra kiszámoltuk a főátlagot az up-state kezdetétől (0 ms) minden kérgi rétegben. A hőtérképeket ezek alapján az értékek alapján készítettük el. A) lokális mezőpotenciál (LFP), (B) LFP grádiens (GRD), (C) áramforrás-sűrűség (CSD), (D) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA jelekhez tartozó színkódolt, normalizált amplitúdók. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi.*

A kísérletek egyik fontos célja a kutatócsoportunk által emberből regisztrált lassú hullámú aktivitás vizsgálati eredményeinek (Csercsa és mtsai 2010) összehasonlítása az állatkísérletes modellen kapott eredményekkel. A humán elvezetéseket nem szilícium-alapú elektródákkal végezték, a használt elektróda formája és az elvezetési kontaktusok alakja, valamint mérete is különbözött az itt alkalmazott szilícium eszköz paramétereitől

(rajzszög elektróda, (Ulbert és mtsai 2001)). Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk, hogy a patkányokon kapott eredmények mennyire függenek attól, hogy milyen típusú elektródával végeztük az elvezetéseket és ezáltal mennyire lesznek összehasonlíthatóak az itt kapott eredmények a humán eredményekkel, kétféle, a humán kísérletekben alkalmazott elektróda-típushoz hasonló eszközzel (4. és 5. ábrák) is végeztünk néhány kísérletet. Az egyik elektróda dimenzióiban (fém multielektróda, n = 5 kísérlet), míg a másik a formájában (SU-8 elektróda, n = 4 kísérlet, (Marton és mtsai 2015)) hasonlít a humán rajzszög elektródára. A kétféle elektródával elvégzett kísérletek regisztrátumait elemezve azt találtuk, hogy az up-state kezdethez kötött, átlagolt mélységi profilok hasonló mintázatokat mutattak, mint a szilícium elektródával regisztrált jelekből készített mélységi profilok (22. és 23. ábrák). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a kísérletekhez használt mérőelektróda típusa nincs jelentős hatással a kapott eredményekre.



22. ábra – Egy lineáris, fém multielektródával végzett reprezentatív kísérlet mélységi profiljai. *(A-D) Up-state kezdethez kötött átlagolt mélységi profiltérképek. (A) lokális mezőpotenciál (LFP), (B) LFP grádiens (GRD), (C) áramforrás-sűrűség (CSD), (D) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont az up-state kezdetét jelzi.*

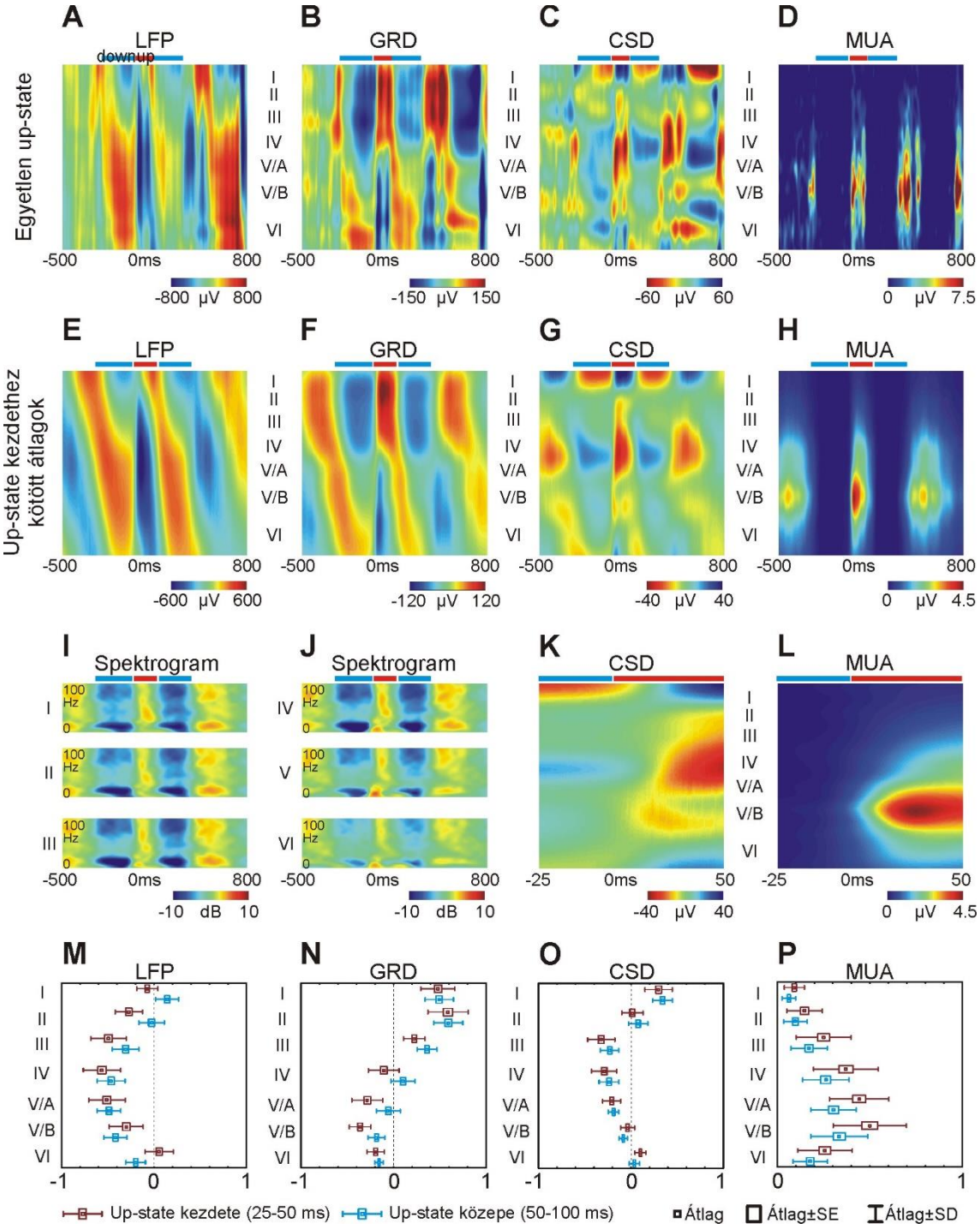


23. ábra– Egy lineáris, polimer-alapú (SU-8) multielektródával végzett reprezentatív kísérlet mélységi profiljai. *(A-D) Up-state kezdethez kötött átlagolt mélységi profiltérképek. (A) lokális mezőpotenciál (LFP), (B) LFP grádiens (GRD), (C) áramforrás-sűrűség (CSD), (D) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont az up-state kezdetét jelzi.*

6.6 A rövid és hosszú spontán aktív fázisok lamináris mélységi profilja a szomatoszenzoros kéregben

Az átlagos hosszúságú aktív fázisok elemzése után megvizsgáltuk a rövid (50-200 ms) és hosszú (> 400 ms) up-state-ek mélységi profiltérképeit is, azonban csak minimális kvantitatív különbségeket találtunk a korábbi fejezetekben bemutatott eredményekhez képest (24., 25. ábrák). A sejtaktivitás és a CSD mintázatai is hasonlóak voltak a 200-400 ms hosszú up-state-eknél látottakhoz, mind az aktív fázis elején, mind pedig az aktív fázis közepén. Az up-state közepéhez tartozó értéknek a rövid up-state-ek esetén az 50 és 100 ms közötti szakasz átlagát vettük, míg a hosszú up-state-ek esetén a 175-225 ms-os intervallum átlagát. A rövid up-state-ek 2-3 orsóciklust tartalmaztak átlagosan, míg a 400 ms-nál hosszabb aktív fázisok általában 5-nél többet.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

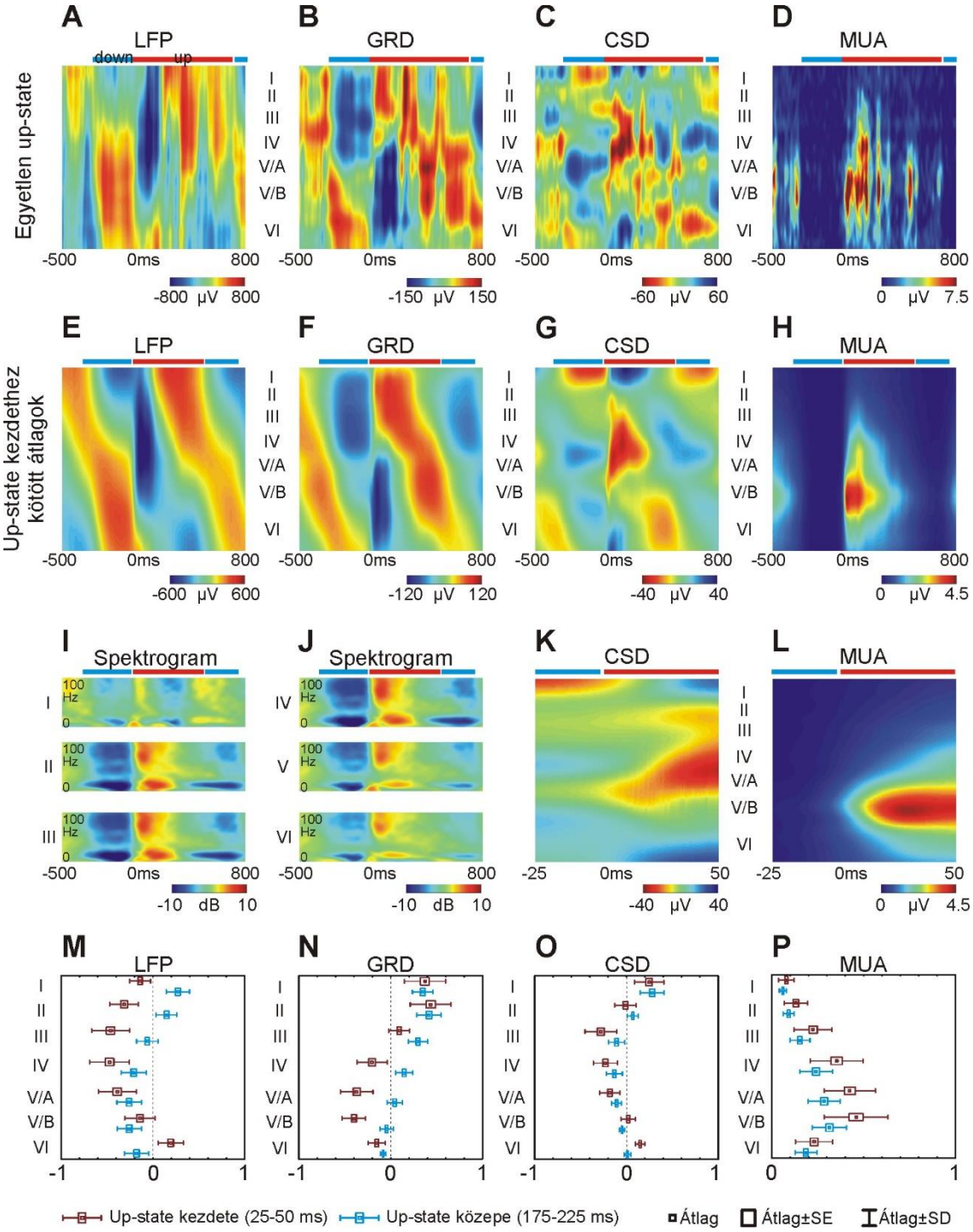


24. ábra – A rövid (50-200 ms) up-state-ek rétegelemzése. *(A-D) Egyetlen up-state rétegelemzése. (E-H) Az egyes up-state-ek (n = 596) átlagolásával kapott up-state kezdethez kötött mélységi profiltérképek. (A,E) lokális mezőpotenciál (LFP), (B,F) LFP grádiens (GRD), (C,G) áramforrás-sűrűség (CSD), (D, H) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. (K-L) A*

CSD (K) és MUA (L) átlagok nagyobb időbeli felbontásban, az up-state kezdeténél kialakuló áramok jobb megjelenítése érdekében. Jól látható, hogy a legkorábbi áramnyelő és sejtaktivitás az V. rétegben található. (I-J) A felső (I) és mély (J) kérgi rétegekből elvezetett LFP-ből számolt up-state-hez kötött és átlagolt relatív spektrogramok. x-tengely: idő, y-tengely: frekvencia, z-tengely: színkódolt átlagos relatív spektrális teljesítmény dB-ben kifejezve. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont az up-state kezdetét jelzi.(M-P) Az összes patkány adataiból kapott normalizált főátlagok doboz-bajusz ábrái az up-state elején (25-50 ms, piros) és az up-state közepén (50-100 ms, kék). (M) LFP, (N) GRD, (O) CSD, (P) MUA. Átlag: kis doboz, átlag±standard hiba (SE): nagy doboz, átlag±szórás (SD): bajusz.

Mind a rövid, mind pedig a hosszú up-state kezdetekhez kötött, átlagolt mélységi profilokon megfigyelhető a forrás-nyerő-forrás konfiguráció az up-state elején, bár a rövid up-state-ek esetén a mély kérgi áramforrás valamivel kisebb intenzitású, mint az átlagos és a hosszú up-state-eknél. Az átlagos hosszúságú aktív fázisokhoz hasonlóan a rövidnek és hosszúnak minősített aktív fázisok is egy V. rétegi áramnyelővel kezdődnek az esetek többségében, valamint a sejtaktivitás is ebben a rétegből indul és terjed a kéreg felszíne és alsó része felé.

DOI:10.14753/SE.2017.1961



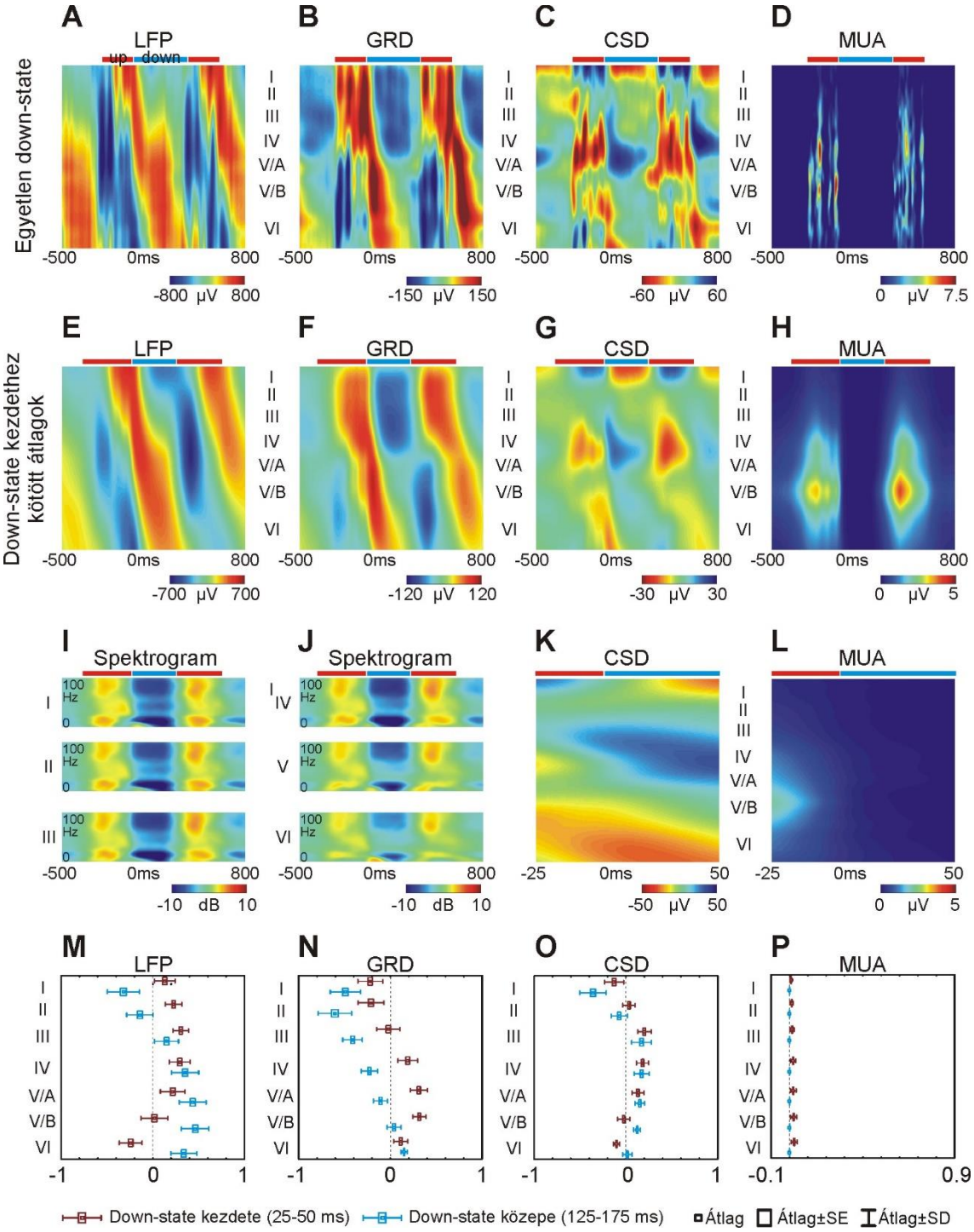
25. ábra – A hosszú (> 400 ms) up-state-ek rétegelemzése. *(A-D) Egyetlen up-state rétegelemzése. (E-H) Az egyes up-state-ek (n = 634) átlagolásával kapott up-state kezdethez kötött mélységi profiltérképek. (A,E) lokális mezőpotenciál (LFP), (B,F) LFP grádiens (GRD), (C,G) áramforrás-sűrűség (CSD), (D, H) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony*

aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. (K-L) A CSD (K) és MUA (L) átlagok nagyobb időbeli felbontásban, az up-state kezdeténél kialakuló áramok jobb megjelenítése érdekében. Jól látható, hogy a legkorábbi áramnyelő és sejtaktivitás az V. rétegben található. (I-J) A felső (I) és mély (J) kérgi rétegekből elvezetett LFP-ből számolt up-state-hez kötött és átlagolt relatív spektrogramok. x-tengely: idő, y-tengely: frekvencia, z-tengely: színkódolt átlagos relatív spektrális teljesítmény dB-ben kifejezve. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont az up-state kezdetét jelzi.(M-P) Az összes patkány adataiból kapott normalizált főátlagok doboz-bajusz ábrái az up-state elején (25-50 ms, piros) és az up-state közepén (175-225 ms, kék). (M) LFP, (N) GRD, (O) CSD, (P) MUA. Átlag: kis doboz, átlag±standard hiba (SE): nagy doboz, átlag±szórás (SD): bajusz.

6.7 *A spontán kialakuló down-state-ek rétegelemzése a szomatoszenzoros kéregben*

A lassú hullámú aktivitás inaktív fázisának az elemzése hasonló, de ellentétes polaritású mintázatot eredményezett az LFP, GRD és CSD mélységi profiljának vizsgálata során az up-state-ekhez viszonyítva. A legnagyobb különbség a sejtaktivitásban volt, az irodalmi adatoknak megfelelően a down-state során egyik rétegben sem volt detektálható sejtaktivitás, sem a down-state elején, sem a down-state közepén (26. ábra jobb oldali oszlopa). Jelen tanulmányban a down-state kezdetét a sejttüzelés megszűnésével definiáltuk, azonban a főátlagban a down-state elején megfigyelhető egy minimális aktivitás (26. ábra/P), ami a lassú oszcilláció fázisainak detektálására használt algoritmus következménye. Ez az aktivitás lényegében a down-state-et megelőző aktív fázis alatti aktivitás lecsengése (az up-state vége), melyet az állapotdetektálás során meghatározott küszöbértékkel találtunk meg. Látható, hogy az up-state végén az V. rétegben tart ki legtovább az aktivitás a teljes neuronális csend beállta előtt (26. ábra/L). A CSD mélységi profilja azt mutatja, hogy először a III.-IV. rétegekben jelenik meg egy áramforrás, mely alatt egy áramnyelő helyezkedik el. Néhány milliszekundummal a down-state kezdet után ezt az áramforrás-áramnyelő párt egy agyfelszíni áramnyelő egészíti ki, mely a down-state során végig megmarad. A mély kérgi áramnyelő az inaktív fázis közepén már nem látható, a granuláris réteg területén kialakuló áramforrás pedig fokozatosan lejjebb húzódik a mélyebb rétegekbe.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

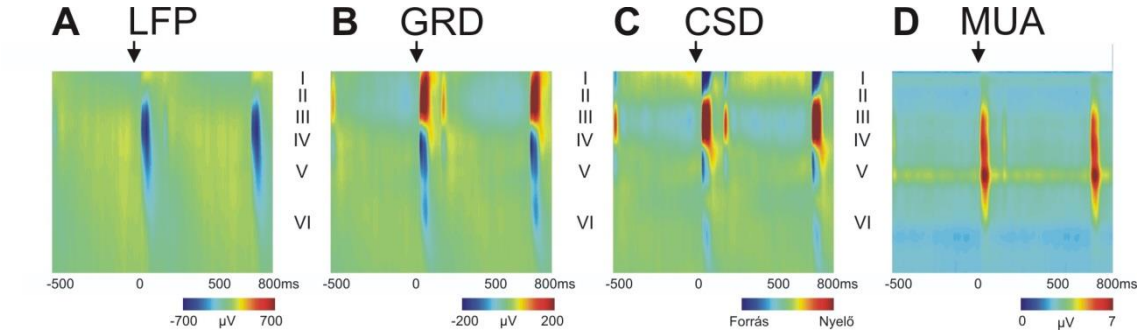


26. ábra – A átlagos hosszúságú (200-400 ms) down-state-ek rétegelemzése. *(A-D) Egyetlen down-state rétegelemzése. (E-H) Az egyes down-state-ek (n = 3030) átlagolásával kapott down-state kezdethez kötött mélységi profiltérképek. (A,E) lokális mezőpotenciál (LFP), (B,F) LFP grádiens (GRD), (C,G) áramforrás-sűrűség (CSD), (D, H) soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az*

áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. (K-L) A CSD (K) és MUA (L) átlagok nagyobb időbeli felbontásban, az down-state kezdeténél kialakuló áramok jobb megjelenítése érdekében. (I-J) A felső (I) és mély (J) kérgi rétegekből elvezetett LFP-ből számolt up-state-hez kötött és átlagolt relatív spektrogramok. x-tengely: idő, y-tengely: frekvencia, z-tengely: színkódolt átlagos relatív spektrális teljesítmény dB-ben kifejezve. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont a down-state kezdetét jelzi. (M-P) Az összes patkány adataiból kapott normalizált főátlagok doboz-bajusz ábrái a down-state elején (25-50 ms, piros) és a down-state közepén (125-175 ms, kék). (M) LFP, (N) GRD, (O) CSD, (P) MUA. Átlag: kis doboz, standard hiba (SE): nagy doboz, szórás (SD): bajusz.

6.8 A szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott up-state-ek rétegelemzése

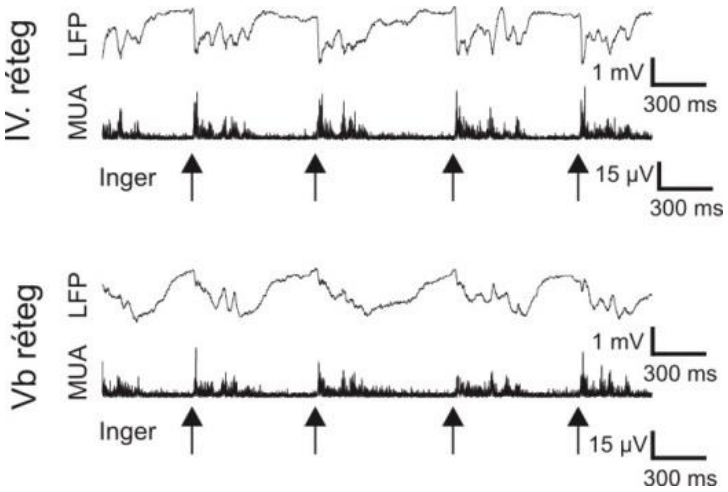
Szomatoszenzoros ingerlést végeztünk (n = 11 kísérlet) az állatok törzsének és hátsó lábának különböző területein a lassú oszcilláció frekvenciájának megfelelő ingerfrekvenciával annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk a kiváltott up-state-ek alatt kialakuló áramok és sejtaktivitás rétegek közötti eloszlását. Az ingerlések rövid, kb. 50 ms hosszúságú kiváltott válaszokat eredményeztek egy korai erős áramnyelővel a III.-IV. rétegben, melyhez egy felszíni és egy V. rétegi áramforrás, valamint nagymértékű sejtaktivitás társult, IV. rétegi indulással (27. ábra).



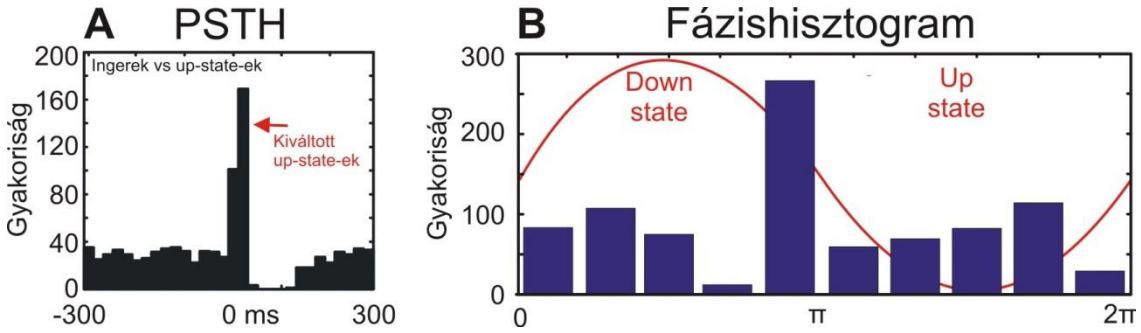
27. ábra – Az ingerléssel kiváltott válaszok rétegelemzése. *(A-D) Átlagolt kiváltott válaszok. x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: az LFP, GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. LFP és GRD esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. Az ingeradás időpontját a fekete nyilak jelzik (0 ms).*

Ismert, hogy a rövid idejű ingerek bizonyos valószínűséggel up-state-et válthatnak ki a kéregben (Hasenstaub és mtsai 2007). A mechanikus szomatoszenzoros ingerlés

eredményeként mi is megfigyeltük a kiváltott up-state-eket (28., 29 ábrák), melyeket egy nagy csúcs indikált a PSTH-n (29. ábra/A), kb. 15-30 ms-al az ingeradás után. A 29. ábrán látható fázishisztogramon is a kiváltott up-state-ekre utaló csúcsot figyeltünk meg: az adott ingerek nagy hányada közvetlen az up-state-ek kezdete előtt volt látható. Az ingerek körülbelül harmada-negyede (25.49 ± 7.29%) váltott ki up-state-et és több esetben akár másodperceken keresztül vezérelte a lassú oszcillációt (vagyis az egymást követő up-state-eket mind egy-egy szomatoszenzoros stimulus váltotta ki).



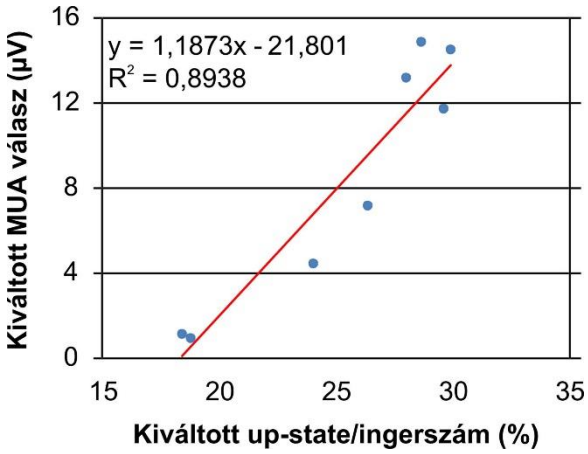
28. ábra – Egymást követő, ingerléssel kiváltott up-state-ek a IV. (fent) és Vb (lent) agykérgi rétegből. *Az ingerlés idejét a fekete nyilak jelzik. Ebben a példában az ingerlés véletlenszerűen történt, 500-700 ms ingerek közötti intervallumokkal. LFP – lokális mezőpotenciál, MUA – soksejt-aktivitás. Jól látható az ingerlés hatására az up-state elején kialakuló meredek LFP és erős sejtaktivitás a IV. kérgi rétegben.*



29. ábra – A lassú oszcilláció fázisai és az ingerlés közötti időbeli viszony. *(A) A detektált up-state kezdetek és a szenzoros ingerek közötti időbeli kapcsolat megvizsgálására készített ingerek körüli időhisztogram (PSTH). Az inger-időpontok szolgáltak referenciaként, ezek találhatóak a nulla időpontban. A rekeszek hossza 20 ms volt. A kiváltott up-state-eket egy nagy csúcs jelzi 15-30 ms környékén (piros nyíl). (B) Fázishisztogram, mely az aktív és inaktív fázisokban mutatja az adott fázis alatt érkező*

ingerek eloszlását. A nagy csúcs a down-state végén azt jelzi, hogy az ingerek nagy hányada az up-state kezdet előtt érkezett.

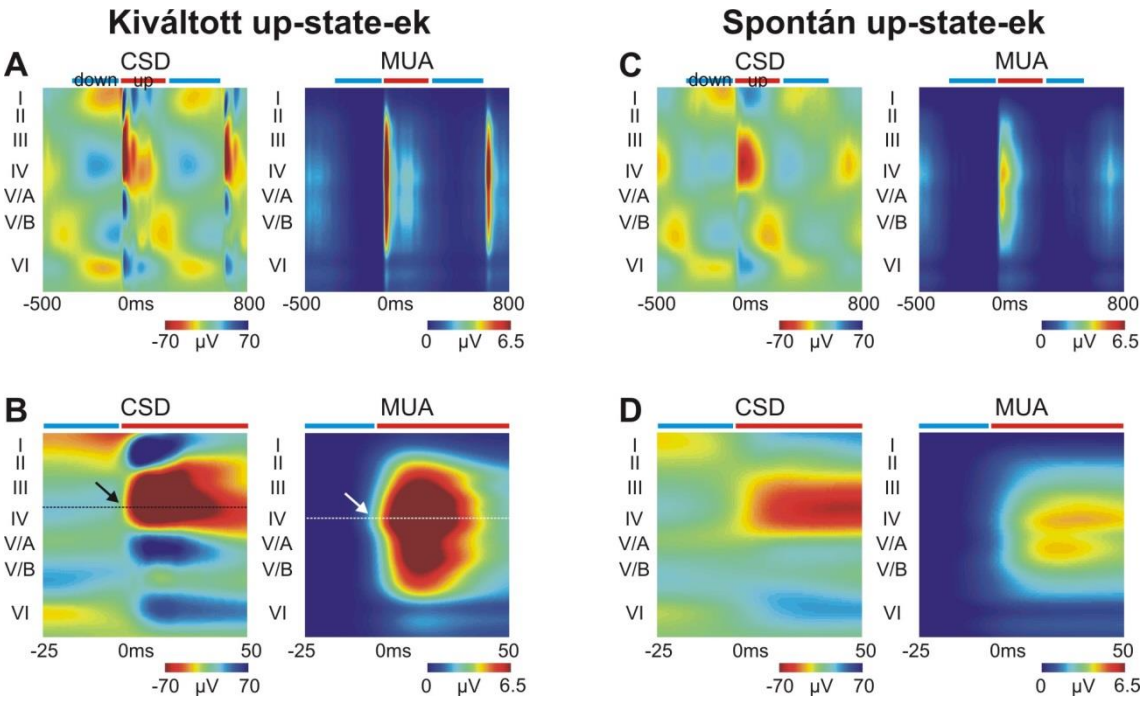
Korreláció figyelhető meg a detektált kiváltott up-state-ek száma és kiváltott szomatoszenzoros MUA válasz amplitúdója között. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a detektált kiváltott up-state-ek száma csökkent, amennyiben távolabb ingereltünk attól a helytől, ahol a legerősebb kiváltott szomatoszenzoros MUA válaszokat kaptuk (30. ábra). A példaként bemutatott kísérletben a 30. ábra szerint a legerősebb MUA válaszokat a törzs közepére érkező ingerek esetén kaptuk. Az ide adott ingerek kb. 30%-a váltott ki aktív fázist. Az állat nyakához, illetve farkához közeli törzsi részt ingerelve ez az érték lecsökkent 25%-ra. A vizsgált agyi területtől kontralaterálisan elhelyezkedő mellső és a hátsó lábakat ingerelve a kiváltott up-state-ek aránya 20% alá csökkent, párhuzamos a MUA válaszok amplitúdójának nagymértékű csökkenésével (30. ábra). Fontos még egyszer megemlíteni, hogy a kiváltott up-state-eket az ingerek után maximum 60 ms-al érkező aktív fázisokként definiáltuk. Ha figyelembe vesszük azt, hogy a lassú oszcilláció egy átlagos ciklusa kb. 600 ms hosszúságú, akkor annak valószínűsége, hogy egy 60 ms hosszú időintervallumban up-state érkezik (ingerlés nélküli, spontán esetben) kb. 10%. Ezt kontrollkísérletekkel igazoltuk is, mely során az ingerlő be volt kapcsolva, azonban nem érintette az állat egyik testrészét sem. Vagyis a receptív mező ingerlésével kapott kb. 30%-os érték valójában valamivel kevesebb, tehát átlagosan kb. minden negyedik vagy ötödik inger váltott ki egy-egy aktív fázist.



30. ábra – Az ingerléssel kiváltott MUA válasz nagysága és a kiváltott up-state-ek aránya közötti kapcsolat. *x-tengely: a detektált kiváltott aktív fázisok számának és az adott ingerek számának aránya (%). y-tengely: az ingerlésre adott átlagolt MUA válasz csúcsértéke az egyik V. rétegi csatornán mérve. A kiváltott MUA válasz amplitúdója az*

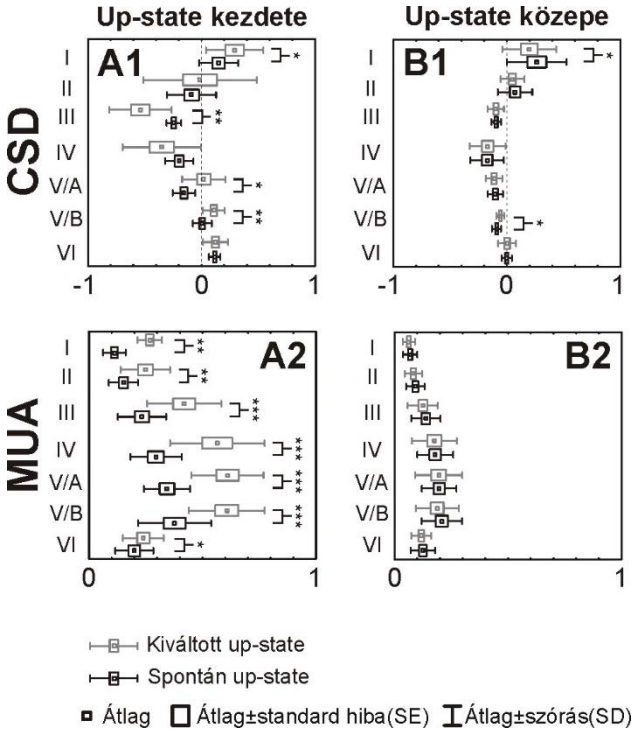
ingerlés helyétől függ: minél távolabb ingerlünk az elektróda közelében elhelyezkedő neuronok receptív mezőjétől, annál kisebb lesz a kiváltott válasz. Ezzel párhuzamosan a detektált kiváltott up-state-ek száma is csökken.

A kiváltott up-state-eket a spontán kialakuló up-state-ekhez hasonlóan elemeztük, vagyis az aktív fázisok alatt kialakuló áramok és sejtaktivitás lamináris eloszlását vizsgáltuk. A kiváltott aktív fázisok mélységi profiljait összehasonlítottuk a spontán kialakuló up-state-ek mélységi profiljaival. Az up-state elején kialakuló áramok és sejtaktivitás szignifikánsan erősebb volt a kiváltott up-state-ek esetében (31. ábra, 32. ábra). Ezt valószínűleg a kiváltott választ létrehozó közeli neuronpopuláció szinkron aktivitása okozhatta. A spontán esetben az aktív fázisok elején megfigyelt forrás-nyelő-forrás konfigurációt kiváltott up-state-ek esetében egy további, erős V. rétegi áramforrás egészítette ki, mely közvetlenül a markáns III.-IV. rétegi áramnyelő alatt volt megfigyelhető (31. ábra/A,B). A soksejt-aktivitás a kiváltott up-state-ek elején minden rétegben szignifikánsan erősebb volt a spontán up-state-ekben látottakhoz képest, és általában a IV. rétegben kezdődött (31. ábra, 32. ábra). A legkorábbi áramnyelő a III.-IV. rétegben volt látható. Az első 50 ms után a kiváltott up-state-ek időbeli lefutása hasonló volt, mint amit a spontán up-state-ek esetén megfigyeltünk (31. ábra, 32. ábra).



31. ábra – Ingerléssel kiváltott és spontán kialakuló up-state-ek lamináris mélységi profiljainak összehasonlítása. *(A-B) A kiváltott up-state-ekhez kötött mélységi profilok átlagolás után. Az up-state-ek 0 ms-nál kezdődtek. (C-D) A spontán up-state-ekhez kötött*

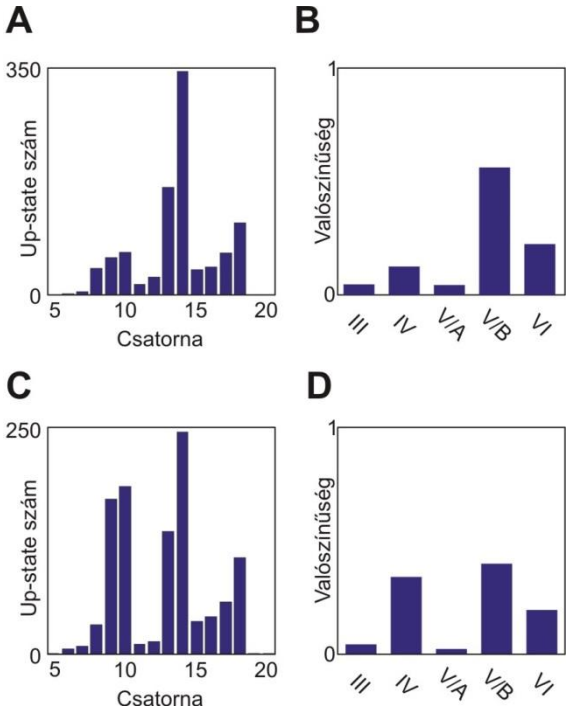
mélységi profilok átlagolás után. Áramforrás-sűrűség (CSD), soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-axis: a CSD-hez és a MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdóértékek. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. (B-D) A CSD és MUA átlagok nagyobb időbeli felbontásban, az up-state kezdeténél kialakuló áramok jobb megjelenítése érdekében. Minden panelen a mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). Megfigyelhető, hogy az első áramnyelő a III.-IV. rétegben alakul ki az up-state kezdeténél, a sejtaktivitás pedig a IV. kérgi rétegben kezdődik kiváltott up-state-ek esetén (nyilak és pontozott vonalak). Az áramok és a sejtaktivitás is szignifikánsan erősebb volt a kiváltott up-state-eknél az első 50 ms alatt, mint a spontán kialakuló up-state-eknél.



32. ábra – A kiváltott és spontán up-state-ek alatt kialakuló sejtaktivitás és transzmembrán áramok rétegek közötti eloszlásának összehasonlítása (n = 11 kísérlet). *(A) Kiváltott (szürke) és spontán (fekete) up-state kezdethez kötött CSD (A1) és MUA (A2) normalizált főátlagok az up-state elején (5-30 ms). (B) Kiváltott és spontán up-state kezdethez kötött CSD (B1) és MUA (B2) normalizált főátlagok az up-state közepén (125-175 ms). Áramforrás-sűrűség (CSD), soksejt-aktivitás (MUA). Átlag: kis doboz, átlag±standard hiba (SE): nagy doboz, átlag±szórás (SD): bajusz.*

6.9 Az up-state-ek alatti sejtaktivitás agykérgi rétegek közötti indulásának vizsgálata

Spontán up-state-ek vizsgálata esetén a sejtaktivitás az up-state kezdethez kötött átlagokon a legtöbb kísérlet esetén a nagy piramissejteket tartalmazó Vb rétegben kezdődött, míg a kísérletek kb. ötödénél és a kiváltott up-state-ek esetén a talamorecipiens IV. rétegben láttuk a legkorábbi MUA-t. Ezeknek az eredményeknek a tükrében megvizsgáltuk a spontán módon kialakuló up-state-ek alatti sejtaktivitás indulásának rétegek közötti eloszlását. Az I. és a II. rétegekben nagyon alacsony volt a sejtaktivitás, ezért a lassú oszcilláció fázisainak detektálása a MUA alapján nem megvalósítható kellő pontossággal ezekben a rétegekben. Emiatt az I. és II. rétegeket kihagytuk a elemzésből. Hasonló volt a helyzet a VI. réteg alsó részéből regisztráló néhány csatorna esetén is. A többi réteg esetén kiszámoltuk, hogy mekkora valószínűséggel indult az adott rétegből az aktív fázis alatti MUA (33. és 34. ábrák).

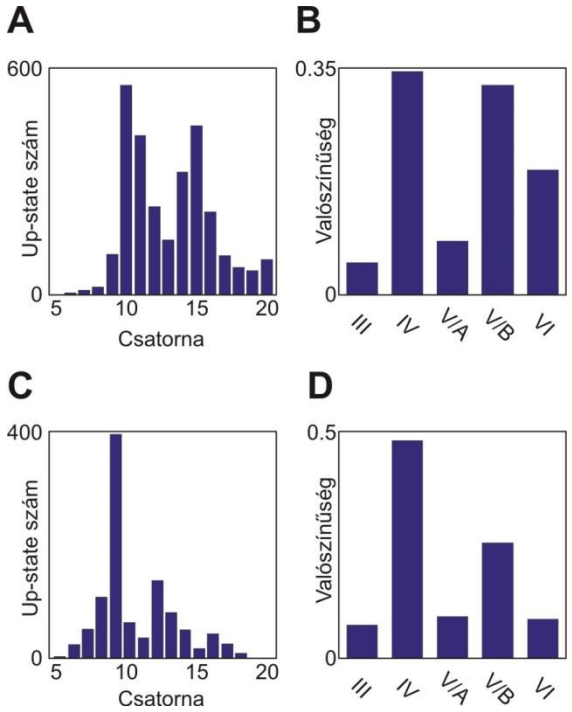


33. ábra – Up-state-ek MUA alapján detektált indulásának lamináris eloszlása spontán esetben és szomatoszenzoros ingerlés során. *(A) Egy reprezentatív kísérletben a különböző csatornákon detektált up-state-ek alatti legkorábbi sejtaktivitásból elkészített hisztogram. x-tengely: az elvezető csatorna száma, melyen a 'down-up' átmenetek során a legkorábbi sejtaktivitást detektáltuk. y-tengely: az adott csatornán detektált up-state-ek száma. Az alacsony sejtaktivitást mutató csatornákat nem vettük figyelembe az elemzés során. A hisztogram egy spontán elvezetésben detektált up-state-ekből készült. (B) A csatornákat a megfelelő kérgi rétegekhez rendeltük és kiszámoltuk a különböző rétegben,*

hogy mi volt a valószínűsége annak, hogy az adott rétegben kezdődött először az up-state alatti MUA. Az I. és II. rétegekből regisztráló csatornákat néhány VI. rétegi csatornával együtt kihagytuk az elemezésből, mivel a gyenge MUA pontatlan detekciót eredményezhet. Jól látható, hogy a spontán kialakuló up-state-ek alatt a sejtaktivitás az Vb rétegből indult a legnagyobb valószínűséggel, míg a többi rétegben annak a valószínűsége, hogy onnan indult az up-state alatti MUA, kicsi volt. (C-D) Szomatoszenzoros ingerlést tartalmazó regisztrátumban detektált up-state-ekből készített hisztogramok. Ingerlés hatására nagyobb eséllyel indult az up-state-ek alatti MUA a IV. rétegből (kiváltott up-state-ek), ezzel egy időben pedig az V. rétegből induló up-state-ek valószínűsége csökkent.

Az alkalmazott detekciós módszerrel a legtöbb csatornán megfigyelhető volt korai MUA (kivétel az I. és II. réteg, mivel ott a sejtaktivitás szintje alacsony volt), de volt néhány réteg, ahol az up-state-ek alatti sejtaktivitás korai indulásának valószínűsége jelentősen nagyobb volt a többi réteghez képest. Spontán esetben az aktív fázisok alatti MUA a legtöbb vizsgált állatban (n = 16/20) a legnagyobb valószínűséggel (> 50%) az Vb rétegben indult (33. ábra/A,B). Több kísérletünk során (n = 4/20) azonban nagyszámú, IV. rétegben detektált korai MUA-t kaptunk (> 20%, 34. ábra/A,B), sőt, némely esetben, a IV. rétegből induló események száma nagyobb volt, mint az V. rétegből kiinduló sejtaktivitást mutató up-state-ek száma (34. ábra/C,D).

A korábbi fejezetben láthattuk, hogy a kiváltott up-state-eknél a sejtaktivitás általában a IV. rétegben kezdődött. Ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogy vajon hogyan változnak meg a spontán esetben mért MUA-indulási valószínűségek rétegek közötti eloszlása ingerlés hatására. Eredményül azt kaptuk, hogy a spontán elvezetésekhez képest ingerlés során jelentős mértékben megnőtt a IV. rétegi indulást mutató aktív fázisok száma, míg ezzel egyidejűleg az V. rétegből induló up-state-ek mennyisége jelentősen lecsökkent (33. ábra/A, B vs. C, D). A IV. rétegből induló up-state-ek nagy többsége kiváltott up-state volt.

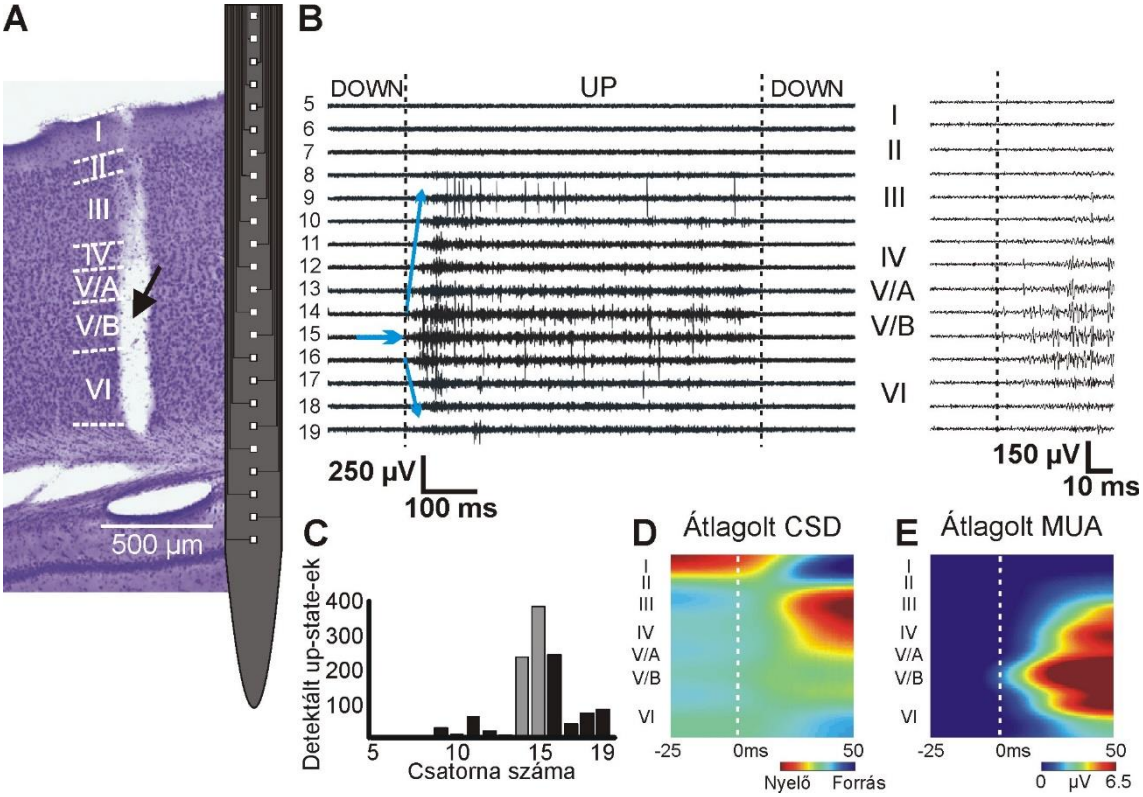


34. ábra – Spontán lassú hullámú aktivitás során megfigyelt nagyszámú IV. rétegi korai MUA az aktív fázisok alatt. *(A) Egy reprezentatív kísérletben a különböző elektródákon detektált up-state-ekből elkészített hisztogram. x-tengely: csatornaszám, melyen a down-up átmenetek során a legkorábbi sejtaktivitást detektáltuk. y-tengely: az adott csatornán detektált up-state-ek száma. Az alacsony sejtaktivitással rendelkező csatornákat és a bizonytalan detekciós eredményeket nem vettük figyelembe az elemzés során. A két nagy csúcs a 10-es és 15-ös csatornák fölött a IV. és Vb rétegek aktivitását mutatja. (B) A csatornákat a megfelelő rétegekhez rendeltük és kiszámoltuk a különböző rétegben, hogy mi a valószínűsége annak, hogy ott kezdődött egy adott up-state. Az I. és II. rétegekből regisztráló csatornákat néhány VI. rétegi csatornával együtt nem elemeztük, mivel a gyenge MUA pontatlan detekciót eredményezhet. Jól látható, hogy az up-state-ek alatti MUA gyakran indult a IV. és az Vb rétegből. (C-D) Példa egy másik állatból, mely során az up-state-ek alatti sejtaktivitás a IV. rétegben kezdődött a legnagyobb valószínűséggel.*

Az eredményeink alapján tehát az látható, hogy az up-state-ek alatti sejtaktivitás minden vizsgált kortikális rétegből kiindulhat, de főként a IV. és Vb rétegekben kezdődött először. A többi rétegből (III., Va és VI. rétegek) kiinduló up-state-ek száma viszonylag alacsony volt.

Ezt követően különválogattuk azokat az aktív fázisokat, melyek a MUA alapján a IV. és az Vb rétegekből indultak, majd kiszámoltuk az up-state kezdethez kötött, átlagolt CSD és MUA mélységi profiljaikat. Az V. kérgi rétegből induló spontán up-state-ekre láthatunk egy példát a 35. ábrán. Az ábrán látható up-state alatt a MUA az Vb rétegben elhelyezkedő 15. csatorna közeléből indult el, majd kb. 20 ms elteltével átterjedt a III.

kérgi rétegbe, valamint a VI. rétegbe a kéreg aljáig. A példaként bemutatott up-state egy 15 perc hosszú elvezetésből származik, mely kb. 1200 up-state-et tartalmazott. Ezeknek az up-state-eknek több mint a felét a 14. és 15. csatornákon detektáltuk először, mely csatornák az Vb rétegben helyezkedtek el (35. ábra/C). Nagy mennyiségű, kb. 200 up-state-et detektáltunk a szomszédos 16. csatornán is, azonban a hisztológia alapján ez a csatorna már a VI. rétegben helyezkedett el.

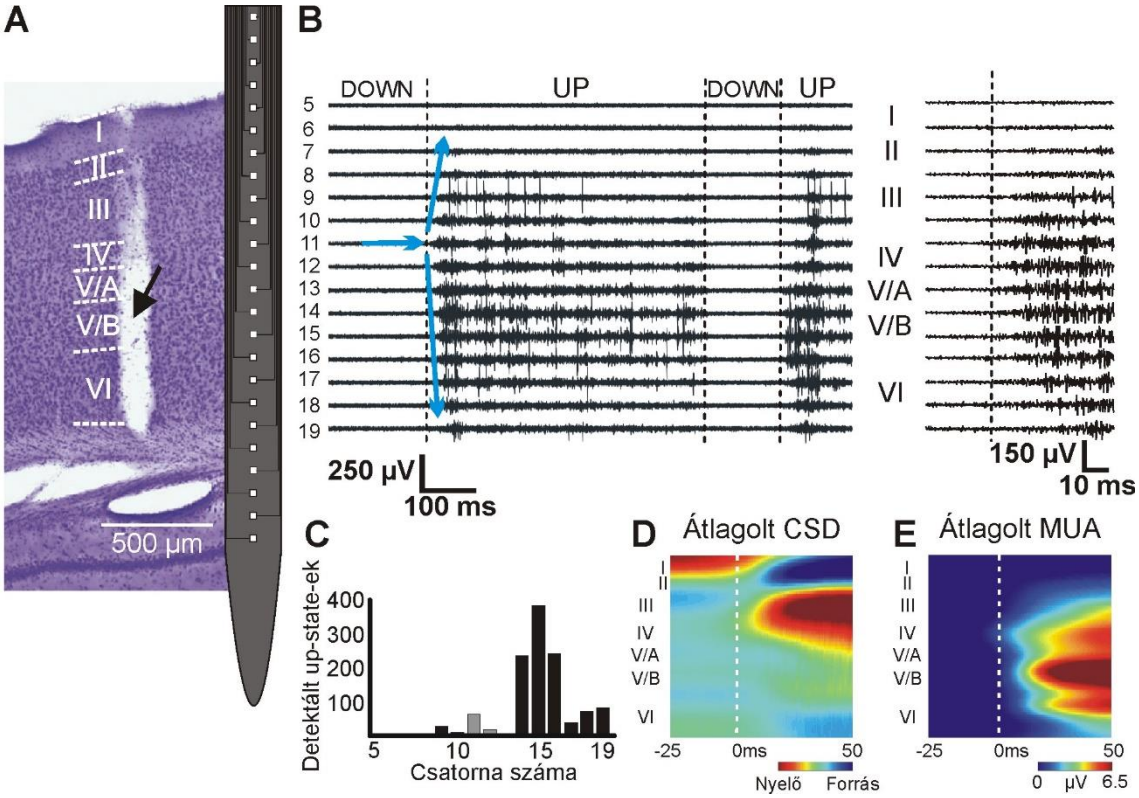


35. ábra – Az Vb kérgi rétegből induló spontán up-state-ek. *(A) Nissl-festett koronális metszet az elektróda nyomával és a rétegek eloszlása a szomatoszenzoros kéregben (S1Tr). Jobb oldalon az elvezetésekhez használt szilícium elektróda sematikus ábrája látható. (B) Soksejt-aktivitás (MUA) egy másodperc hosszú szakasza egy olyan up-state-el, mely során a MUA az Vb rétegből indult, majd a felső és mély rétegek fele terjedt tovább (kék nyilak). Jobb oldalon az up-state eleje látható nagyobb időbeli felbontásban. (C) Az egyes csatornákon elsőként detektált up-state-ek hisztogramja. Az Vb rétegből induló up-state-eket szürkével jelöltük (összes detektált up-state:1230). (D) Az Vb rétegből induló up-state-ek átlagolt áramforrás-sűrűség profilja. Az up-state-ek 0 ms-nál kezdődtek. (E) Az Vb rétegből induló up-state-ek átlagolt soksejt-aktivitás profilja.*

Az Vb rétegből induló, up-state kezdethez kötött, átlagolt MUA mélységi profilon jól látható a sejtaktivitás Vb rétegi indulása, mely aztán továbbterjed, először elérve VI., majd a IV., végül pedig a III. kérgi réteget. A CSD mélységi profilon egy gyenge, korai áramnyelő látható az V. rétegben, amit kb. 20 ms múlva egy erősebb áramforrás-

áramnyelő dipólus követ a granuláris és szupragranuláris rétegekben (35. ábra/D, E). Ezek megfelelnek a spontán up-state-ekből elkészített mélységi profilokon látható mintázatoknak, melyeket a korábbi fejezetekben bemutattam.

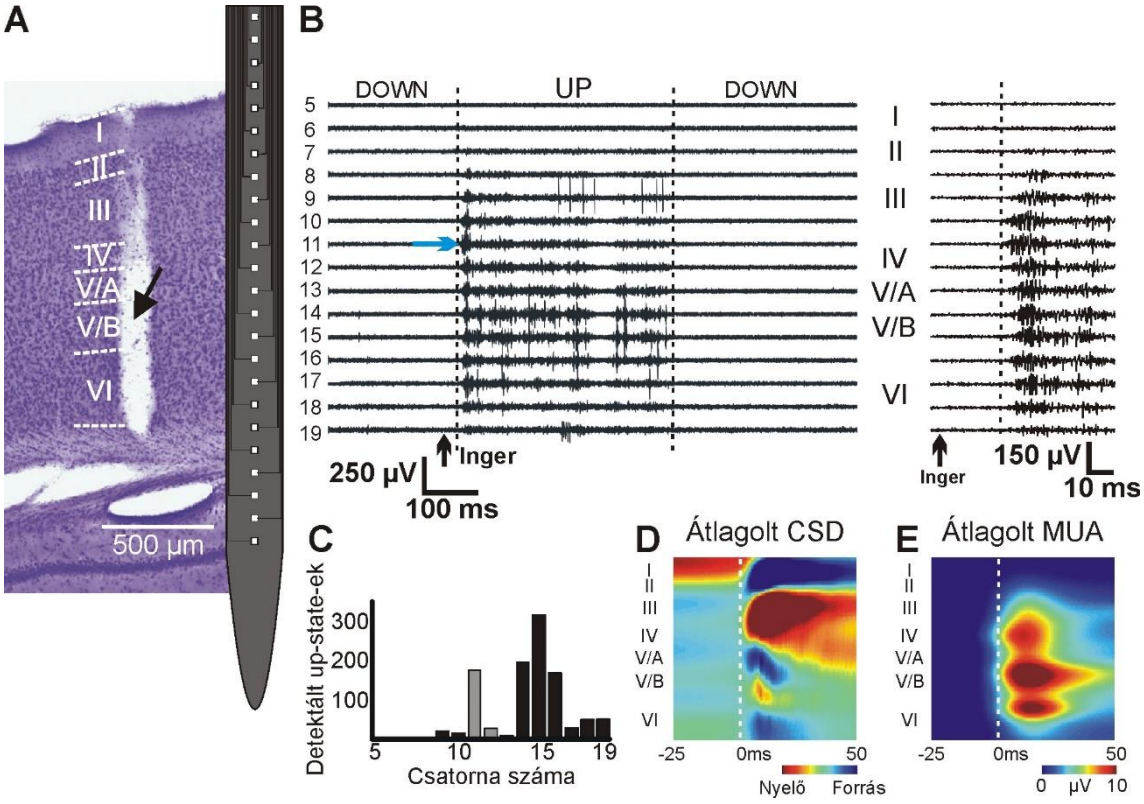
Az esetek többségében a spontán elvezetésekben detektált, IV. rétegből induló up-state-ek száma alacsony volt (36. ábra/C). A 36. ábrán látható példán a IV. rétegből induló up-state (a 11. csatornán detektálva) a terjedése során először elérte a III. réteget, majd az V.-et, legvégül pedig a VI. rétegre terjedt át az aktivitás. A IV. rétegi indulás ellenére a legnagyobb amplitúdójú sejtaktivitás ebben az esetben is az V. rétegben tapasztalható. A legkorábbi áramnyelő a III. réteg alján és a IV. rétegben volt látható, a sejtaktivitás kezdete pedig a IV. rétegbe tehető (36. ábra/D,E).



36. ábra – A IV. kérgi rétegből induló spontán up-state-ek. *(A) Nissl-festett koronális metszet az elektróda nyomával és a rétegek eloszlása a szomatoszenzoros kéregben. Jobb oldalon az elvezetésekhez használt szilícium elektróda sematikus ábrája látható. (B) Soksejt-aktivitás (MUA) egy másodperc hosszú szakasza egy olyan up-state-el, mely során a MUA a IV. rétegből indult, majd a szupragranuláris és infragranuláris rétegek fele terjedt tovább (kék nyilak). A görbe végén egy másik up-state is megfigyelhető, mely azonban már az Vb rétegből indult. Jobb oldalon az up-state eleje látható nagyobb időbeli felbontásban. (C) Az egyes csatornákon elsőként detektált up-state-ek hisztogramja. A IV. rétegből induló up-state-eket szürkével jelöltük (összes detektált up-state:1230). (D) A IV. rétegből induló up-state-ek átlagolt áramforrás-sűrűség profilja. Az up-state-ek 0 ms-nál kezdődtek. (E) A IV. rétegből induló up-state-ek átlagolt soksejt-aktivitás profilja.*

DOI:10.14753/SE.2017.1961

Kimutattuk, hogy patkányok szomatoszenzoros kérgében ketamin-xylazin altatás alatt a IV. és az Vb kérgi rétegben is gyakran indulhat el a sejtaktivitás az aktív fázisok alatt. Mivel a IV. réteg a talamusztól kapja a fő bemenetét, feltételezhetjük, hogy a IV. rétegi up-state-ek alatti sejtaktivitást a talamusz indítja be. Mivel a szomatoszenzoros ingerlés során a taktilis információk szintén a talamuszon keresztül jutnak el a kéregbe, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon vannak-e különbségek a spontán IV. rétegből induló és a szomatoszenzoros stimulálással kiváltott (szintén a IV. rétegben kezdődő) up-state-ek között. Ahogy azt a kiváltott up-state-ek laminális elemzésénél láthattuk, az up-state elejét meghatározó transzmembrán áramok és sejtaktivitás is lényegesebb erősebb a spontán up-state-eknél tapasztalt áramokhoz képest, valószínűleg a lokális neuronpopulációk nagymértékű szinkron aktivitása miatt (31. ábra). A spontán up-state-eknél megfigyelt relatíve lassú, rétegek közötti sejtaktivitás-terjedést a kiváltott up-state-ek esetén egy gyors, szinkron terjedés váltja fel: a sejtaktivitás a II.-VI. rétegekben szinte egyszerre (5 ms-on belül) jelenik meg (37. ábra/B).



37. ábra – Szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott up-state-ek. *Nissl-festett koronális metszet az elektróda nyomával és a rétegek eloszlása a szomatoszenzoros kéregben. Jobb*

oldalon az elvezetésekhez használt szilícium elektróda sematikus ábrája látható. (B) Soksejt-aktivitás (MUA) egy másodperc hosszú szakasza egy olyan kiváltott up-state-el, mely alatt a MUA a IV. rétegből indult, majd gyorsan a szupragranuláris és infragranuláris rétegek fele terjedt tovább (kék nyilak). Jobb oldalon az up-state eleje látható nagyobb időbeli felbontásban. Fekete nyilak mutatják az ingeradás idejét. (C) Az egyes csatornákon elsőként detektált up-state-ek hisztogramja. A IV. rétegből induló up-state-eket szürkével jelöltük (összes detektált up-state:1230; összesen 631 ingert adtunk az elvezetés alatt, amiből 189 váltott ki up-state-et; a detektált, IV. rétegből kiinduló aktív fázisok száma 191 volt). (D) Kiváltott up-state-ek átlagolt áramforrás-sűrűség profilja. Az up-state-ek 0 ms-nál kezdődtek. (E) Kiváltott up-state-ek átlagolt soksejt-aktivitás profilja.

7. MEGBESZÉLÉS

Jelen dolgozatban altatott patkányok szomatoszenzoros agykérgéből elvezetett lassú hullámú aktivitást vizsgáltam lamináris multielektródákkal szélessávon regisztrált jeleket elemezve. Az elektrofiziológiai jeleket alapos szövettani vizsgálatokkal egészítettük ki. Az in vivo kortikális aktivitás rétegelemzése kimutatta, hogy a lassú oszcilláció aktív fázisa alatt erős befelé irányuló áramok figyelhetőek meg a III. és IV. kérgi rétegekben, valamint az V. réteg tetején. Ezt, a feltehetőleg aktív áramnyelőt két áramforrás veszi körül, az egyik az agyfelszínen található az I. rétegben, a másik pedig a VI. rétegben. Előbbi az up-state során végig fennmarad, míg utóbbi csak az aktív fázisok elején látható, az első 50 ms során. A legnagyobb mértékű sejtaktivitást az V. kérgi rétegben detektáltuk, melynek a csúcsértéke röviddel az up-state kezdete után jelentkezett. Az V. réteg alatt és felett elhelyezkedő rétegekben jelentősen alacsonyabb volt a soksejt-aktivitás. A lassú hullámú aktivitás inaktív fázisa (down-state) alatt kialakuló áramok téridőbeli mintázata hasonlít az up-state-eknél látott mélységi profilhoz, azonban az áramok polaritása fordított, vagyis kifelé irányuló áramok találhatóak az agykéreg középső rétegeiben, melyet egy szupragranuláris és egy infragranuláris áramnyelő határol két oldalról. Utóbbi csak a down-state elején látható. A hiperpolarizált, inaktív fázis alatt szinte az összes sejt beszünteti az akciós potenciál generálást, amit az általunk is megfigyelt, hiányzó soksejt-aktivitás is alátámasztott.

Mechanikus szomatoszenzoros ingerléssel nagyszámú up-state-et tudtunk kiváltani. Ezeknek a kiváltott up-state-eknek a spontán up-state-ekkel történő összehasonlítása kimutatta, hogy az ingerekkel kiváltott aktív fázisok kezdeti szakaszán megjelenő transzmembrán áramok, valamint sejtaktivitás eloszlása és intenzitása is jelentős mértékben különbözik a spontán up-state-eknél kapott eredményektől. Előbbi esetben mind az áramok, mind pedig a sejtaktivitás szignifikánsan erősebbnek adódott, továbbá egy, az Va rétegbe tehető áramforrás is megjelent az áramforrás-sűrűség mélységi profilján.

Ezen kívül a soksejt-aktivitás vizsgálata alapján azt találtuk, hogy a szomatoszenzoros kéreg törzsi és hátsó lábi régiójában a spontán up-state-ek alatti sejtaktivitás a legnagyobb valószínűséggel az Vb kérgi rétegből indul el és innen terjed tovább a szupragranuláris és az infragranuláris kérgi rétegek felé. Az V. rétegi up-state-

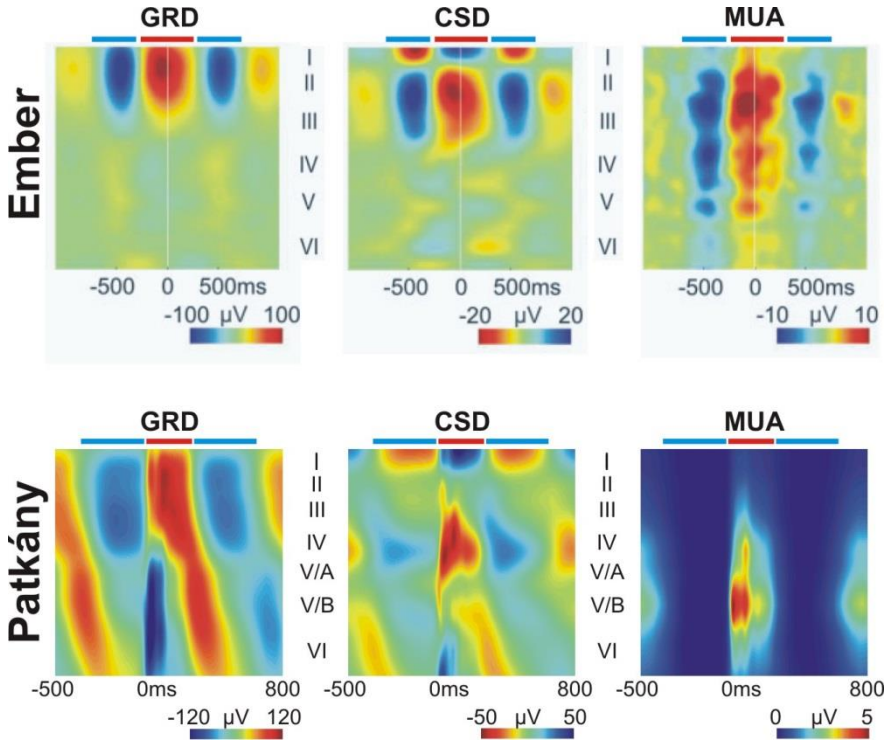
ek mellett megfigyeltünk még nagyszámú, IV. rétegi korai MUA-val jellemezhető up-state-et is. Ezek az aktív fázisok feltehetőleg talamikus hatásra alakulnak ki, mivel a szomatoszenzoros kéregben a IV. réteg kapja a legnagyobb mértékű bemenetet a talamusztól (Fox 2008), továbbá az 1 Hz körüli lassú hullámú aktivitás az utóbbi struktúrából is elvezethető (Steriade és mtsai 1993b). A talamikus eredetet még azok a kísérleti adatok is alátámasztják, melyek azt mutatják, hogy a talamikus sejtek tüzelése megelőzheti az aktív fázis alatt tüzelő kérgi sejtek aktivitását (Contreras és Steriade 1995; Crunelli és Hughes 2010).

Az elektrofiziológiai és hisztológiai adatok együttes vizsgálata nagy fontossággal bír, mivel ezáltal pontosabban meghatározható a lassú hullámok alatt zajló szinaptikus és tüzelési aktivitás térbeli pozíciója. Így pontosabb képet kaphatunk a kettő közötti kapcsolatról is. Korábbi állatkísérletekben, melyek során lineáris multielektródákat alkalmaztak, a lassú hullámok térbeli jellemzőit egyrészt vagy az implantációs mélységhez viszonyították (Steriade és Amzica 1996; Chauvette és mtsai 2010), vagy pedig a beszúrt elektróda nyomát szövettani vizsgálatokkal meghatározták és ez alapján becsülték meg az elektróda elvezető kontaktusainak a pozícióját (Sakata és Harris 2009; Kuki és mtsai 2015). Bármelyik módszer alkalmazása a fentiek közül több okból kifolyólag is pontatlanságokat eredményezhet. Először is, a szövettani módszertől függően az agyszövet összezsugorodhat vagy megduzzadhat a hisztológiai feldolgozás során (Pyapali és mtsai 1998b; Gulyas és mtsai 1999; Tukker és mtsai 2013). Másrészt, az elektróda hegyének helye gyakran nem határozható meg pontosan a szövettani metszeten annak kis mérete miatt. Ez a mérőelektróda agyszövetbeli pozíciójának pontatlan megbecslését vonhatja maga után. A kísérleteink során több módszert is alkalmaztunk annak érdekében (kontaktusokon történő áramadás, elektróda ismételt beszúrása párhuzamosan az eredeti pozícióval), hogy a lehető legpontosabban meghatározhassuk az elektród elvezető kontaktusai és a kéreg rétegei közötti kapcsolati viszonyt.

7.1 A lassú hullámú aktivitás tulajdonságainak összehasonlítása patkányban és emberben

A tanulmány egyik célja az altatott patkányon kapott eredmények összehasonlítása volt a kutatócsoportunk egy másik tanulmánya során kapott eredményekkel (Csercsa és

mtsai 2010). Utóbbi publikáció epilepsziás betegekben vizsgálta a természetes alvás során jelentkező lassú oszcillációt a doktori értekezésben ismertetett módszerekhez hasonló módszerekkel. Mivel az eredményeket hasonló elemzési metodológiával kaptuk, ezért lehetőségünk nyílik közvetlenül is összehasonlítani azokat. Több, jelentős különbséget is felfedezhetünk a humán és a patkány eredmények között, mind a reprezentatív kísérletek mélységi profiljait mutató ábrán (38. ábra), mind pedig a rétegek szerinti, normalizált főátlagokon (39. ábra).

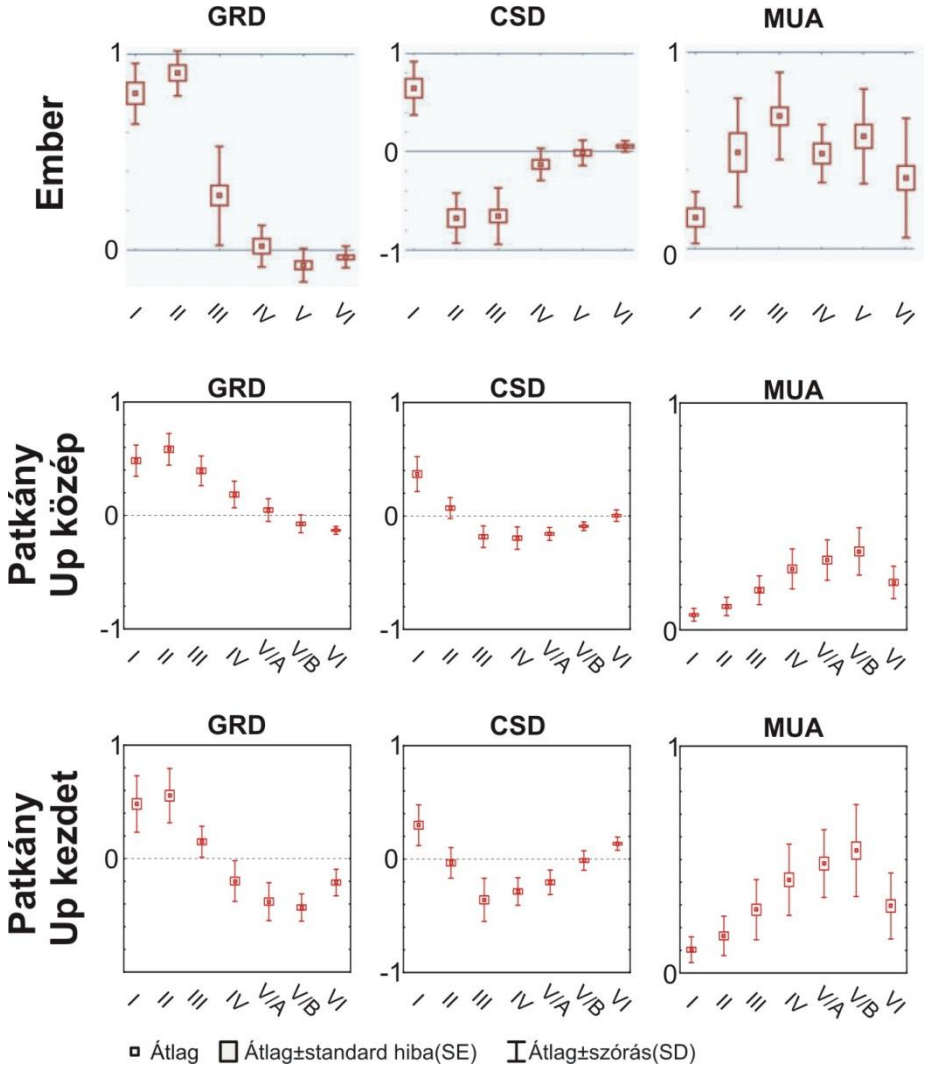


38. ábra – A humánból és patkányból elvezetett lassú oszcilláció up-state-hez kötött mélységi profiljainak összehasonlítása. *Up-state-hez kötött, átlagolt mélységi profiltérképek emberben természetes SWS alatt (felső sor) és patkányban ketamin-xylazin altatásban (alsó sor). Reprezentatív kísérletek. Balról jobbra: lokális mezőpotenciál grádiens (GRD), áramforrás-sűrűség (CSD), soksejt-aktivitás (MUA). x-tengely: idő, y-tengely: kérgi mélység, a megfelelő rétegekkel, z-tengely: a GRD, CSD és MUA-hoz tartozó színkódolt amplitúdó-értékek. A GRD profilok esetén a piros színek a pozitív értékeket, a kék színek pedig a negatív értékeket jelzik. A CSD hőtérképeken az áramnyelőket piros, az áramforrásokat kék szín mutatja. MUA esetén az alacsony aktivitáshoz tartozó értékek kékek, az erős sejtaktivitást pedig piros szín jelzi. A mélységi profilok felett elhelyezkedő vízszintes vonalak a megfelelő lassú oszcillációs fázisokat mutatják (kék – down-state, piros – up-state). A nulla időpont a felső sorban az up-state közepét, az alsó sorban az up-state kezdetét jelzi. A felső sorban látható ábrák Csercsa és munkatársai tanulmányából származnak (Csercsa és mtsai 2010).*

A humán tanulmányban az LFP helyett LFP grádienst rögzítettek, hogy csökkentsék az elektromágneses műtermékek mennyiségét (Ulbert és mtsai 2001;

Csercsa és mtsai 2010), így az LFP-vel nem foglalkozom a továbbiakban. Up-state alatt patkányban és emberben is egy nagy pozitivás figyelhető meg a szupragranuláris rétegekben a lokális mezőpotenciál grádiens mélységi profilján. Ennek a csúcsa mindkét esetben a II. kérgi rétegben helyezkedett el. Míg azonban patkányban az infragranuláris rétegekben a grádienst az up-state elején a negatív amplitúdók dominálják, mely az up-state második felében már pozitív értékeket vesz fel, addig humánban nem látható szignifikáns aktivitás a mély kérgi rétegekben. Az áramforrás-sűrűség mélységi profiljának szupragranuláris szegmense hasonló mintázatot mutatott mindkét vizsgált fajban: egy markáns forrás-nyelő pár található itt, a felső rétegekben. Az áramforrás az I. rétegben helyezkedik el patkányban és emberben egyaránt, azonban az áramnyelő térbeli kiterjedése patkányban nagyobb, az V. réteg felső részében is detektálható, ellentétben a humán CSD-vel, ahol a nyelő csak a IV. kortikális réteg tetejéig terjed. Az infragranuláris rétegekben ismét jelentős különbségeket láthatunk állat és ember között: míg humánban nem folynak erősebb áramok a IV.-VI. rétegekben, addig patkányban ketamin-xylazin narkózisban az up-state elején a szuperficiálisan elhelyezkedő forrás-nyelő párt egy további, VI. rétegi áramforrás egészíti ki. Az up-state közepére a mély áramforrás helyét egy gyenge áramnyelő veszi át, míg a befelé folyó ionáramok sávja lejjebb húzódik az V. réteg alsó részébe. A soksejt-aktivitás mélységi profiljain jól látható, hogy emberben az I. réteg kivételével minden rétegben szignifikáns sejtaktivitás detektálható, mely a középső rétegekben a legerőteljesebb (egy III. rétegi csúccsal és egy V. rétegi lokális maximummal). Patkányban a helyzet jelentősen különbözik: a legnagyobb mértékű sejtaktivitás az V. rétegben regisztrálható, a többi réteg aktivitása a IV. rétegbeli MUA kivételével alacsony.

DOI:10.14753/SE.2017.1961



39. ábra – Az emberből és patkányból elvezetett lassú oszcilláció up-state-hez kötött mélységi profiljaiból számított normalizált főátlagok rétegek szerinti összehasonlítása. *Up-state kezdethez kötött, átlagolt mélységi profiltérképekből számolt normalizált főátlagok doboz-bajusz ábrái emberben természetes SWS alatt (felső sor) és patkányban ketamin-xylazin altatásban (középső és alsó sor). Emberben a főátlagok értékei az up-state csúcsánál/közepénél, patkányban az up-state közepénél (125-175 ms, középső sor), illetve elejénél (25-50 ms, alsó sor) lettek számolva. Balról jobbra: lokális mezőpotenciál grádiens (GRD), áramforrás-sűrűség (CSD), soksejt-aktivitás (MUA). Átlag: kis doboz, átlag±standard hiba (SE): nagy doboz, átlag±szórás (SD): bajusz. A felső sorban látható ábrák Csercsa és munkatársai tanulmányából származnak (Csercsa és mtsai 2010).*

A megfigyelt eltéréseket több különböző faktor együttes hatása alakíthatja ki. Befolyásoló tényező lehet például a különböző vizsgált kérgi területek közötti eltérő citoarchitektúra (szomatoszenzoros kéreg patkányban vs. frontális vagy parietális kérgi területek emberben), a természetes alvás és az altatás közötti különbségek, vagy akár a filogenetikai különbségek is.

Míg az emberben detektált lassú hullámú aktivitás spektrális teljesítményének 1 Hz körüli csúcsa volt (Csercsa és mtsai 2010), addig a ketamin-xylazin narkózis 1-2 Hz közötti csúcsfrekvenciájú lassú oszcillációt eredményezett (15. ábra). Ez azt jelenti, hogy a ketamin-xylazinnal indukált lassú oszcilláció ciklusai rövidebbek a humánban regisztrált lassú hullámú aktivitás fázisaihoz képest. A frekvenciabeli különbség azonban aligha lehetett okozója a megfigyelt különbségeknek, ugyanis a humán tanulmányban a lamináris elemzést elvégezték különböző hosszúságú lassú oszcillációs ciklusokon - többek között a 1-2 Hz-es frekvenciatartománynak megfeleltethető 500-1000 ms hosszú ciklusokon is -, azonban nem találtak szignifikáns eltérést a csoportok között (Csercsa és mtsai 2010). Jelen tanulmányban is vizsgáltuk a különböző hosszúságú up-state-eket, de nem láttunk jelentős különbséget az aktív fázist jellemző áramok és sejtaktivitás eloszlásában a rövid, hosszú és átlagos hosszúságú up-state-ek között (18. ábra, 19. ábra, 24. ábra, 25. ábra).

A lassú oszcilláció indukálásra használt ketamin és xylazin szintén jelentős tényező lehet a két tanulmány között felfedezhető különbségek kialakításában. Számos publikáció született már erről a két anyagokról, ennek ellenére keveset tudunk a talamokortikális oszcillációk genezisében és fenntartásában betöltött szerepükről, valamint kevés irodalmi adat lelhető fel azzal kapcsolatban is, hogy az egyes alvást vagy ébrenlétet szabályzó agyi központokra milyen mértékben hat. A különböző anesztetikumok központi idegrendszerre kifejtett hatásairól azonban már sok mindent kiderítettek (Lydic és Baghdoyan 2005; Franks 2008). Bár az altatás és a természetes alvás között sok a hasonlóság (mint például a tudatvesztés, hasonló EEG mintázatok megjelenése (pl. alvási orsók), nagy amplitúdójú, alacsony frekvenciás háttéraktivitás), azonban jelentős különbségek is felfedezhetők. Az alvó élőlények például külső ingerekkel felébreszthetőek, míg az altatott organizmus külső ingerekre minimálisan reagál, sőt a fájdalomérzetet szállító pályák jelei blokkolva vannak ebben az állapotban (Himmelseher és Durieux 2005; Quibell és mtsai 2011). Az altatás alatt regisztrált EEG jelek pedig általában egy stabil, szinte ismétlődő mintázatot mutatnak ellentétben az alvás alatt detektálható dinamikus, folyton változó elektromos mintázattal. A ’Bevezetés’ fejezetben leírtam, hogy a ketamin több helyen is hat az agyban, azonban az a mechanizmus, mellyel a szabályos lassú oszcillációt kialakítja, még tisztázatlan. Tudjuk, hogy a ketamin blokkolja az NMDA receptorokat, valamint azt is, hogy a különböző receptoroknak jól

meghatározott lamináris eloszlásuk van az agykérgen belül. Az NMDA és AMPA (α-amino-3-hydroxi-5-metil-4-izoxazol-propánsav) receptorok például legnagyobb sűrűségben a II.-III. rétegben találhatóak patkány barrel kortexében (Monaghan és Cotman 1985; Jaarsma és mtsai 1991). Ezek a tulajdonságok is hozzájárulhatnak a ketamin-narkózis és a természetes SWS alatt regisztrált agyi aktivitás közötti különbségekhez.

A humán tanulmányban gyógyszerrezisztens epilepsziás betegekből vezették el az agyi tevékenységet, frontális és parietális agykérgi területekről. Patkány esetén a szomatoszenzoros kéreg törzsi és hátsó lábi régiójából vezettünk el. Bár patkányokban a szomatoszenzoros kéreghez tartozó barrel kéreg a leginkább vizsgált terület, ez túlságosan laterálisan helyezkedik el az agy görbülete mentén, ezért az agyi elektromos jelek erről a területről történő regisztrálása több szempontból is nehézkes. Ezzel ellentétben a törzsi és a hátsó lábi szenzoros área egy könnyen hozzáférhető terület, aminek köszönhetően csökkenthető a műtét ideje, valamint a sérülések, vérzések okozásának valószínűsége a műtét során.

Filogenetikailag is elég jelentősek a különbségek a két faj között. Az emberi agykéreg átlagosan kb. másfélszer vastagabb a patkányok agykérgénél (2.5 mm vs 1.8; (Defelipe 2011)). Tudjuk továbbá azt is, hogy a neuronok száma a fajok között nagyjából ugyanannyi, tehát a sejtek sokkal sűrűbben helyezkednek el a patkányok agyában (Rockel és mtsai 1980; Abeles 1991). Egyes kutatási eredmények arra utalnak, hogy a főemlősökben a II./III. kérgi rétegek sokkal fejlettebbek, mint rágcsálókban (Diamond 1979). Míg utóbbiakban az infragranuláris rétegek teszik ki az agykéreg több mint a felét, addig előbbieknél a III. rétegben jóval több nagy piramissejt helyezkedik el, mint az V. rétegben, ellentétben a patkányokkal, ahol az V. rétegben találhatóak a legnagyobb piramissejtek a szomatoszenzoros kéregben (Diamond 1979). Ezek részben megmagyarázhatják azt, hogy emberben mért találtak szupragranuláris súlyú aktivitást az aktív fázisok alatt, míg patkányokban mért ilyen nagymértékű az V. réteg szerepe. Az agyak bonyolultságában is rendkívül nagy különbségek vannak: míg az emberek kortexe tekervényes szerkezetű, addig a patkányok agykérge lényegében sima felületű.

Természetesen nem zárható ki teljesen annak a lehetősége, hogy a mélységi profilokon megfigyelt különbségek egy része patológiás eredetű. Annak ellenére, hogy Csercsa és munkatársai (2010) nem elemezték azokat a regisztrátumokat, melyek időben

közel helyezkedtek el epilepsziás rohamokhoz, valamint a lassú hullámok vizsgált tulajdonságai is hasonlóak voltak korábbi vizsgálatokban, egészséges kísérleti alanyokban talált eredményekhez (Massimini és mtsai 2004), az epilepsziás idegi hálózatok hozzájárulhattak a regisztrált lassú hullámok kifejeződéséhez. Azonban mind az abnormalitások hiánya az MRI képeken, mind pedig a kimetszett agyszövet ép kérgi rétegzettsége is arra utalnak, hogy az elvezetések szerkezetileg ép területekről származtak (Csercsa és mtsai 2010).

7.2 A lassú hullámú aktivitás rétegelemzése állatmodellekben

Az elmúlt években több kutatócsoport is vizsgálta a spontán lassú oszcilláció alatt kialakuló áramok lamináris eloszlását különböző állatmodellekben, természetes alvás során és altatásban egyaránt. Több hasonlóságot is felfedezhetünk, ha összehasonlítjuk ezen csoportok eredményeit az ebben a dolgozatban kapott eredményekkel. Sakata és Harris például patkányok hallókérgének rétegelemzéses vizsgálata során a legjelentősebb, up-state-hez kötött áramnyelőt a középső kérgi rétegekben detektálta (Sakata és Harris 2009). A természetes alvás alatt és uretán altatásban elvégzett kísérleteik során azonban nem határozták meg pontosan a réteghatárokat, csupán az elvezetés agykérgi mélységét adták meg. A kérgi rétegek és az elvezető kontaktusok közötti pontos térbeli viszony ismeretének hiánya viszont jelentősen megnehezíti az aktív fázisok alatt kialakuló áramok pontos helyének lokalizációját. Az is tovább nehezíti az összehasonlítást az általunk kapott eredményekkel, hogy a tanulmányban az up-state kezdetének csupán az első 50 ms hosszúságú részét vizsgálták az áramforrás-sűrűség analízis módszerével. Vizsgálataik során a spontán kialakuló aktív fázisok elején egy nagyobb kiterjedésű áramnyelőt találtak, mely általában az infragranuláris rétegekből indult, valamint két áramforrást, melyek közül az egyik az agyfelszínhez közel, a másik pedig az agykéreg legmélyebb részén helyezkedett el. Az általuk megfigyelt mintázat tehát nagymértékben hasonlít az általunk talált eredményekhez, legalábbis az up-state kezdetére vonatkozóan.

A hallókéregben spontán módon kialakuló sejtaktivitását elemezve azt találták, hogy az up-state-ek alatt a legkorábbi akciós potenciálok az V. kérgi rétegben detektálhatóak és az aktivitás innen terjed a felső rétegek felé (Sakata és Harris 2009). Kimutatták, hogy az V. rétegre szignifikánsan erősebb sejtaktivitás jellemző, mint a II.-

III. rétegekre, mely ritkább tüzelést mutató neuronokat tartalmaz. Ezek a megfigyelések nagyon hasonlóak a ketamin-xylazinnal altatott patkányok agykérgében látottakhoz, melyeket további tanulmányok is alátámasztanak. Több kutatócsoport is kimutatta, hogy patkányoknál a legnagyobb a tüzelési ráta az V. rétegben és a legritkábban a II.-III. rétegi neuronok tüzelnek (Sanchez-Vives és McCormick 2000; Manns és mtsai 2004; de Kock és mtsai 2007; de Kock és Sakmann 2009; O'Connor és mtsai 2010; Barth és Poulet 2012; Petersen és Crochet 2013). Ennek az aktivitásbeli különbségnek az egyik lehetséges oka, hogy az V. rétegi serkentő neuronok depolarizáltabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkeznek, mint II.-III. rétegi társaik (Lefort és mtsai 2009).

Uretánnal altatott patkányok szomatoszenzoros kortexének hátsó lábi régiójából elvezetett jelek CSD analízise egy erős III. rétegi áramnyelőt mutatott ki az aktív fázisok alatt, melyhez egy gyengébb, és később megjelenő V. rétegi áramnyelő társult (Toth és mtsai 2008). Az áramnyelőkhöz egy I.-II. rétegi és két, VI. rétegi áramforrás tartozott. Down-state alatt az áramok hasonló lamináris eloszlásban helyezkedtek el, viszont ellentétes polaritással (Toth és mtsai 2008).

Ketamin-xylazinnal altatott patkányok motoros agykérgében a CSD elemzés a humán eredményekhez hasonlóan egy markáns forrás-nyelő párt mutatott ki a felső kérgi rétegekben az aktív fázisok alatt, az áramforrással az agyfelszín közelében (Kuki és mtsai 2013). Az up-state elején gyenge, sejtekbe irányuló áramok voltak megfigyelhetőek a középső kérgi rétegekben, valamint egy gyenge áramforrás a kéreg infragranuláris rétegeiben. Hasonlóan az eddigiekhez, down-state alatt a becsült áramok fordított polaritásúak voltak, de lényegében ugyanolyan eloszlásúak, mint az aktív fázisok alatt megfigyeltek. Érdekes eredmény, hogy a kutatók optogenetikai ingerléssel down-state-eket tudtak kiváltani (Kuki és mtsai 2013). A kiváltott inaktív fázisok nagymértékben hasonlítottak a spontán down-state-ekre, viszont egy tranziens negatív LFP csúcs előzte meg őket. Ez a tranziens válasz kontralaterális optikai ingerlés során nem volt látható. Ugyanez a kutatócsoport altatott egerek agykérgében is megvizsgálta a lassú hullámok alatti CSD eloszlást ketamin-xylazinnal (Kuki és mtsai 2015). Hasonló CSD mélységi profilt kaptak egerekben, mint amit a korábban említett tanulmányok patkányokban leírtak és amit mi is megfigyeltünk. Ez arra utal, hogy a lassú hullámú aktivitás alatt hasonló folyamatok zajlanak különböző fajok agykérgében.

Macskákban az altatásban kialakuló lassú hullámok alacsony frekvenciás komponenseinek CSD analízise egy áramnyelőt mutatott ki a suprasylvian gyrus középső rétegeiben az aktív fázis alatt, és egy áramforrást ugyanitt az inaktív fázis alatt (Steriade és Amzica 1996). A legmarkánsabb, up-state-hez köthető áramnyelőt a középső és a mély kérgi rétegekben lokalizálták, melyhez egy felső rétegekben elhelyezkedő és egy mély kérgi áramforrás tartozott. Ezzel ellentétben a gyors (30-40 Hz) komponensek térben sokkal elosztottabbak voltak, és az egész agykérget átérő, egymást váltó ’mikro-áramnyelők’ és ’mikro-áramforrások’ alkották (Steriade és Amzica 1996). Cash és munkatársai szerint a K-komplexek, melyek főként az NREM alvás 2. stádiumában detektálhatóak az agykéregben, izolált inaktív fázisoknak tekinthetőek (Cash és mtsai 2009). Spontán és kiváltott K-komplexek CSD analízise egy erőteljes, up-state-hez kötött áramnyelőt mutatott ki a II.-III. rétegekben, melyhez gyengébb, mély rétegi áramnyelők társultak (Amzica és Steriade 1998). Egy másik tanulmányban, természetesen alvó macskákban azt találták, hogy up-state alatt a maximális áramnyelő a középső és infragranuláris kortikális rétegekben helyezkedett el, melyhez egy szuperficiális áramforrás társult (Chauvette és mtsai 2010). A down-state alatti, fordított polaritással jelentkező mintázatban erősebb áramok voltak megfigyelhetőek, mint up-state alatt, ahol az áramok téridőbeli szerveződése is variábilisabb volt. Megfigyelték, hogy a ’down-up’ átmenetek során a legkorábban körülbelül az V. rétegben alakul át az áramforrás áramnyelővé, mely megfelel a populációs aktivitásban tapasztalt eredményeiknek, miszerint a legkorábbi sejtaktivitás legtöbbször ebben a kérgi rétegben detektálható.

A kísérletek többségében megfigyelt - up-state-ek alatt megjelenő - kiemelkedő III.-IV. rétegi áramnyelőt feltehetőleg aktív, befelé folyó áramok okozzák, melyek az extracelluláris térből főként az V. és VI. rétegi piramissejtek disztális apikális dendritjeibe, valamint a III. rétegi piramissejtek apikális és bazális dendritjeibe folyhatnak. Az áramnyelő mellé társuló I. rétegi passzív, visszatérő áramforrást a piramissejtek agyfelszín közelében található apikális dendritjeiből kifelé folyó áramok hozhatják létre. A mély rétegekben látható áramforrást pedig feltehetőleg az V. rétegi piramissejtek bazális dendritjeiből az extracelluláris térbe történő ionáramlás, valamint a VI. rétegben található neuronok aktivitása alakítja ki. A down-state-ek alatt megfigyelt lamináris árameloszlás mintázatot nagy valószínűséggel hiperpolarizáló áramok, feltehetőleg a piramissejtekből kifolyó kálium áramok hozzák létre (Cash és mtsai 2009).

7.3 Az V. réteg kitüntetett szerepe állatokban a lassú oszcilláció aktív fázisa alatt

A lassú hullámú aktivitás aktív fázisa alatt az agykéreg V. rétegében a legnagyobb mértékű a populációs aktivitás. Több közleményben is leírták, hogy ebben a rétegben kezdenek el legelőször tüzelni a sejtek a legtöbb up-state során (Sanchez-Vives és McCormick 2000; Sakata és Harris 2009; Chauvette és mtsai 2010). Legújabb kutatások is az V. réteg domináns szerepét mutatták a lassú oszcilláció dinamikájának kialakításában (Wester és Contreras 2012; Beltramo és mtsai 2013). A közelmúltban azt is kimutatták, hogy az V. rétegi neuronok már egy kis csoportjának aktivitása is elegendő lehet egy aktív fázis elindításához (Stroh és mtsai 2013). A mi eredményeink is megerősítik a fentieket: a ketamin-xylazin által indukált lassú oszcilláció aktív fázisa során az V. rétegben detektáltuk a legerősebb MUA-t (19. ábra/D) és a spontán kialakuló up-state-ek nagy hányadánál ebből a rétegből indult el a MUA a legkorábban, továbbterjedve a szupragranuláris és infragranuláris rétegek felé (33. ábra, 35. ábra). Lőrincz és munkatársai az V. rétegben található piramissejtek olyan csoportjaira bukkantak, melyeknek fontos szerepe lehet az up-state-ek elindításában és fenntartásában (Lorincz és mtsai 2015). Az eddigi kutatási eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy az V. agykérgi rétegben elhelyezkedő nagy piramissejteknek kitüntetett szerepük van a lassú hullámú aktivitás téridőbeli dinamikájának alakításában.

A ’Bevezetés’ fejezetben már volt arról szó, hogy az V. rétegi piramissejtek belső membránfulajdonságaik és neuronális kapcsolataik révén képesek a többi idegsejt aktivitását befolyásolni (Gutnick és Mody 1995) és egy erősen szinkronizált aktivitási mintázatot kialakítani. Azonban az V. réteg kitüntetett szerepét további kutatási eredmények is alátámasztják. Először is, az V. rétegben találhatóak a neokortex legnagyobb piramissejtjei, melyek apikális dendritfája és bazális dendritjei gyakorlatilag átérik a teljes agykérget, minden rétegből kapva szinapszisokat. Továbbá, in vitro kísérletekben kimutatták, hogy az infragranuláris rétegekben található serkentő sejtek több mint 10 mV-al depolarizáltabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkeznek, mint a II.-III. rétegi piramissejtek (Lefort és mtsai 2009). Az agyszeletekben lévő gátlás lecsökkentésével szinkronizált aktivitás alakulhat ki, mely akár több milliméteren keresztül is terjedhet az agyszeleten (Connors és Amitai 1993). Ez a szinkronizált

aktivitás is V. rétegi indulást mutat (Telfeian és Connors 1998). Ritmikus, szinkron oszcillációk a serkentés növelésével is létrejöhetnek, melyek szintén az V. rétegből erednek (Silva és mtsai 1991).

7.4 A talamusz közreműködése a kérgi lassú oszcillációban

A kísérletsorozatunk során a kérgi SWA alatti populációs aktivitás elemzésével azt találtuk, hogy a lassú oszcilláció spontán aktív fázisai alatti MUA a kéreg bármely rétegéből kiindulhat, azonban legnagyobb valószínűséggel az Vb és IV. kérgi rétegekből indul. Mivel a szomatoszenzoros kéregben a IV. réteg a fő talamorecipiens réteg, ezért jogosan feltételezhetjük, hogy az itt detektált korai MUA valójában a talamokortikális sejtek aktivitásának eredményeképpen jött létre, vagyis ezek az up-state-ek a talamusz közreműködésével indultak el. Nagyszámú, IV. rétegből induló up-state viszont a kísérletek csak egy kis hányadában (kb. ötödében) volt megfigyelhető, a többi esetben az up-state-ek többsége (több mint a fele) V. rétegi indulást mutatott. A kapott eredmények egyik lehetséges magyarázata, hogy az állat légzése során a hasi bőrfelület egy része folyamatosan és ritmikusan ingerlődik, ami aktiválja a talamuszon keresztül a szomatoszenzoros kéreg törzsi régiójában található IV. rétegi neuronokat; tehát ezek a spontán IV. rétegi up-state-ek valójában szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott aktív fázisok. További kísérletekben, a légzésritmus és az agyi elektromos tevékenység egyidejű regisztrálásával, érdemes lenne megvizsgálni ezt a hipotézist.

Egy közelmúltbeli tanulmány kimutatta, hogy a talamokortikális sejtek patkány szomatoszenzoros rendszerében nemcsak a IV. rétegbe vetítenek, hanem az Vb rétegben található neuronokon is szinaptizálnak, vagyis a talamusz az Vb réteget közvetlenül is beidegzi (Constantinople és Bruno 2013). Ez alapján elképzelhető, hogy az Vb rétegből induló up-state-ek egy része is a talamuszból eredhet.

A lassú oszcillációt generáló mechanizmusokra több teória is létezik. Egyes kutatók szerint az SWA tisztán kérgi eredetű (Timofeev 2013), míg mások szerint a talamusz talamokortikális és retikuláris sejtjeinek is jelentős szerepe van a oszcilláció alakításában, szabályozásban (Crunelli és Hughes 2010; Crunelli és mtsai 2015). Utóbbi elmélet szerint több up-state is a talamikus hálózatokban keletkezhet, melyre jó bizonyíték, hogy a talamokortikális sejtek tüzelése az up-state kezdetén sok esetben megelőzheti kérgi neuronok akciós potenciáljait (Contreras és Steriade 1995). A kiváltott up-state-ek

jelensége szintén egy jó példa a talamusz jelentős szerepére, mely a külvilágból érkező ingerrel a IV. rétegen keresztül átlökheti a hiperpolarizált inaktív fázist depolarizált állapotba.

7.5 A kísérlet korlátjai

Fontosnak tartok megemlíteni néhány olyan tényezőt, melyek befolyásolhatják a kapott eredményeket és ezáltal a következtetéseket. Ezek egy része biológiai, más részük metodikai eredetű. Előbbi csoportba tartozik az a megfigyelés, hogy a küszöb alatti membránpotenciál-fluktuációk egyértelműen megelőzik a sejttüzelést az up-state kezdetekor, vagyis a tüzelés inkább következménye, mintsem okozója az up-state iniciációnak (Chauvette és mtsai 2010). Mivel ebben a tanulmányban a lassú oszcilláció fázisait a MUA, vagyis az elektróda közelében található néhány száz vagy ezer neuron akciós potenciáljai alapján detektáltuk, ezért a fenti megállapítás miatt az állapotdetekció bizonyos mértékű hibát eredményezhet a detektált fázisok pontos kezdőidőpontjait tekintve. Azonban mivel a fenti megállapítás minden sejtre és minden rétegre érvényes, valamint az up-state alatti aktív neuronpopuláció elég nagy, ezért a hiba minden rétegben nagyjából ugyanakkora lesz, vagyis feltehetőleg nem fogja torzítani a kapott eredményeket.

Egy másik lehetséges problémaforrás a kiváltott up-state-ek elemzése során merülhet fel. A kiváltott aktív fázisok elején megjelenő erősebb áramokat és sejtaktivitást mutató 50 ms-os szakasz tulajdonképpen a szomatoszenzoros ingerlésre adott válasz, erősen szinkronizált aktivitással. A kiváltott válaszhoz kötött populációs aktivitás a legtöbb esetben a talamusz által erősen beidegzett IV. rétegben jelentkezett először, viszont a nagyfokú szinkronizáltság miatt a sejtaktivitás szinte minden rétegben egyidőben alakul ki az ingerre adott válasz kezdete után. Viszont előfordulhat, hogy ez az erős és szinkron, a kiváltott válaszhoz kötött MUA elfedi azt, hogy a kiváltott up-state valójában melyik rétegben keletkezett, és a detektáló algoritmus hibásan azt ’látja’, hogy a kiváltott események mindig a IV. rétegben keletkeztek.

Az áramforrás-sűrűséget a hagyományos, hárompontos, második térbeli deriváltat számoló módszer alapján becsültük. Bizonyos feltételek mellett azonban ez a hagyományos módszer hibás becsléseket eredményezhet, pl. hamis áramforrásokat vagy áramnyelőket mutathat (Pettersen és mtsai 2006). Egy, a közelmúltban kifejlesztett CSD-

becslő eljárás, az inverz CSD módszer a legtöbb esetben pontosabb eredményeket ad (Pettersen és mtsai 2006) a hagyományos módszernél. Több, up-state kezdethez kötött, átlagolt LFP-re kiszámoltuk a hagyományos CSD becslés mellé az inverz CSD módszerrel becsült változatot is (Marton és mtsai 2015). A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy nem találtunk jelentős eltéréseket a kétféle becslés által eredményezett áramok lamináris eloszlásában, így a hagyományos módszerrel becsült eredményeink helyesnek tekinthetőek. Az inverz CSD egyik nagy előnye, hogy a hagyományos módszerrel ellentétben a becslés során nem veszítjük el a lamináris multielektróda két legszélső kontaktusával regisztrált adatokat, így további hasznos térbeli információra tehetünk szert. Ezen okok miatt a jövőben valószínűleg ezt a módszert fogjuk preferálni az áramok becslésére. A CSD becslés során homogén és izotróp konduktivitás profilt feltételeztünk az agykéregben, azonban ez is okozhat bizonyos mértékű hibát, mivel a rétegek között változhat a vezetőképesség (Goto és mtsai 2010; Bazhenov és mtsai 2011).

A lassú oszcilláció fázisainak kezdőidőpontjait detektáló algoritmusnak szintén van valamekkora hibája. Ennek a küszöbszint megválasztása az oka, amit a down-state amplitúdójának átlaga és szórása alapján számoltunk ki (átlag + 3 * szórás). Ilyen küszöbszint mellett a populációs aktivitás a detektált fáziskezdethez képest már kb. 10 ms-al előbb elkezd nőni, vagyis az up-state valójában néhány ms-al korábban kezdődik az algoritmussal detektált időponthoz képest. Kisebb küszöbszintet választva azonban az algoritmus már gyakran hibásan detektálja a fáziskezdeteket, a down-state alatt néha előforduló kismértékű populációs aktivitás vagy zaj miatt. Azonban hasonlóan a fejezet első bekezdésében említett megfigyeléshez, ez a hiba is minden csatornán kb. ugyanakkora értéket vesz fel, tehát a végső eredményeket nagymértékben nem befolyásolja. A fázisdetekció teljesítménye viszont a gyenge MUA-t tartalmazó csatornákon jelentősen romolhat, ezért az up-state kezdetet detektáló analízisből ki is hagytuk az I. és II. rétegi, valamint a VI. réteg aljából regisztráló csatornákat.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérleteink során kapott eredmények alátámasztják azt a korábbi hipotézist, hogy az ezidáig vizsgált állatmodellekben az V. rétegben található nagy piramissejteknek jelentős szerepe van, mind a ketamin-xylazin által indukált, mind pedig a természetes alvás alatti SWA kialakításában és szabályozásában. Mivel a lassú hullámú alvás alatt létrejövő SWA kulcsszerepet játszik az emléknyomok hosszú távú megszilárdításában, ezért jogosan feltételezhetjük, hogy az V. kérgi rétegben elhelyezkedő neuronok lényeges szerepet töltenek be az információ neokortex és hippokampusz közötti szállításában, illetve az információtovábbításhoz szükséges körülmények megteremtésében. Habár emberben nem figyelték meg az V. réteg dominanciáját természetes alvás során kialakuló SWA alatt, ez nem feltétlenül azt jelenti, hogy ennek rétegnek megváltozott a funkciója a törzsfejlődés során. Anatómiai vizsgálatok azt mutatják, hogy az emberi neokortexben a szupragranuláris rétegek fejlettebbek a vizsgált állatfajok szupragranuláris agykérgi rétegeihez képest, míg az infragranuláris rétegek között kisebbek a különbségek. Ez pedig inkább újabb funkciók és képességek kifejlődésére utal, a régiek megtartása mellett. Tehát az V. réteg neuronjainak és ezek kapcsolatainak részletes tanulmányozása további érdekes felfedezéseket hozhatna.

Az V. kérgi réteg szoros kapcsolatban áll a talamusszal is, vagyis utóbbi agyterület is fontos szerepet játszhat az SWA alatt zajló folyamatokban. Ezt a szerepet több, a közelmúltban megjelent tanulmány, valamint a mi adataink is alátámasztották. Vizsgálataink során több esetben megfigyeltük, hogy az SWA aktív fázisa alatti sejttüzelés a IV. rétegből indul, mely talamikus eredetre utal. Habár a kiváltott aktív fázisok és a spontán módon kialakuló, IV. kérgi rétegből induló aktív fázisok több tulajdonságukban is hasonlóak voltak, a megfigyelt különbségek arra utalhatnak, hogy a spontán IV. rétegi aktív fázisok inkább belső, hálózati folyamatok következményei, mintsem külső ingerek által létrehozott események. Ezt a kérdést például az agykéreg és a talamusz sok pontjáról történő egyidejű elektrofiziológiai elvezetésekkel lehetne részletesebben is megvizsgálni, melyhez - az intenzív fejlesztéseknek köszönhetően - a szükséges sokcsatornás, nagy téri felbontású elektródák hamarosan rendelkezésre fognak állni.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A természetes alvás NREM fázisának 3. stádiumában kialakuló lassú hullámú alvást alacsony (< 1 Hz) frekvenciájú és nagy amplitúdójú szinkronizált lassú hullámok jellemzik. Ez az ún. lassú hullámú aktivitás (slow wave activity, SWA) altatásban is kialakul és a talamokortikális hálózatokban generálódik. Az SWA alatt szinte az összes agykérgi neuron membránpotenciálja egy depolarizált és egy hiperpolarizált állapot között váltakozik. Előbbit aktív fázisnak vagy up-state-nek, utóbbit pedig inaktív fázisnak vagy down-state-nek nevezzük. Eddigi kutatási eredmények alapján az alvás alatti SWA-nak jelentős szerepe lehet az ébrenlét alatt megszerzett emléknyomok konszolidációjában, valamint több, a szervezetet regeneráló folyamatban.

Az agykéreg fontos szerepet játszik az SWA genezisében, azonban, hogy mely kérgi rétegek és milyen arányban vesznek részt ebben folyamatban, még továbbra is intenzív kutatások tárgya. Doktori munkám során ketamin-xylazinnal altatott patkányok szomatoszenzoros kérgéből lineáris multielektródával regisztrált agyi elektromos jeleken vizsgáltam spontán kialakuló és mechanikus szomatoszenzoros ingerléssel kiváltott lassú hullámok agykérgi generátorainak lamináris eloszlását. Az áramforrás-sűrűség analízis markáns, az intracelluláris térbe irányuló áramokat mutatott ki a középső kérgi rétegekben a spontán up-state-ek alatt. A feltehetően aktív áramnyelőhöz egy hosszabb időtartamú, agyfelszíni és egy rövidebb, mély rétegi passzív áramforrás társult. A soksejt-aktivitás elemzése során nagymértékű sejtaktivitást találtunk az V. kérgi rétegben. Az eredményeink azt mutatták, hogy a spontán kialakuló aktív fázisok alatt a sejtaktivitás leggyakrabban a nagy piramissejteket tartalmazó V. rétegben kezdődött, de sok esetben a talamorecipiens IV. rétegből is elindulhatott. A kiváltott és a spontán up-state-ek alatt kialakuló áramok és sejtaktivitás téridőbeli eloszlása hasonló volt, azonban mind az áramok, mind pedig a sejtaktivitás szignifikánsan erősebbnek bizonyult a kiváltott aktív fázisok elején. A kiváltott up-state-ek esetén a legkorábbi sejtaktivitás legnagyobb valószínűséggel a IV. kérgi rétegben volt detektálható.

Az eredményeink arra utalnak, hogy patkányok szomatoszenzoros agykérgében az infragranuláris kérgi rétegek jelentős szerepet játszanak a ketamin-xylazin által indukált SWA kialakításában és fenntartásában, azonban a talamusz felől érkező információk a granuláris rétegen keresztül jelentős hatással lehetnek a hálózat aktuális állapotára.

10. SUMMARY

Stage 3 of the NREM sleep, known as slow-wave sleep, is characterized by low (< 1 Hz) frequency, high amplitude synchronized slow waves called slow wave activity (SWA). SWA is thought to be generated in the thalamocortical network and besides natural sleep it also emerges during certain types of anesthesia. During SWA the membrane potential of almost every cortical neuron alternates between a depolarized and a hyperpolarized state. The former is called active phase or up-state, whereas the latter is known as inactive phase or down-state. On the basis of research so far, SWA has a major role in the consolidation of memory traces acquired during wake periods, in synaptic homeostatic processes and in the restoration of the body.

The neocortex plays a significant role in the genesis of the SWA, but the importance of different cortical layers in this process is still subject of intense research. During my doctoral studies, I investigated the laminar distribution of the cortical generators of spontaneously occurring and evoked slow waves recorded with linear multielectrodes from the primary somatosensory cortex of ketamine-xylazine anesthetized rats. During spontaneously occurring up-states, the current source density analysis showed strong inward currents in the middle layers of the cortex. This presumably active sink was associated with two passive current sources, one with a longer duration and located near the brain surface and another found in the deep cortical layers. Excessive unit activity was found in layer V of the cortex during spontaneously occurring active states. Our results showed, that unit activity started most frequently in this particular layer, but in certain cases we observed a frequent initiation of up-states from the thalamorecipient layer IV. The spatiotemporal distribution of currents and unit activity during spontaneous up-states and up-states evoked with mechanical somatosensory stimulation was similar. However, both the currents and the unit activity were stronger during the beginning of evoked up-states compared to spontaneously occurring up-states. The earliest unit activity during evoked active phases was most likely found in cortical layer IV.

Our results suggest, that infragranular cortical layers play a significant role in the generation and maintenance of the ketamine-xylazine induced slow wave activity in rats. However, incoming thalamic signals may also strongly influence the actual state of network through the granular layer of the cortex.

11. IRODALOMJEGYZÉK

Abeles M. Corticonics: neural circuits of the cerebral cortex. Cambridge University Press, New York, 1991.

Achermann P, Borbely AA. (1997) Low-frequency (< 1 Hz) oscillations in the human sleep electroencephalogram. Neuroscience, 81: 213-222.

Akers RM, Killackey HP. (1978) Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. J Comp Neurol, 181: 513-537.

Alkire MT. (2008a) Loss of effective connectivity during general anesthesia. Int Anesthesiol Clin, 46: 55-73.

Alkire MT. (2008b) Probing the mind: anesthesia and neuroimaging. Clin Pharmacol Ther, 84: 149-152.

Alkire MT, Hudetz AG, Tononi G. (2008) Consciousness and anesthesia. Science, 322: 876-880.

Alloway KD, Mutic JJ, Hoffer ZS, Hoover JE. (2000) Overlapping corticostriatal projections from the rodent vibrissal representations in primary and secondary somatosensory cortex. J Comp Neurol, 428: 51-67.

Amzica F, Steriade M. (1995) Short- and long-range neuronal synchronization of the slow (< 1 Hz) cortical oscillation. J Neurophysiol, 73: 20-38.

Amzica F, Steriade M. (1998) Cellular substrates and laminar profile of sleep K-complex. Neuroscience, 82: 671-686.

Arima J, Kubo C, Ishibashi H, Akaike N. (1998) alpha2-Adrenoceptor-mediated potassium currents in acutely dissociated rat locus coeruleus neurones. J Physiol, 508: 57-66.

Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A. (1992) Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. J Neurophysiol, 68: 1345-1358.

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CCH, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R, G PIN. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci, 9: 557-568.

Aserinsky E, Kleitman N. (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. Science, 118: 273-274.

Aston-Jones G, Bloom FE. (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. J Neurosci, 1: 876-886.

Axmacher N, Elger CE, Fell J. (2008) Ripples in the medial temporal lobe are relevant for human memory consolidation. Brain, 131: 1806-1817.

Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. J Comp Neurol, 513: 532-541.

Barres BA. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron, 60: 430-440.

Barth AL, Poulet JF. (2012) Experimental evidence for sparse firing in the neocortex. Trends Neurosci, 35: 345-355.

Baskerville KA, Chang HT, Herron P. (1993) Topography of Cholinergic Afferents from the Nucleus Basalis of Meynert to Representational Areas of Sensorimotor Cortices in the Rat. J Comp Neurol, 335: 552-562.

Bazhenov M, Lonjers P, Skorheim S, Bedard C, Dstexhe A. (2011) Non-homogeneous extracellular resistivity affects the current-source density profiles of up-down state oscillations. Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences, 369: 3802-3819.

Beltramo R, D'Urso G, Dal Maschio M, Farisello P, Bovetti S, Clovis Y, Lassi G, Tucci V, De Pietri Tonelli D, Fellin T. (2013) Layer-specific excitatory circuits differentially control recurrent network dynamics in the neocortex. Nat Neurosci, 16: 227-234.

Bennett MV, Zukin RS. (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. Neuron, 41: 495-511.

Berendse HW, Groenewegen HJ. (1991) Restricted Cortical Termination Fields of the Midline and Intralaminar Thalamic Nuclei in the Rat. Neuroscience, 42: 73-102.

Berger RJ, Phillips NH. (1995) Energy conservation and sleep. Behav Brain Res, 69: 65-73.

Bergman SA. (1999) Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. Anesth Prog, 46: 10-20.

Blethyn KL, Hughes SW, Toth TI, Cope DW, Crunelli V. (2006) Neuronal basis of the slow (<1 Hz) oscillation in neurons of the nucleus reticularis thalami in vitro. J Neurosci, 26: 2474-2486.

Bódizs R. Alvás, álom, bioritmusok. Medicina Kiadó, Budapest, 2000.

Bodor AL, Katona I, Nyiri G, Mackie K, Ledent C, Hajos N, Freund TF. (2005) Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. J Neurosci, 25: 6845-6856.

Borbely AA. (1982) A two process model of sleep regulation. Hum Neurobiol, 1: 195-204.

Botella-Soler V, Valderrama M, Crepon B, Navarro V, Le Van Quyen M. (2012) Large-scale cortical dynamics of sleep slow waves. PLoS One, 7: e30757.

Boucetta S, Jones BE. (2009) Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. J Neurosci, 29: 4664-4674.

Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1909.

Broughton RJ. Sleep Attack, Naps and Sleepiness in Medical Sleep Disorders. In: Dinges DF, Broughton RJ (szerk.), Sleep and alertness : chronobiological, behavioral, and medical aspects of napping. Raven Press, New York, 1989: 267-298.

Buzsaki G. (1998) Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. J Sleep Res, 7: 17-23.

Carvell GE, Simons DJ. (1987) Thalamic and corticocortical connections of the second somatic sensory area of the mouse. J Comp Neurol, 265: 409-427.

Cash SS, Halgren E, Dehghani N, Rossetti AO, Thesen T, Wang C, Devinsky O, Kuzniecky R, Doyle W, Madsen JR, Bromfield E, Eross L, Halasz P, Karmos G, Csercsa R, Wittner L, Ulbert I. (2009) The human K-complex represents an isolated cortical down-state. Science, 324: 1084-1087.

Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. J Neurosci, 17: 3894-3906.

Cauller LJ, Clancy B, Connors BW. (1998) Backward cortical projections to primary somatosensory cortex in rats extend long horizontal axons in layer I. J Comp Neurol, 390: 297-310.

Chagnac-Amitai Y, Connors BW. (1989a) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. J Neurophysiol, 61: 747-758.

Chagnac-Amitai Y, Connors BW. (1989b) Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. J Neurophysiol, 62: 1149-1162.

Chagnac-Amitai Y, Luhmann HJ, Prince DA. (1990) Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. J Comp Neurol, 296: 598-613.

Chapin JK, Lin C-S. The somatic sensory cortex of the rat. In: Kolb B, Tees RC (szerk.), The Cerebral cortex of the rat. MIT Press, Cambridge, 1990: 341-380.

Chapin JK, Lin CS. (1984) Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. J Comp Neurol, 229: 199-213.

Chauvette S, Crochet S, Volgushev M, Timofeev I. (2011) Properties of slow oscillation during slow-wave sleep and anesthesia in cats. J Neurosci, 31: 14998-15008.

Chauvette S, Volgushev M, Timofeev I. (2010) Origin of active states in local neocortical networks during slow sleep oscillation. Cereb Cortex, 20: 2660-2674.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong YM, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. Cell, 98: 437-451.

Chen JY, Chauvette S, Skorheim S, Timofeev I, Bazhenov M. (2012) Interneuron-mediated inhibition synchronizes neuronal activity during slow oscillation. J Physiol, 590: 3987-4010.

Chen X, Shu S, Bayliss DA. (2009) HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. J Neurosci, 29: 600-609.

Chervin RD, Pierce PA, Connors BW. (1988) Periodicity and directionality in the propagation of epileptiform discharges across neocortex. J Neurophysiol, 60: 1695-1713.

Chrobak JJ, Buzsaki G. (1996) High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. J Neurosci, 16: 3056-3066.

Cirelli C, Tononi G. (2008) Is sleep essential? PLoS Biol, 6: 1605-1611.

Civillico EF, Contreras D. (2012) Spatiotemporal properties of sensory responses in vivo are strongly dependent on network context. Front Syst Neurosci, 6: 25.

Clemens Z, Fabo D, Halasz P. (2005) Overnight verbal memory retention correlates with the number of sleep spindles. Neuroscience, 132: 529-535.

Clemens Z, Molle M, Eross L, Barsi P, Halasz P, Born J. (2007) Temporal coupling of parahippocampal ripples, sleep spindles and slow oscillations in humans. Brain, 130: 2868-2878.

Clemens Z, Molle M, Eross L, Jakus R, Rasonyi G, Halasz P, Born J. (2011) Fine-tuned coupling between human parahippocampal ripples and sleep spindles. Eur J Neurosci, 33: 511-520.

Colrain IM. (2005) The K-complex: A 7-decade history. Sleep, 28: 255-273.

Connors BW. (1984) Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. Nature, 310: 685-687.

Connors BW, Amitai Y. Generation of epileptiform discharge of local circuits of neocortex. In: Schwartzkroin PA (szerk.), Epilepsy : models, mechanisms, and concepts. Cambridge University Press, New York, 1993: 388-423.

Connors BW, Gutnick MJ. (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. Trends Neurosci, 13: 99-104.

Connors BW, Gutnick MJ, Prince DA. (1982) Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. J Neurophysiol, 48: 1302-1320.

Constantinople CM, Bruno RM. (2013) Deep Cortical Layers Are Activated Directly by Thalamus. Science, 340: 1591-1594.

Contreras D, Steriade M. (1995) Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. J Neurosci, 15: 604-622.

Contreras D, Timofeev I, Steriade M. (1996) Mechanisms of long-lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks. J Physiol, 494 (Pt 1): 251-264.

Crunelli V, David F, Lorincz ML, Hughes SW. (2015) The thalamocortical network as a single slow wave-generating unit. Curr Opin Neurobiol, 31: 72-80.

Crunelli V, Hughes SW. (2010) The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. Nat Neurosci, 13: 9-17.

Crunelli V, Lorincz ML, Errington AC, Hughes SW. (2012) Activity of cortical and thalamic neurons during the slow (<1 Hz) rhythm in the mouse in vivo. Pflugers Arch, 463: 73-88.

Cunningham MO, Pervouchine DD, Racca C, Kopell NJ, Davies CH, Jones RS, Traub RD, Whittington MA. (2006) Neuronal metabolism governs cortical network response state. Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 5597-5601.

Csercsa R, Dombovari B, Fabo D, Wittner L, Eross L, Entz L, Solyom A, Rasonyi G, Szucs A, Kelemen A, Jakus R, Juhos V, Grand L, Magony A, Halasz P, Freund TF, Magloczky Z, Cash SS, Papp L, Karmos G, Halgren E, Ulbert I. (2010) Laminar analysis of slow wave activity in humans. Brain, 133: 2814-2829.

Datta S, Siwek DF. (1997) Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. J Neurophysiol, 77: 2975-2988.

David F, Schmiedt JT, Taylor HL, Orban G, Di Giovanni G, Uebele VN, Renger JJ, Lambert RC, Leresche N, Crunelli V. (2013) Essential Thalamic Contribution to Slow Waves of Natural Sleep. J Neurosci, 33: 19599-19610.

De Gennaro L, Ferrara M. (2003) Sleep spindles: an overview. Sleep Med Rev, 7: 423-440.

de Kock CP, Bruno RM, Spors H, Sakmann B. (2007) Layer- and cell-type-specific suprathreshold stimulus representation in rat primary somatosensory cortex. J Physiol, 581: 139-154.

de Kock CP, Sakmann B. (2009) Spiking in primary somatosensory cortex during natural whisking in awake head-restrained rats is cell-type specific. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 16446-16450.

Defelipe J. (2011) The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. Front Neuroanat, 5: 29.

Delorme A, Makeig S. (2004) EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. J Neurosci Methods, 134: 9-21.

Dement W. (1958) The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 10: 291-296.

Desbois C, Villanueva L. (2001) The organization of lateral ventromedial thalamic connections in the rat: a link for the distribution of nociceptive signals to widespread cortical regions. Neuroscience, 102: 885-898.

Deschenes M, Veinante P, Zhang ZW. (1998) The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. Brain Res Rev, 28: 286-308.

Destexhe A, Contreras D, Steriade M. (1999) Spatiotemporal analysis of local field potentials and unit discharges in cat cerebral cortex during natural wake and sleep states. J Neurosci, 19: 4595-4608.

Destexhe A, Hughes SW, Rudolph M, Crunelli V. (2007) Are corticothalamic 'up' states fragments of wakefulness? Trends Neurosci, 30: 334-342.

Destexhe A, Rudolph M, Pare D. (2003) The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. Nat Rev Neurosci, 4: 739-751.

Devilbiss DM, Waterhouse BD. (2000) Norepinephrine exhibits two distinct profiles of action on sensory cortical neuron responses to excitatory synaptic stimuli. Synapse, 37: 273-282.

Diamond IT. The subdivisions of neocortex: A proposal to revise the traditional view of sensory, motor and association areas. In: Sprague JM, Epstein AN (szerk.), Progress in Psychobiology and Physiological Psychology. Academic Press, New York, 1979: 1-43.

Diamond ME, Armstrong-James M, Budway MJ, Ebner FF. (1992a) Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral

posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus: dependence on the barrel field cortex. J Comp Neurol, 319: 66-84.

Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF. (1992b) Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus. J Comp Neurol, 318: 462-476.

Dickson CT. (2010) Ups and downs in the hippocampus: the influence of oscillatory sleep states on "neuroplasticity" at different time scales. Behav Brain Res, 214: 35-41.

Diekelmann S, Born J. (2010) The memory function of sleep. Nat Rev Neurosci, 11: 114-126.

Donoghue JP, Kerman KL, Ebner FF. (1979) Evidence for two organizational plans within the somatic sensory-motor cortex of the rat. J Comp Neurol, 183: 647-663.

Donoghue JP, Wise SP. (1982) The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. J Comp Neurol, 212: 76-88.

Drew GM, Gower AJ, Marriott AS. (1979) Alpha 2-adrenoceptors mediate clonidine-induced sedation in the rat. Br J Pharmacol, 67: 133-141.

Ebrahimi-Gaillard A, Roger M. (1993) [The corticorubral projection in rats: topographic distribution of fibers arising from areas of the sensorimotor cortex functionally identified by microstimulation]. C R Acad Sci III, 316: 502-507.

Economo C. (1929) Schlaftheorie. Ergebn Physiol, 28: 312-339.

Economo C, Koskinas GN. Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. J. Springer, Wien und Berlin, 1925.

Economo C, Triarhou LC. Cellular structure of the human cerebral cortex. Karger, Basel, 2009.

Eggermann E, Feldmeyer D. (2009) Cholinergic filtering in the recurrent excitatory microcircuit of cortical layer 4. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 11753-11758.

Ego-Stengel V, Wilson MA. (2010) Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. Hippocampus, 20: 1-10.

Emmers R. Somesthetic system of the rat. Raven Press, New York, 1988.

Eschenko O, Magri C, Panzeri S, Sara SJ. (2012) Noradrenergic neurons of the locus coeruleus are phase locked to cortical up-down states during sleep. Cereb Cortex, 22: 426-435.

Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. (1989) Sleep-Deprivation in the Rat .3. Total Sleep-Deprivation. Sleep, 12: 13-21.

Fabri M, Burton H. (1991a) Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats. J Comp Neurol, 311: 405-424.

Fabri M, Burton H. (1991b) Topography of Connections between Primary Somatosensory Cortex and Posterior Complex in Rat - a Multiple Fluorescent Tracer Study. Brain Res, 538: 351-357.

Fanselow EE, Connors BW. (2010) The roles of somatostatin-expressing (GIN) and fast-spiking inhibitory interneurons in UP-DOWN states of mouse neocortex. J Neurophysiol, 104: 596-606.

Favero M, Castro-Alamancos MA. (2013) Synaptic cooperativity regulates persistent network activity in neocortex. J Neurosci, 33: 3151-3163.

Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M, Moss SJ, Haydon PG. (2009) Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 15037-15042.

Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, Petersen CC. (2007) Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. Neuron, 56: 907-923.

Fox K. Barrel cortex. Cambridge University Press, New York, 2008.

Frank MG, Benington JH. (2006) The role of sleep in memory consolidation and brain plasticity: dream or reality? Neuroscientist, 12: 477-488.

Franks NP. (2006) Molecular targets underlying general anaesthesia. Br J Pharmacol, 147 Suppl 1: S72-81.

Franks NP. (2008) General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. Nat Rev Neurosci, 9: 370-386.

Freeman JA, Nicholson C. (1975) Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. J Neurophysiol, 38: 369-382.

Fucke T, Suchanek D, Nawrot MP, Seamari Y, Heck DH, Aertsen A, Boucsein C. (2011) Stereotypical spatiotemporal activity patterns during slow-wave activity in the neocortex. J Neurophysiol, 106: 3035-3044.

Fujikawa DG. (1995) Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. Epilepsia, 36: 186-195.

Gais S, Molle M, Helms K, Born J. (2002) Learning-dependent increases in sleep spindle density. J Neurosci, 22: 6830-6834.

Gao L, Meng X, Ye C, Zhang H, Liu C, Dan Y, Poo MM, He J, Zhang X. (2009) Entrainment of slow oscillations of auditory thalamic neurons by repetitive sound stimuli. J Neurosci, 29: 6013-6021.

Gibbs FA, Gibbs EL. Atlas of electroencephalography. Addison-Wesley Press, Cambridge, 1950.

Gilbert CD, Wiesel TN. (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. Nature, 280: 120-125.

Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsaki G, Zugaro MB. (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. Nat Neurosci, 12: 1222-1223.

Goto T, Hatanaka R, Ogawa T, Sumiyoshi A, Riera J, Kawashima R. (2010) An evaluation of the conductivity profile in the somatosensory barrel cortex of Wistar rats. J Neurophysiol, 104: 3388-3412.

Gottesmann C. (2001) The golden age of rapid eye movement sleep discoveries. 1. Lucretius--1964. Prog Neurobiol, 65: 211-287.

Grand L, Pongrácz A, Vázsonyi É, Márton G, Gubán D, Fiáth R, Kerekes BP, Karmos G, Ulbert I, Battistig G. (2011) A novel multisite silicon probe for high quality laminar neural recordings. Sensors and Actuators A: Physical, 166: 14-21.

Gulevich G, Dement W, Johnson L. (1966) Psychiatric and EEG observations on a case of prolonged (264 hours) wakefulness. Arch Gen Psychiatry, 15: 29-35.

Gulyas AI, Megias 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.

Gupta A, Wang Y, Markram H. (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. Science, 287: 273-278.

Gutnick MJ, Connors BW, Prince DA. (1982) Mechanisms of neocortical epileptogenesis in vitro. J Neurophysiol, 48: 1321-1335.

Gutnick MJ, Mody I. The cortical neuron. Oxford University Press, New York, 1995.

Hahn TT, Sakmann B, Mehta MR. (2006) Phase-locking of hippocampal interneurons' membrane potential to neocortical up-down states. Nat Neurosci, 9: 1359-1361.

Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA. (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. J Neurosci, 26: 4535-4545.

Halasz P. (1998) Hierarchy of micro-arousals and the microstructure of sleep. Neurophysiol Clin, 28: 461-475.

Halasz P. (2005) K-complex, a reactive EEG graphoelement of NREM sleep: an old chap in a new garment. Sleep Med Rev, 9: 391-412.

Hall RD, Lindholm EP. (1974) Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. Brain Res, 66: 23-38.

Hangya B, Tihanyi BT, Entz L, Fabo D, Eross L, Wittner L, Jakus R, Varga V, Freund TF, Ulbert I. (2011) Complex propagation patterns characterize human cortical activity during slow-wave sleep. J Neurosci, 31: 8770-8779.

Hanlon EC, Vyazovskiy VV, Faraguna U, Tononi G, Cirelli C. (2011) Synaptic potentiation and sleep need: clues from molecular and electrophysiological studies. Curr Top Med Chem, 11: 2472-2482.

Harrison NL, Simmonds MA. (1985) Quantitative studies on some antagonists of N-methyl D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. Br J Pharmacol, 84: 381-391.

Hasenstaub A, Sachdev RN, McCormick DA. (2007) State changes rapidly modulate cortical neuronal responsiveness. J Neurosci, 27: 9607-9622.

Hassani OK, Henny P, Lee MG, Jones BE. (2010) GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. Eur J Neurosci, 32: 448-457.

Hassani OK, Lee MG, Jones BE. (2009) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 2418-2422.

He J. (2003) Slow oscillation in non-lemniscal auditory thalamus. J Neurosci, 23: 8281-8290.

Hedler L, Stamm G, Weitzell R, Starke K. (1981) Functional characterization of central alpha-adrenoceptors by yohimbine diastereomers. Eur J Pharmacol, 70: 43-52.

Herkenham M. (1980) Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. Science, 207: 532-535.

Hevers W, Hadley SH, Luddens H, Amin J. (2008) Ketamine, but not phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA(A) receptors containing alpha6 and delta subunits. J Neurosci, 28: 5383-5393.

Hill S, Tononi G. (2005) Modeling sleep and wakefulness in the thalamocortical system. J Neurophysiol, 93: 1671-1698.

Himmelseher S, Durieux ME. (2005) Ketamine for perioperative pain management. Anesthesiology, 102: 211-220.

Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. Science, 189: 55-58.

Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Ferrarelli F, Riedner BA, Peterson MJ, Tononi G. (2006) Arm immobilization causes cortical plastic changes and locally decreases sleep slow wave activity. Nat Neurosci, 9: 1169-1176.

Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G. (2004) Local sleep and learning. Nature, 430: 78-81.

Hughes SW, Cope DW, Blethyn KL, Crunelli V. (2002) Cellular mechanisms of the slow (< 1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. Neuron, 33: 947-958.

Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson AL, Quan SF. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications. American Academy of Sleep Medicine, Westchester, 2007.

Inoue S, Honda K, Komoda Y. (1995) Sleep as neuronal detoxification and restitution. Behav Brain Res, 69: 91-96.

Jaarsma D, Sebens JB, Korf J. (1991) Localization of NMDA and AMPA receptors in rat barrel field. Neurosci Lett, 133: 233-236.

Jacobson S, Marcus EM. Neuroanatomy for the neuroscientist. Springer, New York, 2008.

Ji D, Wilson MA. (2007) Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. Nat Neurosci, 10: 100-107.

Jones BE. (2008) Modulation of cortical activation and behavioral arousal by cholinergic and orexinergic systems. Ann N Y Acad Sci, 1129: 26-34.

Jones EG. The thalamus. Cambridge University Press, New York, 2007.

Jouvet M. (2004) How sleep was dissociated into two states: telencephalic and rhombencephalic sleep? Arch Ital Biol, 142: 317-326.

Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C. (1994) Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. J Comp Neurol, 339: 459-474.

Kattler H, Dijk DJ, Borbely AA. (1994) Effect of Unilateral Somatosensory Stimulation Prior to Sleep on the Sleep Eeg in Humans. J Sleep Res, 3: 159-164.

Kavanau JL. (1997) Memory, sleep and the evolution of mechanisms of synaptic efficacy maintenance. Neuroscience, 79: 7-44.

Kharazia VN, Weinberg RJ. (1994) Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. J Neurosci, 14: 6021-6032.

Killackey HP, Sherman SM. (2003) Corticothalamic projections from the rat primary somatosensory cortex. J Neurosci, 23: 7381-7384.

Kim U, Ebner FF. (1999) Barrels and septa: separate circuits in rat barrels field cortex. J Comp Neurol, 408: 489-505.

Kirifides ML, Simpson KL, Lin RCS, Waterhouse BD. (2001) Topographic organization and neurochemical identity of dorsal raphe neurons that project to the trigeminal somatosensory pathway in the rat. J Comp Neurol, 435: 325-340.

Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. (2007) The metabolic consequences of sleep deprivation. Sleep Med Rev, 11: 163-178.

Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP. (1988) Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. Brain Res, 463: 346-351.

Koralek KA, Olavarria J, Killackey HP. (1990) Areal and laminar organization of corticocortical projections in the rat somatosensory cortex. J Comp Neurol, 299: 133-150.

Krueger JM, Rector DM, Roy S, Van Dongen HP, Belenky G, Panksepp J. (2008) Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. Nat Rev Neurosci, 9: 910-919.

Kuki T, Fujihara K, Miwa H, Tamamaki N, Yanagawa Y, Mushiake H. (2015) Contribution of parvalbumin and somatostatin-expressing GABAergic neurons to slow oscillations and the balance in beta-gamma oscillations across cortical layers. Frontiers in neural circuits, 9: 6.

Kuki T, Ohshiro T, Ito S, Ji ZG, Fukazawa Y, Matsuzaka Y, Yawo H, Mushiake H. (2013) Frequency-dependent entrainment of neocortical slow oscillation to repeated optogenetic stimulation in the anesthetized rat. Neurosci Res, 75: 35-45.

Land PW, Buffer SA, Jr., Yaskosky JD. (1995) Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. J Comp Neurol, 355: 573-588.

Lange T, Dimitrov S, Born J. (2010) Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. Ann N Y Acad Sci, 1193: 48-59.

Leergaard TB, Alloway KD, Mutic JJ, Bjaalie JG. (2000a) Three-dimensional topography of corticopontine projections from rat barrel cortex: correlations with corticostriatal organization. J Neurosci, 20: 8474-8484.

Leergaard TB, Lyngstad KA, Thompson JH, Taeymans S, Vos BP, De Schutter E, Bower JM, Bjaalie JG. (2000b) Rat somatosensory cerebropontocerebellar pathways: spatial relationships of the somatotopic map of the primary somatosensory cortex are preserved in a three-dimensional clustered pontine map. J Comp Neurol, 422: 246-266.

Lefort S, Tomm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC. (2009) The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. Neuron, 61: 301-316.

Li CYT, Poo MM, Dan Y. (2009) Burst Spiking of a Single Cortical Neuron Modifies Global Brain State. Science, 324: 643-646.

Lin RCS, Nicolelis MAL, Chapin JK. (1997) Topographic and laminar organizations of the incertocortical pathway in rats. Neuroscience, 81: 641-651.

Liu J, Ji XQ, Zhu XZ. (2006) Comparison of psychic emergence reactions after (+/-)-ketamine and (+)-ketamine in mice. Life Sci, 78: 1839-1844.

Lorente de No R. Cerebral cortex: Architecture, intracortical connections, motor projections In: Fulton JF (szerk.), Physiology of the Nervous System. Oxford University Press, 1949: 268-312.

Lorincz ML, Gunner D, Bao Y, Connelly WM, Isaac JT, Hughes SW, Crunelli V. (2015) A Distinct Class of Slow (approximately 0.2-2 Hz) Intrinsically Bursting Layer 5 Pyramidal Neurons Determines UP/DOWN State Dynamics in the Neocortex. J Neurosci, 35: 5442-5458.

Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. Nature, 441: 589-594.

Lu SM, Lin RCS. (1993) Thalamic Afferents of the Rat Barrel Cortex - a Light-Microscopic and Electron-Microscopic Study Using Phaseolus-Vulgaris Leukoagglutinin as an Anterograde Tracer. Somatosens Mot Res, 10: 1-16.

Lubke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D. (2000) Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. J Neurosci, 20: 5300-5311.

Luczak A, Bartho P, Marguet SL, Buzsaki G, Harris KD. (2007) Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 347-352.

Lydic R, Baghdoyan HA. (2002) Ketamine and MK-801 decrease acetylcholine release in the pontine reticular formation, slow breathing, and disrupt sleep. Sleep, 25: 617-622.

Lydic R, Baghdoyan HA. (2005) Sleep, anesthesiology, and the neurobiology of arousal state control. Anesthesiology, 103: 1268-1295.

Lydic R, McCarley RW, Hobson JA. (1987) Serotonin neurons and sleep. I. Long term recordings of dorsal raphe discharge frequency and PGO waves. Arch Ital Biol, 125: 317-343.

Maccaferri G, Lacaille JC. (2003) Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. Trends Neurosci, 26: 564-571.

MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, Schneiderman JH, Pennefather PS. (1991) Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. J Physiol, 432: 483-508.

MacLean JN, Watson BO, Aaron GB, Yuste R. (2005) Internal dynamics determine the cortical response to thalamic stimulation. Neuron, 48: 811-823.

Mallick BN, Kaur S, Saxena RN. (2001) Interactions between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the locus coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. Neuroscience, 104: 467-485.

Mann EO, Kohl MM, Paulsen O. (2009) Distinct roles of GABA(A) and GABA(B) receptors in balancing and terminating persistent cortical activity. J Neurosci, 29: 7513-7518.

Manns ID, Sakmann B, Brecht M. (2004) Sub- and suprathreshold receptive field properties of pyramidal neurones in layers 5A and 5B of rat somatosensory barrel cortex. J Physiol, 556: 601-622.

Maquet P. (2001) The role of sleep in learning and memory. Science, 294: 1048-1052.

Marin-Padilla M. (1967) Number and distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells in man. J Comp Neurol, 131: 475-490.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci, 5: 793-807.

Marshall L, Helgadottir H, Molle M, Born J. (2006) Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. Nature, 444: 610-613.

Marshall L, Kirov R, Brade J, Molle M, Born J. (2011) Transcranial electrical currents to probe EEG brain rhythms and memory consolidation during sleep in humans. PLoS One, 6: e16905.

Marton G, Orban G, Kiss M, Fiath R, Pongracz A, Ulbert I. (2015) A Multimodal, SU-8 - Platinum - Polyimide Microelectrode Array for Chronic In Vivo Neurophysiology. PLoS One, 10: e0145307.

Mashour GA. (2006) Integrating the science of consciousness and anesthesia. Anesth Analg, 103: 975-982.

Massimini M, Ferrarelli F, Esser SK, Riedner BA, Huber R, Murphy M, Peterson MJ, Tononi G. (2007) Triggering sleep slow waves by transcranial magnetic stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 8496-8501.

Massimini M, Huber R, Ferrarelli F, Hill S, Tononi G. (2004) The sleep slow oscillation as a traveling wave. J Neurosci, 24: 6862-6870.

Mercier BE, Legg CR, Glickstein M. (1990) Basal ganglia and cerebellum receive different somatosensory information in rats. Proc Natl Acad Sci U S A, 87: 4388-4392.

Metherate R, Ashe JH. (1993) Ionic flux contributions to neocortical slow waves and nucleus basalis-mediated activation: whole-cell recordings in vivo. J Neurosci, 13: 5312-5323.

Miletic V, Coffield JA. (1989) Responses of neurons in the rat nucleus submedius to noxious and innocuous mechanical cutaneous stimulation. Somatosens Mot Res, 6: 567-587.

Mitzdorf U. (1985) Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. Physiol Rev, 65: 37-100.

Mohajerani MH, Chan AW, Mohsenvand M, Ledue J, Liu R, McVea DA, Boyd JD, Wang YT, Reimers M, Murphy TH. (2013) Spontaneous cortical activity alternates between motifs defined by regional axonal projections. Nat Neurosci, 16: 1426-1435.

Mohajerani MH, McVea DA, Fingas M, Murphy TH. (2010) Mirrored bilateral slow-wave cortical activity within local circuits revealed by fast bihemispheric voltage-sensitive dye imaging in anesthetized and awake mice. J Neurosci, 30: 3745-3751.

Molle M, Bergmann TO, Marshall L, Born J. (2011) Fast and slow spindles during the sleep slow oscillation: disparate coalescence and engagement in memory processing. Sleep, 34: 1411-1421.

Molle M, Eschenko O, Gais S, Sara SJ, Born J. (2009) The influence of learning on sleep slow oscillations and associated spindles and ripples in humans and rats. Eur J Neurosci, 29: 1071-1081.

Molle M, Yeshenko O, Marshall L, Sara SJ, Born J. (2006) Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. J Neurophysiol, 96: 62-70.

Monaghan DT, Cotman CW. (1985) Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. J Neurosci, 5: 2909-2919.

Monconduit L, Bourgeais L, Bernard JF, Le Bars D, Villanueva L. (1999) Ventromedial thalamic neurons convey nociceptive signals from the whole body surface to the dorsolateral neocortex. J Neurosci, 19: 9063-9072.

Morgan CJ, Curran HV, Independent Scientific Committee on D. (2012) Ketamine use: a review. Addiction, 107: 27-38.

Moroni F, Nobili L, De Carli F, Massimini M, Francione S, Marzano C, Proserpio P, Cipolli C, De Gennaro L, Ferrara M. (2012) Slow EEG rhythms and inter-hemispheric synchronization across sleep and wakefulness in the human hippocampus. Neuroimage, 60: 497-504.

Moruzzi G, Magoun HW. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1: 455-473.

Mountcastle VB. (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. J Neurophysiol, 20: 408-434.

Mountcastle VB. (1997) The columnar organization of the neocortex. Brain, 120 (Pt 4): 701-722.

Mukhametov LM, Supin AY, Polyakova IG. (1977) Interhemispheric asymmetry of the electroencephalographic sleep patterns in dolphins. Brain Res, 134: 581-584.

Mukovski M, Chauvette S, Timofeev I, Volgushev M. (2007) Detection of active and silent states in neocortical neurons from the field potential signal during slow-wave sleep. Cereb Cortex, 17: 400-414.

Murphy M, Huber R, Esser S, Riedner BA, Massimini M, Ferrarelli F, Ghilardi MF, Tononi G. (2011) The cortical topography of local sleep. Curr Top Med Chem, 11: 2438-2446.

Murphy M, Riedner BA, Huber R, Massimini M, Ferrarelli F, Tononi G. (2009) Source modeling sleep slow waves. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 1608-1613.

Narita M, Yoshizawa K, Aoki K, Takagi M, Miyatake M, Suzuki T. (2001) A putative sigma1 receptor antagonist NE-100 attenuates the discriminative stimulus effects of ketamine in rats. Addict Biol, 6: 373-376.

Neske GT, Patrick SL, Connors BW. (2015) Contributions of diverse excitatory and inhibitory neurons to recurrent network activity in cerebral cortex. J Neurosci, 35: 1089-1105.

Newman SM, Paletz EM, Rattenborg NC, Obermeyer WH, Benca RM. (2008) Sleep deprivation in the pigeon using the Disk-Over-Water method. Physiol Behav, 93: 50-58.

Ngo HV, Claussen JC, Born J, Molle M. (2013) Induction of slow oscillations by rhythmic acoustic stimulation. J Sleep Res, 22: 22-31.

Nicholas AP, Pieribone V, Hokfelt T. (1993) Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. J Comp Neurol, 328: 575-594.

Nicholson C, Freeman JA. (1975) Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. J Neurophysiol, 38: 356-368.

Nieuwenhuys R, Donkelaar HJt, Nicholson C. The central nervous system of vertebrates. Springer, Berlin, 1998.

Nir Y, Staba RJ, Andrillon T, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Fried I, Tononi G. (2011) Regional slow waves and spindles in human sleep. Neuron, 70: 153-169.

Nishiike S, Guldin WO, Baurle J. (2000) Corticofugal connections between the cerebral cortex and the vestibular nuclei in the rat. J Comp Neurol, 420: 363-372.

Nishimura Y, Kitagawa H, Saitoh K, Asahi M, Itoh K, Yoshioka K, Asahara T, Tanaka T, Yamamoto T. (1996) The burst firing in the layer III and V pyramidal neurons of the cat sensorimotor cortex in vitro. Brain Res, 727: 212-216.

Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. Lancet, 355: 39-40.

Nitz D, Siegel JM. (1997) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. Neuroscience, 78: 795-801.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature, 307: 462-465.

Nunez A, Amzica F, Steriade M. (1993) Electrophysiology of cat association cortical cells in vivo: intrinsic properties and synaptic responses. J Neurophysiol, 70: 418-430.

O'Connor DH, Peron SP, Huber D, Svoboda K. (2010) Neural activity in barrel cortex underlying vibrissa-based object localization in mice. Neuron, 67: 1048-1061.

Ohno K, Sakurai T. (2008) Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. Front Neuroendocrinol, 29: 70-87.

Olavarria J, Van Sluyters RC, Killackey HP. (1984) Evidence for the complementary organization of callosal and thalamic connections within rat somatosensory cortex. Brain Res, 291: 364-368.

Oswald I. (1980) Sleep as restorative process: human clues. Prog Brain Res, 53: 279-288.

Ozen S, Sirota A, Belluscio MA, Anastassiou CA, Stark E, Koch C, Buzsaki G. (2010) Transcranial electric stimulation entrains cortical neuronal populations in rats. J Neurosci, 30: 11476-11485.

Pace-Schott EF, Hobson JA. (2002) The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. Nat Rev Neurosci, 3: 591-605.

Pal D, Mallick BN. (2004) GABA in pedunculo pontine tegmentum regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABAA receptors in freely moving rats. Neurosci Lett, 365: 200-204.

Pal D, Mallick BN. (2009) GABA in pedunculopontine tegmentum increases rapid eye movement sleep in freely moving rats: possible role of GABA-ergic inputs from substantia nigra pars reticulata. Neuroscience, 164: 404-414.

Pal D, Mallick BN. GABA-ergic modulation of pontine cholinergic and noradrenergic neurons for rapid eye movement sleep generation. In: Monti JM, Pandi-Perumal

SR, Möhler H (szerk.), GABA and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects. Springer, New York, 2010.

Palomero-Gallagher N, Zilles K. Isocortex. In: Paxinos G (szerk.), The rat nervous system. Elsevier Academic Press, San Diego, 2004: 729-757.

Paperna T, Malach R. (1991) Patterns of sensory intermodality relationships in the cerebral cortex of the rat. J Comp Neurol, 308: 432-456.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2007.

Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. (2008) Neocortical glial cell numbers in human brains. Neurobiol Aging, 29: 1754-1762.

Peters A, Jones EG. Cerebral cortex. Plenum Press, New York, 1984.

Petersen CC, Crochet S. (2013) Synaptic computation and sensory processing in neocortical layer 2/3. Neuron, 78: 28-48.

Petersen CC, Hahn TT, Mehta M, Grinvald A, Sakmann B. (2003) Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 13638-13643.

Pettersen KH, Devor A, Ulbert I, Dale AM, Einevoll GT. (2006) Current-source density estimation based on inversion of electrostatic forward solution: effects of finite extent of neuronal activity and conductivity discontinuities. J Neurosci Methods, 154: 116-133.

Peyrache A, Khamassi M, Benchenane K, Wiener SI, Battaglia FP. (2009) Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. Nat Neurosci, 12: 919-926.

Pierret T, Lavallee P, Deschenes M. (2000) Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. J Neurosci, 20: 7455-7462.

Pinault D, Deschenes M. (1998a) Anatomical evidence for a mechanism of lateral inhibition in the rat thalamus. Eur J Neurosci, 10: 3462-3469.

Pinault D, Deschenes M. (1998b) Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: a three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. J Comp Neurol, 391: 180-203.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. Neuroscience, 101: 815-850.

Poskanzer KE, Yuste R. (2011) Astrocytic regulation of cortical UP states. Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 18453-18458.

Potez S, Larkum ME. (2008) Effect of common anesthetics on dendritic properties in layer 5 neocortical pyramidal neurons. J Neurophysiol, 99: 1394-1407.

Pralong E, Magistretti PJ. (1995) Noradrenaline increases K-conductance and reduces glutamatergic transmission in the mouse entorhinal cortex by activation of alpha 2-adrenoreceptors. Eur J Neurosci, 7: 2370-2378.

Prince DA, Tseng GF. (1993) Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. J Neurophysiol, 69: 1276-1291.

Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsaki G, Turner DA. (1998a) Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. J Comp Neurol, 391: 335-352.

Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsaki G, Turner DA. (1998b) Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: Intracellular staining in vivo and in vitro. J Comp Neurol, 391: 335-352.

Quibell R, Prommer EE, Mihalyo M, Twycross R, Wilcock A. (2011) Ketamine*. J Pain Symptom Manage, 41: 640-649.

Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H. (1981) Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. Pflugers Arch, 389: 159-170.

Rasch B, Born J. (2013) About sleep's role in memory. Physiol Rev, 93: 681-766.

Rasch B, Pommer J, Diekelmann S, Born J. (2009) Pharmacological REM sleep suppression paradoxically improves rather than impairs skill memory. Nat Neurosci, 12: 396-397.

Rechtschaffen A, Bergmann BM. (1995) Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. Behav Brain Res, 69: 55-63.

Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB. (1983) Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. Science, 221: 182-184.

Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system of sleep stages in human subjects. Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California, Los Angeles, 1968.

Reep RL, Goodwin GS, Corwin JV. (1990) Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. J Comp Neurol, 294: 262-280.

Reimund E. (1994) The free radical flux theory of sleep. Med Hypotheses, 43: 231-233.

Riedner BA, Vyazovskiy VV, Huber R, Massimini M, Esser S, Murphy M, Tononi G. (2007) Sleep homeostasis and cortical synchronization: III. A high-density EEG study of sleep slow waves in humans. Sleep, 30: 1643-1657.

Rigas P, Castro-Alamancos MA. (2009) Impact of persistent cortical activity (up States) on intracortical and thalamocortical synaptic inputs. J Neurophysiol, 102: 119-131.

Rockel AJ, Hiorns RW, Powell TP. (1980) The basic uniformity in structure of the neocortex. Brain, 103: 221-244.

Ros H, Sachdev RN, Yu Y, Sestan N, McCormick DA. (2009) Neocortical networks entrain neuronal circuits in cerebellar cortex. J Neurosci, 29: 10309-10320.

Rudolph M, Pospischil M, Timofeev I, Destexhe A. (2007) Inhibition determines membrane potential dynamics and controls action potential generation in awake and sleeping cat cortex. J Neurosci, 27: 5280-5290.

Rudolph U, Antkowiak B. (2004) Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. Nat Rev Neurosci, 5: 709-720.

Sakata S, Harris KD. (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. Neuron, 64: 404-418.

Saleem AB, Chadderton P, Apergis-Schoute J, Harris KD, Schultz SR. (2010) Methods for predicting cortical UP and DOWN states from the phase of deep layer local field potentials. J Comput Neurosci, 29: 49-62.

Salkoff DB, Zagha E, Yuzgec O, McCormick DA. (2015) Synaptic Mechanisms of Tight Spike Synchrony at Gamma Frequency in Cerebral Cortex. J Neurosci, 35: 10236-10251.

Sanchez-Vives MV, McCormick DA. (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. Nat Neurosci, 3: 1027-1034.

Saper CB, Chou TC, Scammell TE. (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. Trends Neurosci, 24: 726-731.

Saporta S, Kruger L. (1977) The organization of thalamocortical relay neurons in the rat ventrobasal complex studied by the retrograde transport of horseradish peroxidase. J Comp Neurol, 174: 187-208.

Scharf MT, Naidoo N, Zimmerman JE, Pack AI. (2008) The energy hypothesis of sleep revisited. Prog Neurobiol, 86: 264-280.

Schubert D, Kotter R, Luhmann HJ, Staiger JF. (2006) Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer va in the primary somatosensory cortex. Cereb Cortex, 16: 223-236.

Schuz A, Palm G. (1989) Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. J Comp Neurol, 286: 442-455.

Schweimer JV, Mallet N, Sharp T, Ungless MA. (2011) Spike-timing relationship of neurochemically-identified dorsal raphe neurons during cortical slow oscillations. Neuroscience, 196: 115-123.

Sharma AV, Wolansky T, Dickson CT. (2010) A comparison of sleeplike slow oscillations in the hippocampus under ketamine and urethane anesthesia. J Neurophysiol, 104: 932-939.

Shaw PJ, Tononi G, Greenspan RJ, Robinson DF. (2002) Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in Drosophila. Nature, 417: 287-291.

Sherman SM. (2012) Thalamocortical interactions. Curr Opin Neurobiol, 22: 575-579.

Sherman SM, Guillery RW. (2002) The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 357: 1695-1708.

Sheroziya M, Timofeev I. (2014) Global intracellular slow-wave dynamics of the thalamocortical system. J Neurosci, 34: 8875-8893.

Shu YS, Hasenstaub A, McCormick DA. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. Nature, 423: 288-293.

Siapas AG, Wilson MA. (1998) Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. Neuron, 21: 1123-1128.

Siegel JH. The neural control of sleep and waking. Springer, New York, 2002.

Siegel JM. (2001) The REM sleep-memory consolidation hypothesis. Science, 294: 1058-1063.

Siegel JM. (2008) Do all animals sleep? Trends Neurosci, 31: 208-213.

Siegel JM, Nienhuis R, Tomaszewski KS. (1984) REM sleep signs rostral to chronic transections at the pontomedullary junction. Neurosci Lett, 45: 241-246.

Silva LR, Amitai Y, Connors BW. (1991) Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. Science, 251: 432-435.

Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsaki G. (2003) Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 2065-2069.

Somogyi P. (1977) A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. Brain Res, 136: 345-350.

Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. Brain Res Brain Res Rev, 26: 113-135.

Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E, Yoshimura M. (2004) Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. J Physiol, 555: 515-526.

Sperry RW. (1947) Cerebral regulation of motor coordination in monkeys following multiple transection of sensorimotor cortex. J Neurophysiol, 10: 275-294.

Spreafico R, Barbaresi P, Weinberg RJ, Rustioni A. (1987) Sii-Projecting Neurons in the Rat Thalamus - a Single-Retrograde-Tracing and Double-Retrograde-Tracing Study. Somatosens Res, 4: 359-375.

Staiger JF, Flagmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kotter R, Luhmann HJ. (2004) Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. Cereb Cortex, 14: 690-701.

Stephenson R, Chu KM, Lee J. (2007) Prolonged deprivation of sleep-like rest raises metabolic rate in the Pacific beetle cockroach, Diploptera punctata (Eschscholtz). J Exp Biol, 210: 2540-2547.

Steriade M. Neuronal substrates of sleep and epilepsy. Cambridge University Press, New York, 2003.

Steriade M, Amzica F. (1996) Intracortical and corticothalamic coherency of fast spontaneous oscillations. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 2533-2538.

Steriade M, Amzica F, Nunez A. (1993a) Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells. J Neurophysiol, 70: 1385-1400.

Steriade M, Contreras D, Curro Dossi R, Nunez A. (1993b) The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. J Neurosci, 13: 3284-3299.

Steriade M, McCarley RW. Brainstem control of wakefulness and sleep. Plenum Press, New York, 2005.

Steriade M, Nunez A, Amzica F. (1993c) Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. J Neurosci, 13: 3266-3283.

Steriade M, Nunez A, Amzica F. (1993d) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. J Neurosci, 13: 3252-3265.

Steriade M, Timofeev I. (2003) Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. Neuron, 37: 563-576.

Steriade M, Timofeev I, Durmuller N, Grenier F. (1998) Dynamic properties of corticothalamic neurons and local cortical interneurons generating fast rhythmic (30-40 Hz) spike bursts. J Neurophysiol, 79: 483-490.

Steriade M, Timofeev I, Grenier F. (2001) Natural waking and sleep states: A view from inside neocortical neurons. J Neurophysiol, 85: 1969-1985.

Stroh A, Adelsberger H, Groh A, Ruhlmann C, Fischer S, Schierloh A, Deisseroth K, Konnerth A. (2013) Making waves: initiation and propagation of corticothalamic Ca2+ waves in vivo. Neuron, 77: 1136-1150.

Sugino K, Hempel CM, Miller MN, Hattox AM, Shapiro P, Wu C, Huang ZJ, Nelson SB. (2006) Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. Nat Neurosci, 9: 99-107.

Sutor B, Hablitz JJ. (1989) EPSPs in rat neocortical neurons in vitro. I. Electrophysiological evidence for two distinct EPSPs. J Neurophysiol, 61: 607-620.

Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, Tamas G. (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. Science, 311: 233-235.

Szymusiak R, Gvilia I, McGinty D. (2007) Hypothalamic control of sleep. Sleep Med, 8: 291-301.

Szymusiak R, McGinty D. (2008) Hypothalamic regulation of sleep and arousal. Ann N Y Acad Sci, 1129: 275-286.

Tahvildari B, Wolfel M, Duque A, McCormick DA. (2012) Selective functional interactions between excitatory and inhibitory cortical neurons and differential contribution to persistent activity of the slow oscillation. J Neurosci, 32: 12165-12179.

Telfeian AE, Connors BW. (1998) Layer-specific pathways for the horizontal propagation of epileptiform discharges in neocortex. Epilepsia, 39: 700-708.

Terzano MG, Mancia D, Salati MR, Costani G, Decembrino A, Parrino L. (1985) The cyclic alternating pattern as a physiologic component of normal NREM sleep. Sleep, 8: 137-145.

Thakkar M, Portas C, McCarley RW. (1996) Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. Brain Res, 723: 223-227.

Thakkar MM, Strecker RE, McCarley RW. (1998) Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. J Neurosci, 18: 5490-5497.

Thomson AM, Girdlestone D, West DC. (1988) Voltage-dependent currents prolong single-axon postsynaptic potentials in layer III pyramidal neurons in rat neocortical slices. J Neurophysiol, 60: 1896-1907.

Timofeev I. (2013) Local origin of slow EEG waves during sleep. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova, 63: 105-112.

Timofeev I, Contreras D, Steriade M. (1996) Synaptic responsiveness of cortical and thalamic neurones during various phases of slow sleep oscillation in cat. J Physiol, 494 (Pt 1): 265-278.

Timofeev I, Grenier F, Bazhenov M, Sejnowski TJ, Steriade M. (2000) Origin of slow cortical oscillations in deafferented cortical slabs. Cereb Cortex, 10: 1185-1199.

Timofeev I, Grenier F, Steriade M. (2001) Disfacilitation and active inhibition in the neocortex during the natural sleep-wake cycle: an intracellular study. Proc Natl Acad Sci U S A, 98: 1924-1929.

Timofeev I, Steriade M. (1996) Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats. J Neurophysiol, 76: 4152-4168.

Tononi G. (2009) Slow wave homeostasis and synaptic plasticity. J Clin Sleep Med, 5: S16-19.

Tononi G, Cirelli C. (2006) Sleep function and synaptic homeostasis. Sleep Med Rev, 10: 49-62.

Tononi G, Cirelli C. (2014) Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. Neuron, 81: 12-34.

Toro-Matos A, Rendon-Platas AM, Avila-Valdez E, Villarreal-Guzman RA. (1980) Physostigmine antagonizes ketamine. Anesth Analg, 59: 764-767.

Torterolo P, Morales FR, Chase MH. (2002) GABAergic mechanisms in the pedunculopontine tegmental nucleus of the cat promote active (REM) sleep. Brain Res, 944: 1-9.

Tose R, Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Furukawa K, Ueno S, Hirota K. (2009) Orexin A decreases ketamine-induced anesthesia time in the rat: the relevance to brain noradrenergic neuronal activity. Anesth Analg, 108: 491-495.

Toth A, Gyengesi E, Zaborszky L, Detari L. (2008) Interaction of slow cortical rhythm with somatosensory information processing in urethane-anesthetized rats. Brain Res, 1226: 99-110.

Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Riquelme LA, Murer MG. (2001) Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. J Neurosci, 21: 6430-6439.

Tucker MA, Fishbein W. (2009) The impact of sleep duration and subject intelligence on declarative and motor memory performance: how much is enough? J Sleep Res, 18: 304-312.

Tukker JJ, Lasztoczi B, Katona L, Roberts JD, Pissadaki EK, Dalezios Y, Marton L, Zhang L, Klausberger T, Somogyi P. (2013) Distinct dendritic arborization and in

vivo firing patterns of parvalbumin-expressing basket cells in the hippocampal area CA3. J Neurosci, 33: 6809-6825.

Turner DA, Li XG, Pyapali GK, Ylinen A, Buzsaki G. (1995) Morphometric and electrical properties of reconstructed hippocampal CA3 neurons recorded in vivo. J Comp Neurol, 356: 580-594.

Ulbert I, Halgren E, Heit G, Karmos G. (2001) Multiple microelectrode-recording system for human intracortical applications. J Neurosci Methods, 106: 69-79.

Vaknin G, DiScenna PG, Teyler TJ. (1988) A method for calculating current source density (CSD) analysis without resorting to recording sites outside the sampling volume. J Neurosci Methods, 24: 131-135.

Van Cauter E, Spiegel K, Tasali E, Leproult R. (2008) Metabolic consequences of sleep and sleep loss. Sleep Med, 9 Suppl 1: S23-28.

Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M. (1989) Mapping of cholinoceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. Arch Ital Biol, 127: 133-164.

Veinante P, Lavallee P, Deschenes M. (2000) Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. J Comp Neurol, 424: 197-204.

Vertes RP, Siegel JM. (2005) Time for the sleep community to take a critical look at the purported role of sleep in memory processing. Sleep, 28: 1228-1229; discussion 1230-1233.

Vogel GW, Vogel F, McAbee RS, Thurmond AJ. (1980) Improvement of depression by REM sleep deprivation. New findings and a theory. Arch Gen Psychiatry, 37: 247-253.

Volgushev M, Chauvette S, Mukovski M, Timofeev I. (2006) Precise long-range synchronization of activity and silence in neocortical neurons during slow-wave oscillations. J Neurosci, 26: 5665-5672.

Vyazovskiy V, Borbely AA, Tobler I. (2000) Unilateral vibrissae stimulation during waking induces interhemispheric EEG asymmetry during subsequent sleep in the rat. J Sleep Res, 9: 367-371.

Vyazovskiy VV, Faraguna U, Cirelli C, Tononi G. (2009) Triggering slow waves during NREM sleep in the rat by intracortical electrical stimulation: effects of sleep/wake history and background activity. J Neurophysiol, 101: 1921-1931.

Vyazovskiy VV, Olcese U, Hanlon EC, Nir Y, Cirelli C, Tononi G. (2011) Local sleep in awake rats. Nature, 472: 443-447.

Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer JA, McCormick DA, Arnsten AF. (2007) Alpha2A-

adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. Cell, 129: 397-410.

Wang Z, McCormick DA. (1993) Control of firing mode of corticotectal and corticopontine layer V burst-generating neurons by norepinephrine, acetylcholine, and 1S,3R-ACPD. J Neurosci, 13: 2199-2216.

Webb WB. (1988) An objective behavioral model of sleep. Sleep, 11: 488-496.

Welker C. (1971) Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (SmI) cerebral neocortex in albino rat. Brain Res, 26: 259-275.

Welker C. (1976) Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. J Comp Neurol, 166: 173-189.

Welker E, Hoogland PV, Van der Loos H. (1988) Organization of feedback and feedforward projections of the barrel cortex: a PHA-L study in the mouse. Exp Brain Res, 73: 411-435.

Wellman CL, Logue SF, Sengelaub DR. (1995) Maze learning and morphology of frontal cortex in adult and aged basal forebrain-lesioned rats. Behav Neurosci, 109: 837-850.

Wester JC, Contreras D. (2012) Columnar interactions determine horizontal propagation of recurrent network activity in neocortex. J Neurosci, 32: 5454-5471.

White EL, DeAmicis RA. (1977) Afferent and efferent projections of the region in mouse SmL cortex which contains the posteromedial barrel subfield. J Comp Neurol, 175: 455-482.

Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST. (1983) Disfacilitation and long-lasting inhibition of neostriatal neurons in the rat. Exp Brain Res, 51: 227-235.

Wilson CJ, Groves PM. (1981) Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. Brain Res, 220: 67-80.

Wilson CJ, Kawaguchi Y. (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. J Neurosci, 16: 2397-2410.

Windels F, Crane JW, Sah P. (2010) Inhibition dominates the early phase of up-states in the basolateral amygdala. J Neurophysiol, 104: 3433-3438.

Wise SP, Jones EG. (1978) Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. J Comp Neurol, 178: 187-208.

Wolansky T, Clement EA, Peters SR, Palczak MA, Dickson CT. (2006) Hippocampal slow oscillation: a novel EEG state and its coordination with ongoing neocortical activity. J Neurosci, 26: 6213-6229.

Wright AK, Ramanathan S, Arbuthnott GW. (2001) Identification of the source of the bilateral projection system from cortex to somatosensory neostriatum and an exploration of its physiological actions. Neuroscience, 103: 87-96.

Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. (2013) Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. Science, 342: 373-377.

Yassin L, Benedetti BL, Jouhanneau JS, Wen JA, Poulet JF, Barth AL. (2010) An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. Neuron, 68: 1043-1050.

Yoshida A, Dostrovsky JO, Chiang CY. (1992) The afferent and efferent connections of the nucleus submedius in the rat. J Comp Neurol, 324: 115-133.

Zilles K, Wree A. Cortex: Areal and laminar structure. In: Paxinos G (szerk.), The Rat Nervous System. Academic Press, San Diego, 1985: 375-415.

Zilles K, Wree A. Cortex: Areal and laminar structure. In: Paxinos G (szerk.), The Rat Nervous System. Academic Press, San Diego, 1995: 649-685.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

12.1 Az értekezés témáját adó saját közlemények

Márton G, Orbán G, Kiss M, Fiáth R, Pongrácz A, Ulbert I. (2015) A multimodal SU-8 platinum – polyimide microelectrode array for chronic in vivo neurophysiology. PLoS One, 10: e0145307

Fiáth R, Kerekes BP, Wittner L, Tóth K, Beregszászi P, Horváth D, Ulbert I. (2016) Laminar analysis of the slow wave activity in the somatosensory cortex of anesthetized rats. Eur J Neurosci, 44: 1935-1951.

12.2 Az értekezés témájától független közlemények

Grand L, Pongrácz A, Vázsonyi E, Márton G, Gubán D, Fiáth R, Kerekes BP, Karmos G, Ulbert I, Battistig G. (2011) A novel multisite silicon probe for high quality laminar neural recordings. Sensors Actuat A-Phys, 166: 14-21.

Torfs T, Aarts AAA, Erismis MA, Aslam J, Yazicioglu RF, Seidl K, Herwik S, Ulbert I, Dombovári B, Fiáth R, Kerekes BP, Puers R, Paul O, Ruther P, Van Hoof C, Neves HP. (2011) Two-dimensional multi-channel neural probes with electronic depth control. IEEE Trans Biomed Circuits Syst, 5: 403-412.

Héja L, Nyitrai G, Kékesi O, Dobolyi Á, Szabó P, Fiáth R, Ulbert I, Pál-Szenthe B, Palkovits M, Kardos J. (2012) Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. BMC Biol, 10: 26.

Márton G, Fekete Z, Fiáth R, Baracskay P, Ulbert I, Juhász G, Battistig G, Pongrácz A. (2013) In vivo measurements with robust silicon-based multielectrode arrays with extreme shaft lengths. IEEE Sensors J, 13: 3263-3269.

Dombovári B, Fiáth R, Kerekes BP, Tóth E, Wittner L, Horváth D, Seidl K, Herwik S, Torfs T, Paul O, Ruther P, Neves HP, Ulbert I. (2014) In vivo validation of the electronic depth control probes. Biomed Tech (Berlin), 59: 283-289.

Kárász Z, Fiáth R, Földesy P, Vazquez A. (2014) Tunable low noise amplifier implementation with low distortion pseudo-resistance for in vivo brain activity measurement. IEEE Sensors J, 14: 1357-1363.

DOI:10.14753/SE.2017.1961

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Ulbert Istvánnak, az elmúlt évek során kapott emberi és szakmai támogatásért, valamint, hogy az MTA Természettudományi Kutatóközpont Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetének Összehasonlító Pszichofiziológiai Csoportjában végezhettem a doktori tanulmányaimat. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Karmos Györgynek, hogy az egyetemi éveim alatt megismertette és megszerettette velem az elektrofiziológia és az idegtudomány területeit.

Szeretném megköszönni Dr. Wittner Luciának és Lengyel Katalinnak a szövettannal kapcsolatos segítségüket. Külön köszönet illeti Kottra Pétert, az Összehasonlító Pszichofiziológiai Csoport állatgondozóját és laborasszisztensét a kísérletek során nyújtott segítségéért.

Köszönet az Összehasonlító Pszichofiziológiai Csoport többi tagjának is a szakmai segítségért és a baráti légkörért.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom szüleimnek és páromnak a mérhetetlen támogásukért és végtelen türelmükért.