

Received: 2012.03.27
Accepted: 2012.08.21
Published: 2012.10.18

Udział synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta

Gap junction involvement in hippocampal theta rhythm generation

Renata Bocian, Tomasz Kowalczyk

Katedra Neurobiologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Obecny w zapisie hipokampalnej aktywności elektroencefalograficznej rytm theta jest przykładem modelowej oscylacji i synchronizacji zachodzącej w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego. Obecnie wiadomo, że u podstaw procesów oscylacyjnych leży sprawna komunikacja międzyneuronalna odbywająca się za pośrednictwem synaps chemicznych i elektrycznych. Mimo dobrze udokumentowanej wiedzy dotyczącej udziału transmisji chemicznej w powstawaniu rytmu theta, rola znacznie szybszej, przebiegającej za pośrednictwem połączeń szczelinowych, transmisji elektrycznej pozostaje wciąż nie do końca poznana. W pracy omówiono dotychczasowe badania dotyczące funkcji niskooporowych połączeń szczelinowych w powstawaniu rytmu theta – najlepiej zsynchronizowanego wzorca EEG rejestrowanego z mózgu ssaków.

Słowa kluczowe:

synapsy elektryczne • rytm theta • formacja hipokampa • *in vitro* • *in vivo*

Summary

Hippocampal theta rhythm is probably the best example of oscillations and synchrony phenomena occurring in neuronal networks of the central nervous system. It is well known that intraneuronal communication via chemical and electrical synapses underlies these oscillatory processes. Despite well-documented knowledge concerning the participation of chemical transmission in production of theta activity, the role of much faster gap junction communication is still not fully understood. This paper provides an overview of current research data concerning the involvement of electrical transmission in generation of the best synchronized EEG pattern recorded from the mammalian brain – theta rhythm.

Key words:

gap junction • theta rhythm • hippocampal formation • *in vivo* • *in vitro*

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1014656>

Word count:

4508

Tables:

–

Figures:

6

References:

111

Adres autorki:

dr Renata Bocian, Katedra Neurobiologii UŁ, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: renab@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ACSF** – sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (artificial cerebrospinal fluid); **AP5** – niekompetetywny agonista receptorów NMDA; **CA1, CA3** – obszary komórek piramidowych hipokampa właściwego; **CCH** – karbachol; **CHIN** – chinina; **Cx36, Cx45** – izoformy białek koneksynowych; **EEG** – elektroencefalogram; **EPSPs** – potencjały postsynaptyczne pobudzające (excitatory postsynaptic potentials); **GJ** – synapsa elektryczna, połączenie szczelinowe (gap junction); **HPC** – formacja hipokampa; **IPSPs** – potencjały postsynaptyczne hamujące (inhibitory postsynaptic potentials); **KARB** – karbenoksolon; **LIA** – wysokoamplitudowa aktywność zdesynchronizowana (large irregular activity); **MPOs** – rytmiczne wahania potencjału błonowego (membrane potential oscillations); **NMDA** – kwas N-metylo-D-asparginowy; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **TMA** – trimetyloamina.

WPROWADZENIE

Właściwości elektrofizjologiczne komórek nerwowych oraz interakcje zachodzące m.in. w sieciach neuronalnych umożliwiają synchronizację oscylacji potencjałów błonowych, widoczną w polowym zapisie aktywności elektroencefalograficznej (EEG) jako rytmiczny wzorzec o różnej częstotliwości. Należy pamiętać, że u podstaw ośrodkowych procesów oscylacyjnych leży przede wszystkim sprawna komunikacja pozwalająca na synchronizację aktywności neuronów.

Badania dotyczące sposobów przekazywania informacji między neuronami mają wieloletnią historię i sięgają końca XIX wieku. Do lat 40. ub.w., obowiązywała hipoteza rektikularna, zakładająca ciągłą siećową budowę tkanki nerwowej [85]. Dopiero rozwój technik eksperymentalnych pozwolił na obalenie tej niezwykle popularnej wśród neurobiologów teorii i dał podstawę nowej koncepcji określanej dziś jako teoria neuronalna. Fundamentem tej koncepcji stały się wyniki badań histologicznych Cajala wskazujące na brak bezpośredniego kontaktu między neuronami i obecność fizycznej przerwy między sąsiadującymi komórkami [3,26]. Dalsze badania wykazały, że pozbawione bezpośredniego kontaktu neurony, komunikują się jednak ze sobą za pośrednictwem swoistych związków chemicznych, uwalnianych na zakończeniach aksonów [63]. To niezwykle odkrycie zdominowało na wiele lat kierunki badań dotyczących przekazywania informacji między komórkami nerwowymi. Nowe doniesienia dotyczące komunikacji międzyneuronalnej pojawiły się wraz z rozwojem zaawansowanych technik mikroskopowych. Rezultatem tych badań były dane wskazujące na obecność mostków cytoplazmatycznych zapewniających szybki i bezpośredni kontakt między sąsiadującymi neuronami [77]. Połączenia te, według badań elektrofizjologicznych, stanowią podstawę morfologiczną transmisji elektrycznej, odbywającej się za pośrednictwem synaps elektrycznych [7,35,62,79,87,88,103].

BUDOWA SYNAPS ELEKTRYCZNYCH

Synapsy elektryczne, nazywane także połączeniami szczelinowymi (gap junction – GJ), to heksamery utworzone z sześciu cząsteczek białka integralnego zwanego koneksyną. W błonie komórkowej białka te tworzą tzw. konekson, przybierający postać półkanału (ryc. 1) [8]. Ścisłe połączenie dwóch położonych współosiowo koneksionów sąsiadujących neuronów stanowi niskooporową drogę pozwalającą na bezpośredni przepływ między komórkami jonów oraz cząsteczek o masie nieprzekraczającej 1 kDa [33].

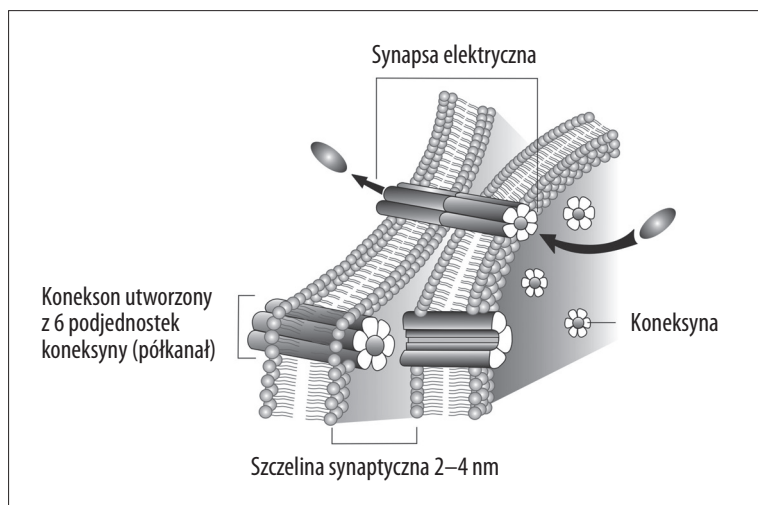
Biochemiczną identyfikację białek tworzących strukturę koneksionu opisali Kumar i Gilula [61]. Autorzy ci wykazali, że pod względem biochemicznym koneksyny stanowią heterogenną grupę białek, wykazujących jednak wspólne schematy budowy. Każda z izoform tego białka składa się z czterech hydrofobowych domen transbłonowych (m1-m4), dwóch pętli zewnątrzkomórkowych (e11-e12) i jednej pętli wewnątrzkomórkowej (c1) oraz położonych w cytoplazmie końców: karboksylowego (COOH) i aminokwasowego (NH₂) (ryc. 2) [61].

Niejednorodność strukturalna białek koneksynowych stała się podstawą do wyodrębnienia dwóch postaci półkanałów [34,84]. W pierwszym przypadku sześć identycznych pod względem biochemicznym koneksyn tworzy homomeryczny konekson. Natomiast w drugim, obecność kilku izoform koneksynowych w obrębie pojedynczego koneksionu determinuje heteromeryczną postać półkanału (ryc. 3). Homomeryczne i heteromeryczne koneksyny mogą tworzyć homo- oraz heterotypowe kanały jonowe [90]. Kanały homotypowe to struktury utworzone z dwóch identycznych koneksionów homomerycznych lub heteromerycznych. Powstałe w ten sposób połączenia tworzą odpowiednio homomeryczno-homotypowe oraz heteromeryczno-homotypowe połączenia szczelinowe (ryc. 3). Natomiast kanał utworzony z dwóch różnych pod względem biochemicznym koneksionów tworzy ostatni typ połączeń szczelinowych określanej jako heteromeryczno-heterotypowy (ryc. 3) [90].

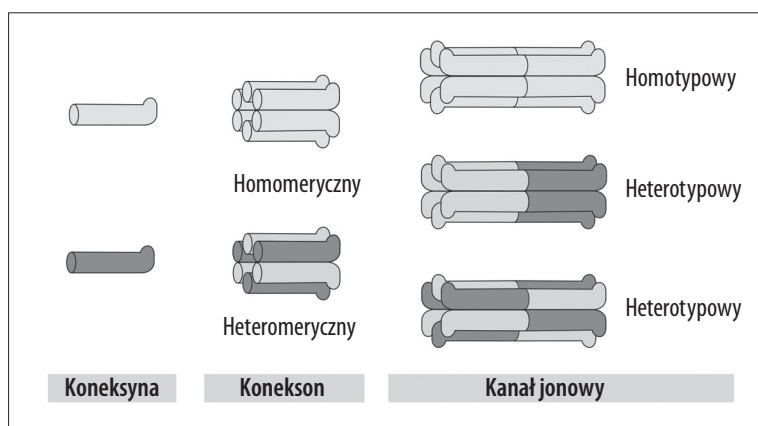
Dotąd zidentyfikowano 20 ludzkich oraz 21 mysich białek koneksynowych, których skrótowe nazwy uwzględniają oznakowanie kodujących je genów oraz masę cząsteczkową wyrażoną w kDa [11]. Obecność licznych izoform koneksynowych determinuje nie tylko różnorodność strukturalną półkanału, czy ostatecznie ukształtowanego połączenia szczelinowego, ale wpływa przede wszystkim na właściwości fizykochemiczne tego połączenia. Właściwości fizykochemiczne GJ umożliwiają z kolei synchronizację aktywności neuronów tworzących lokalne sieci neuronalne w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). W pracy omówiono rolę synaps elektrycznych w powstawaniu rytmu theta – najlepiej zsynchronizowanej aktywności EEG rejestrowanej z mózgu ssaków.

WYSTĘPOWANIE SYNAPS ELEKTRYCZNYCH W OUN

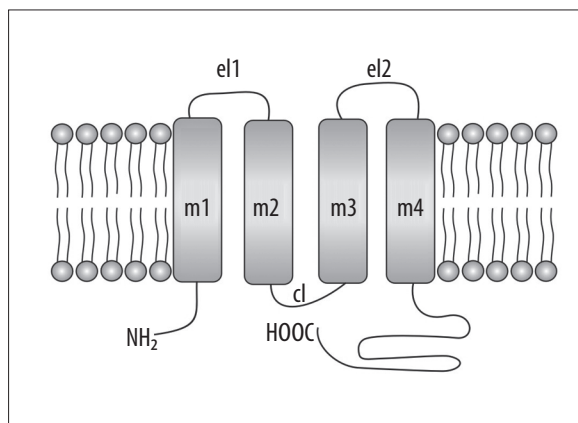
Pierwsze doniesienia wskazujące na obecność synaps elektrycznych w OUN pojawiły się pod koniec lat 50. ub.w. [7,10,103]. Wówczas to, w pionierskich badaniach prowadzonych na neuronach stawonogów wykazano, że oprócz transmisji chemicznej istnieje również przekaznictwo



Ryc. 1. Schemat budowy synapsy elektrycznej. Sześć podjednostek koneksynowych tworzy heksagonalną strukturę półkanału (koneksonu). Dwa wewnętrzne kanały sąsiadujących neuronów tworzą synapsę elektryczną ze szczeliną (1–2 nm) występującą po zewnętrznej stronie komórki



Ryc. 2. Typy połączeń szczelinowych wyodrębnione na podstawie różnic w budowie koneksonu oraz sposobu połączenia dwóch współtworzących kanał jonowy koneksonów (wg [61] zmodyfikowano)



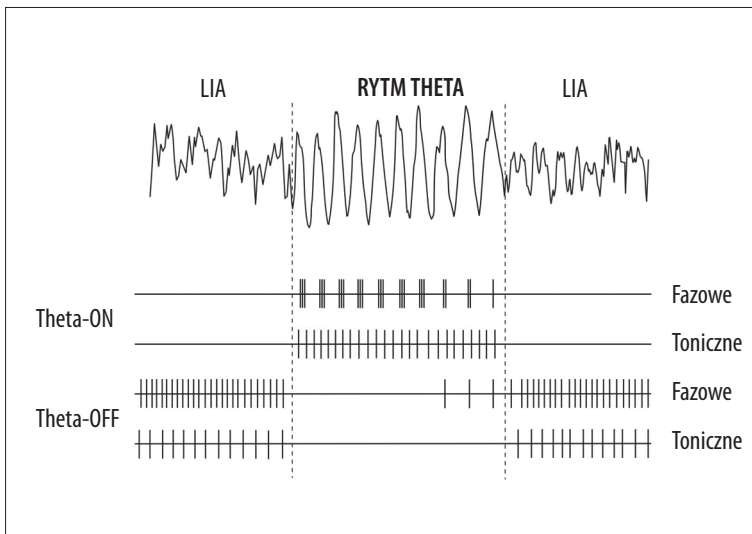
Ryc. 3. Schemat struktury drugorzędowej koneksyny z widocznymi domenami transbłonowymi (m1–m4), pętlami zewnątrz- (el1, el2) i wewnątrzkomórkowymi (cl) oraz położonymi po stronie cytoplazmy końcami aminokwasowym (NH₂) i karboksylowym (COOH)

znacznie szybsze, odbywające się za pośrednictwem tzw. szlaków elektrycznych [103]. Na wyniki potwierdzające występowanie GJ w tkance nerwowej kręgowców nie trzeba było długo czekać. Rezultaty licznych badań wykazały, że złącza niskooporowe występują nie tylko w tkance nerwowej ryb i płazów [35,79,88], ale również u ssaków [4]. Wydaje się zatem, że oba typy komunikacji międzyneuronalnej (chemiczna i elektryczna) występują powszechnie wzajemnie się uzupełniając.

Wprawdzie dotąd zidentyfikowano około 20 genów odpowiedzialnych za ekspresję różnych izoform koneksynowych, ale w OUN ssaków występuje zaledwie dziesięć z nich i dwie tzw. paneksyny. Obecność białek koneksynowych stwierdzono w licznych obszarach mózgu, w tym w formacji hipokampa (HPC), która ściśle jest związana z powstawaniem zsynchronizowanego wzorca EEG – rytmu theta [27]. W strukturze tej zidentyfikowano obie paneksyny oraz dwie izoformy koneksynowe (Cx36 i Cx45) [5,6,46,68,105]. Co ciekawe, dokładne mapowanie lokalizacji hipokampalnych GJ wykazało, że synapsy elektryczne w tej strukturze występują w polach CA1, CA3 hipokampa właściwego oraz zakręcie zębatym, czyli obszarach uznawanych za wewnątrzhipokampalne generatory rytmu theta [14,16,50,51,57,59]. To właśnie wyniki badań immunohistochemicznych potwierdzające obecność GJ w formacji hipokampa oraz wyniki badań elektrofizjologicznych wskazujące na udział transmisji elektrycznej w powstawaniu aktywności epileptycznej [27,74,81,95], rytmu gamma [96,98] oraz szybkich oscylacji [31,97] stały się przesłanką do zapoczątkowania badań mających na celu wyjaśnienie roli transmisji elektrycznej w generowaniu hipokampalnego rytmu theta.

RYTM THETA JAKO PRZYKŁAD ZSYNCHRONIZOWANEJ AKTYWNOŚCI OSCYLACYJNEJ

Rytm theta, zwany także rytmiczną aktywnością wolno falową, jest przykładem modelowej oscylacji i synchronizacji zachodzącej w sieciach neuronalnych OUN [14,16,20].



Ryc. 4. Zapis aktywności EEG rejestrowanej z formacji hipokampa u anestetyzowanego szczura (górny panel) wraz ze schematem przedstawiającym klasyfikację neuronów związanych z rytmem theta (dolny panel składający się z czterech linii). Dwie górne linie ilustrują odpowiednio wzór wyładowań neuronów theta-ON fazowych i theta-ON tonicznych. Dwie dolne linie, przedstawiają wzór wyładowań dwóch podtypów neuronów theta-OFF odpowiednio fazowych i tonicznych (wg [30] zmodyfikowano)

Ten wysokoamplitudowy (1–2 mV) wzorec EEG o niemalże sinusoidalnym przebiegu i szerokim zakresie częstotliwości (3–12 Hz) rejestrowany jest z różnych obszarów układu limbicznego. Jedną ze struktur tego układu silnie związaną z powstawaniem aktywności theta jest formacja hipokampa (HPC) [14,16,56]. Klasyczne już dzisiaj badania Vanderwolfa [99,100,108], prowadzone na gryzoniach, stały się podstawą sformułowania powszechnie obowiązującej hipotezy zakładającej heterogeny charakter rytmu theta u szczurów. Zgodnie z nią u gryzoni występują dwa typy rytmu theta różniące się między sobą pasmem dominującej częstotliwości oraz powiązaniem z aktywnością ruchową. Co więcej, badania farmakologiczne wykazały, że oba typy rytmu mają odmienne podłoże neurochemiczne oraz różną wrażliwość na podawane związki anestetyczne [14,16,60,100].

Typ I theta (7–12 Hz), określane także jako ruchowo zależny, obserwowany jest u gryzoni podczas biegania, chodzenia, pływania oraz niestereotypowych ruchów kończyn i głowy, czyli w trakcie tzw. dowolnych aktów ruchowych [99,101]. Badania farmakologiczne wykazały, że aktywność typu I znoszona jest przez uretan, pentobarbital i eter etylowy, czyli najczęściej stosowane anestetyki [14,65,82,100]. Z kolei obwodowe iniekcje siarczanu atropiny (antagonisty receptorów cholinergicznym muskarynowych), pozostawały bez wpływu na rejestrowany wzorec EEG, wskazując tym samym na niecholinergiczny charakter rytmu theta typu I [13,14,16,20,21,60,65,82,100].

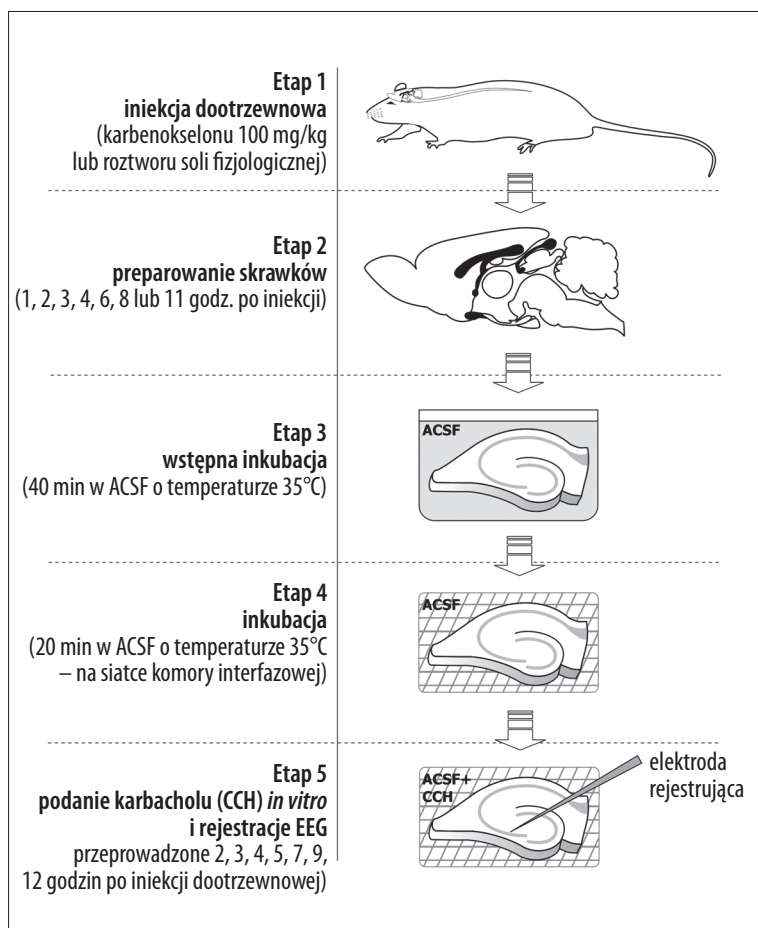
Aktywność polowa theta typu II, w odróżnieniu od theta I, charakteryzuje się nie tylko niższym, ale także węższym pasmem częstotliwości (4–7 Hz) (ryc. 4, górny panel). Ponadto, typ II theta oporny jest na działanie anestetyków, wrażliwy na iniekcje siarczanu atropiny oraz rejestrowany wyłącznie podczas akinezy [13,14,16,20,21,51,53,55,57,60,65,82,100]. Obecnie wiadomo, że w powstawaniu aktywności typu II, poza układem cholinergicznym, uczestniczy także układ GABA-ergiczny. Co więcej, dynamiczna równowaga między wymienionymi układami neurotransyjnymi warunkuje naprzemienne występowania w zapisie hipokampalnego EEG aktywności rytmicznej i wysoko amplitudowej aktywności zdesynchronizowanej (large irregular activity – LIA) [16,86].

ROLA SYNAPS ELEKTRYCZNYCH W POWSTAWANIU HIPOKAMPALNEGO RYTMU THETA

Badania *in vitro*

Do końca lat 90. ubiegłego wieku rola transmisji chemicznej w powstawaniu rytmu theta została stosunkowo dobrze udokumentowana. Doniesienia wskazujące na udział synaps elektrycznych w powstawaniu tego wzorca EEG pojawiły się dopiero na początku obecnego stulecia [41,58]. Wówczas to w badaniach dotyczących mechanizmów związanych z powstawaniem ośrodkowych zjawisk rytmicznych zaczęto stosować związki chemiczne (tzw. blokery i „otwieracze”) zmieniające właściwości elektrofizjologiczne synaps elektrycznych [74]. Cechą charakterystyczną blokerów jest znoszenie lub osłabianie transmisji elektrycznej, natomiast „otwieraczy” usprawnienie przekaźnictwa elektrycznego poprzez zwiększenie liczby synaps elektrycznych aktywnie uczestniczących w przekazywaniu pobudzenia między sąsiadującymi neuronami.

Wstępne dane wskazujące na udział GJ w powstawaniu aktywności oscylacyjnej theta pochodzą z badań prowadzonych na skrawkach formacji hipokampa [58]. Autorzy cytowanych badań wykazali, że dodanie do sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (ACSF) blokerów synaps elektrycznych (karbenoksolonu – KARB lub chininy – CHIN) znosi cholinergicznie wywołany rytm theta w obszarze CA3 hipokampa właściwego. Obserwowany efekt rozwijał się stopniowo prowadząc po upływie 40–45 min do zaniku rytmu theta oraz towarzyszącej mu aktywności komórkowej. W innych badaniach, prowadzonych na modelu *in vivo*, po zastosowaniu KARB obserwowano zanik synchronizacji postsynaptycznych potencjałów hamujących (IPSPs) w polu CA3 [111] lub zniesienie aktywności epileptycznej rejestrowanej z obszaru CA1 hipokampa właściwego [81,98]. Warto podkreślić, że zanik aktywności epileptycznej z zapisu EEG następował, podobnie jak w badaniach Konopackiego i wsp. [58], z pewnym opóźnieniem. Choć mechanizm tego zjawiska nie został do końca wyjaśniony to sądzi się, że efekt odroczenia związany jest z oddziaływaniem blokera GJ na mechanizmy fosforylacji podjednostek koneksonowych, bądź ich agregacji [95].



Ryc. 5. Przebieg badań *ex vivo*, w trakcie których badano wpływ dootrzewnowych iniekcji karbenokselonu (blokeru synaps elektrycznych) na aktywność rytmiczną theta wywołaną w skrawkach formacji hipokampa

Brak rytmu theta w zapisie hipokampalnego EEG po zastosowaniu blokerów GJ stanowi bezpośredni dowód na aktywny udział hipokampalnych synaps elektrycznych w procesach synchronizacyjnych związanych z powstawaniem cholinergicznie indukowanej aktywności theta [58]. Co ciekawe, w opisywanych badaniach, mimo długotrwałego wypłukiwania z preparatów HPC zastosowanych blokerów, nie odnotowano powrotu aktywności polowej theta w zapisie EEG. Płukanie skrawków w ACSF niezawierającym blokerów pozwoliło jedynie na zarejestrowanie pojedynczych wyładowań epileptycznych. Efekt ten mógł być spowodowany szkodliwym wpływem karbenokselonu i chininy na sieć neuronalną hipokampalnych skrawków mózgowych [81]. Rejestracja aktywności epileptycznej w wypłukanych z blokerów skrawkach sugerowała jednak, że działanie zastosowanych związków ograniczone było prawdopodobnie jedynie do hamowania mechanizmów synchronizacyjnych [58].

Udział synaps elektrycznych w powstawaniu aktywności rytmicznej theta potwierdzony został również w badaniach prowadzonych na skrawkach mózgowych uzyskanych z innych struktur niż formacja hipokampa. Hughes i wsp. [44], stosując skrawki ciała kolankowatego bocznego po zastosowaniu KARB zaobserwowali obniżenie amplitudy rejestrowanego lokalnie rytmu pojawiającego się w odpowiedzi na aktywację metabotropowych receptorów glutaminergicznych. Z kolei Garner i wsp. [40] donosili o zaniku aktywności theta wywołanej kwasem kainowym w skrawkach uzyskanych z przyśrodkowej przegrody.

Badania *ex vivo*

Powszechność stosowania modeli *in vitro* w badaniach elektrofizjologicznych dotyczących aktywności oscylacyjnej ma swoje uzasadnienie. Technika skrawków mózgowych ma liczne zalety, z których najważniejsze to: szybka preparatyka, stosunkowo łatwa kontrola środowiska zewnątrzkomórkowego oraz bezpośrednia kontrola wzroku badanej tkanki [83]. Jednak ograniczony czas prowadzenia doświadczeń i brak impulsacji dochodzących z innych obszarów mózgowia, mających decydujące znaczenie dla ostatecznego stanu czynnościowego badanej struktury, stanowił punkt wyjścia do badań *ex vivo* oraz *in vivo*. Zastosowanie tych modeli pozwoliło na zweryfikowanie oraz uzupełnienie wiedzy pozyskanej z badań prowadzonych w warunkach pozaustrojowych. To właśnie ograniczony czas rejestracji aktywności polowej i komórkowej oraz procesy degeneracyjne zachodzące w skrawkach mózgowych podczas długotrwałych rejestracji mogły być w badaniach Konopackiego i wsp. [58] przyczyną braku możliwości ponownej rejestracji rytmu theta w preparatach HPC *in vitro*. Dlatego też, w celu ograniczenia ewentualnych procesów degeneracyjnych tkanki wpływających na rejestrowaną aktywność EEG, zaplanowano doświadczenia, w których skrawki hipokampalne preparowane były ze szczurów premedykowanych karbenokselonem [22]. W omawianych doświadczeniach dootrzewnowe iniekcje stosowanego blokeru GJ wykonywane były od 1. do 12. godz. przed przygotowaniem skrawków (ryc. 5). Opracowanie powyższej procedury doświadczalnej

możliwe było przede wszystkim dzięki doniesieniom wskazującym na możliwość przenikania KARB przez barierę krew-mózg [64,95,106].

Analiza uzyskanych w badaniach *ex vivo* danych wykazała, że skrawki formacji hipokampa pobrane od zwierząt, u których preparatyka wykonywana była do 3. godz. po dootrzewnowych iniekcjach KARB w dalszym ciągu nie generowały rytmu theta. Jednak wydłużanie czasu między obwodowym podaniem blokeru a przygotowaniem preparatów w znaczący sposób zwiększało prawdopodobieństwo zarejestrowania aktywności połowej theta. W skrawkach uzyskanych od zwierząt premedykowanych KARB od 6. do 8. godz. przed ich przygotowaniem niemalże w połowie przypadków rejestrowano rytm theta. Całkowity powrót zdolności generowania rytmu theta przez skrawki obserwowany był po maksymalnym (12. godz.) odroczeniu procedury przygotowania preparatów [22]. Zatem uzyskane przez Bocian i wsp. [22] wyniki wykazały, że działanie KARB jest długotrwałe i w pełni odwracalne. Co więcej potwierdziły, że brak rejestracji theta w badaniach Konopackiego i wsp. [58] nie był związany z uszkodzeniem hipokampalnej sieci neuronalnej, lecz ograniczonym czasem rejestracji w procedurze *in vitro*.

Przedstawione do tej pory wyniki badań prowadzonych w warunkach pozaustrojowych oraz na modelu *ex vivo* dostarczyły niezbitych dowodów na istotną rolę hipokampalnych synaps elektrycznych w mechanizmach synchronizacyjnych związanych z powstawaniem lokalnie rejestrowanej aktywności rytmicznej. Ponadto wykazały, że sprawne przekazywanie chemiczne jest niewystarczające do zapewnienia optymalnego poziomu synchronizacji w sieciach neuronalnych [22,58].

Badania *in vivo*

Jak wspomniano wcześniej wyniki badań *in vitro*, prowadzonych na skrawkach odizolowanych od wpływów impulsacji biegnących z innych obszarów mózgowia, wymagają weryfikacji w modelach doświadczalnych wykorzystujących anestetyzowane lub swobodnie poruszające się zwierzęta. Pierwszą pracą, w której podjęta została próba określenia roli GJ w generowaniu hipokampalnego rytmu theta w warunkach *in vivo* była publikacja Blanda i wsp. [15]. Wykorzystując swobodnie poruszające się szczury autorzy cytowanych badań podawali zwierzętom anestetyczne dawki halotanu do HPC. Związek ten, podobnie jak karbenoksolon i chinina, blokuje GJ [42,107,110] oraz zgodnie z doniesieniami Nishikawy i McIvera [70] wzmaga, odbywające się za pośrednictwem receptorów $GABA_A$ -ergicznym, hamowanie synaptyczne w intereuronach obszaru CA1 hipokampa właściwego. Uwzględniając wcześniejsze doniesienia o aktywnym udziale układu GABA-ergicznego w powstawaniu theta typu II [86] oraz zdolność halotanu do osłabiania transmisji elektrycznej, uzyskane przez Blanda i wsp. [15] wyniki były dość zaskakujące. Okazało się, że iniekcje anestetycznych dawek halotanu nie miały wpływu na rytm theta typu II. Co więcej, dawki niższe niż anestetyczne (0,5–1,0%) indukowały nie tylko rytm typu II o podwyższonej amplitudzie i mocy, ale także ruchowo zależny rytm typu I.

Weryfikacji prowadzonych przez Blanda i wsp. [15] badań podjęli się kilka lat później Gołębiowski i wsp. [41] oraz

Bocian i wsp. [22] wykorzystując swobodnie poruszające się koty i anestetyzowane szczury. Zamiast halotanu w obu doświadczeniach użyto karbenoksolonu i chininy. Choć w badaniach elektrofizjologicznych poświęconych roli GJ w ośrodkowych mechanizmach oscylacyjnych, wspomniane blokery używane są powszechnie do iniekcji domózgowych, to stosunkowo rzadko podawano je obwodowo. Przyczyn tego zjawiska należy upatrywać w tym, że nieswoiste objawy towarzyszące obwodowym iniekcjom blokerów GJ mogą maskować ich działanie ośrodkowe. Ponadto zmiana aktywności położonych poza OUN połączeń szczylinowych może prowadzić do zaburzeń fizjologicznych mogących mieć charakter letalny [28,80].

Mimo zagrożeń związanych z dootrzewnowym podaniem KARB i CHIN Gołębiowski i wsp. [41] zdecydowali się zbadać wpływ obwodowych iniekcji tych związków na hipokampalny rytm theta rejestrowany u swobodnie poruszających się kotów. Dootrzewnowe iniekcje obu blokerów znosiły rytm theta z zapisu hipokampalnego EEG [41]. Uzyskane wyniki porównane zostały następnie z danymi pochodzącymi z doświadczeń, w których wykonywano dohipokampalne iniekcje obu blokerów [41]. Iniekcje lokalne, w przeciwieństwie do obwodowych, prowadziły jedynie do obniżenia amplitudy i mocy badanej aktywności. Zaobserwowane różnice w stopniu blokowania były najprawdopodobniej spowodowane zasięgiem oddziaływania podanych blokerów. W przypadku domózgowych iniekcji, farmakologiczne działanie obu związków ograniczało się prawdopodobnie jedynie do obszaru znajdującego się w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca iniekcji. Natomiast pokonujące barierę krew-mózg blokery wpływały na aktywność wielu struktur związanych z powstawaniem rytmu theta [16,21]. Co ciekawe, Gołębiowski i wsp. [41] donosili, że obserwowane po iniekcjach KARB lub CHIN hamowanie lub tłumienie, rozwijało się stopniowo i podobnie jak w badaniach *in vitro* [58] następowało z pewnym opóźnieniem. Warto nadmienić, że obserwowane po iniekcjach blokerów GJ zmiany dotyczyły jedynie amplitudy i mocy hipokampalnego rytmu theta [41]. Badania prowadzone na swobodnie poruszających się kociach po raz pierwszy wskazywały na udział synaps elektrycznych w powstawaniu aktywności rytmicznej theta rejestrowanej w warunkach *in vivo*.

O istotnym znaczeniu niskooporowych połączeń szczylinowych w generowaniu hipokampalnego rytmu theta świadczą również badania przeprowadzone na anestetyzowanym szczurze [22]. Jest to jedyny model doświadczalny umożliwiający rejestrację odpornej na działanie anestetyków i wrażliwej na iniekcje siarczanu atropiny aktywności theta typu II. Największą zaletą badań prowadzonych na anestetyzowanych szczurach jest możliwość precyzyjnego monitorowania poziomu anestezji przez dożylną podanie uretanu. Podawany do żyły jarmzowej anestetyk pozwala regulować głębokość snu zwierząt i utrzymywać go na poziomie umożliwiającym naprzemienne rejestrowanie w zapisie EEG rytmu theta i aktywności zdesynchronizowanej (LIA), bez konieczności stosowania dodatkowych bodźców czuciowych (np. szczypania w ogon czy drażnienia wibrysów). W badaniach prowadzonych na szczurach poddanych narkozie uretanowej Bocian i wsp. [23] testowali kolejno wpływ dootrzewnowych oraz dohipokampalnych iniekcji KARB. Po obwodowym podaniu karbenoksolonu,

w dawkach 100–300 mg/kg m.c., nie obserwowano zmian w zapisie hipokampalnego EEG. Zwiększenie dawki do 400 mg/kg m.c. także nie miało wpływu na zapis hipokampalnego EEG. Jednak godzinę po dootrzewnowych iniekcjach tak wysokiej dawki blokera, obserwowano niewydolność krążeniowo-oddechową prowadzącą do śmierci zwierzęcia [22]. W celu wyeliminowania efektu letalnego wykonano domózgowe iniekcje KARB. Dohipokampalne iniekcje blokera GJ znosiły u anestetyzowanych szczurów rytm theta z rejestrowanego lokalnie zapisu EEG. Co ciekawe, hamujący wpływ iniekcji KARB ograniczał się jedynie do zmian w amplitudzie i mocy rytmu oraz ujawnił się podobnie jak we wszystkich omówionych wcześniej badaniach z półgodzinnym opóźnieniem [41,58]. Wydaje się zatem, że powyższy wzór odroczenia działania KARB jest zjawiskiem typowym i może być obserwowany w różnych warunkach doświadczalnych.

W trakcie omawiania wyników badań, w których stosowano KARB nie sposób pominąć, że związek ten jest także agonistą receptorów mineralokortykoidowych [67] i antagonistą receptorów glutaminergicznych typu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) [29,73]. Obecność obu typów receptorów w HPC wykazano we wcześniejszych badaniach [45,76,102]. Na podstawie dostępnych w literaturze danych wydaje się, że obserwowany w badaniach Bocian i wsp. [23] efekt nie jest związany z interakcją KARB z którymkolwiek ze wspomnianych wcześniej receptorów. Przypuszczenie to opiera się m.in. na wynikach doświadczeń prowadzonych przez Rossa i wsp. [81] oraz Bostanciego i Bağiricioğlu [24]. Autorzy tych badań obserwowali hamujący wpływ karbenoksolonu na aktywność erupcyjną hipokampalnych neuronów, w obecności antagonisty receptorów mineralokortykoidowych – spiroloktanu. Jednak aktywacja receptorów mineralokortykoidowych wzmacniała aktywność hipokampalnych neuronów [67] oraz podatność na epilepsję indukowaną pentyletetrazolem i kwasem kainowym [45,78]. Wyniki te są sprzeczne nie tylko z uzyskanymi przez Bocian i wsp. [23] wynikami, ale także rezultatami innych badań [41,58]. Z kolei Pitkänen i wsp. [75] wykazali, że dootrzewnowe iniekcje D-cykloseryny (antagonisty receptorów NMDA) zwiększały moc rytmu theta typu II, a obserwowany efekt antagonizowany był przez niekompetetywnego agonistę tych receptorów – MK-81.

W świetle przedstawionych danych pojawia się pytanie: czy obserwowany w badaniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach efekt dohipokampalnych iniekcji KARB pojawia się na skutek blokowania połączeń szczelinowych, czy też aktywacji receptorów NMDA? Odpowiedź na postawione pytanie przyniosły opublikowane w 2007 r. badania Blanda i wsp. [17]. Autorzy tych badań wykazali, że dohipokampalne iniekcje NMDA indukowały lokalnie rytm theta, a obserwowany efekt był znoszony przez AP5 – niekompetetywnego antagonistę receptorów NMDA. Co ciekawe, wywołana iniekcjami NMDA aktywność theta nie znikła po dootrzewnowych iniekcjach antagonisty receptorów muskarynowych – siarczanu atropiny. Brak wpływu iniekcji atropiny na wywołany iniekcjami NMDA rytm świadczy o istnieniu u szczurów nowego rodzaju aktywności rytmicznej theta, mającego odmienne podłoże neurochemiczne niż powszechnie znane typy theta (typ I i II). Wydaje się zatem, że wyniki badań Blanda i wsp. [17] dają

podstawę do wnioskowania, że obserwowane w badaniach Bocian i wsp. [23] blokujące działanie karbenoksolonu na rejestrowany w warunkach głębokiej anestezji rytm theta typu II, nie jest związane z oddziaływaniem na receptory glutaminergiczne.

W badaniach prowadzonych na szczurach poddanych narcozie uretanowej dokonywano także dohipokampalnych iniekcji chininy – selektywnego blokera synaps elektrycznych zawierających w swoim składzie koneksynę Cx36 [23]. W formacji hipokampa izoforma Cx36 występuje wyłącznie w GABA-ergicznych interneuronach [43,111] zlokalizowanych w obszarach silnie związanych z generowaniem rytmu theta, tj.: polu CA1, CA3 hipokampa właściwego i zakręcie zębatym [25,53,54,56,59]. Dohipokampalne iniekcje chininy powodowały jedynie tłumienie rytmu theta, a nie jego blokowanie, jak to się działo w doświadczeniach z nieselektywnym blokerem GJ – karbenoksolonem [23]. Choć kierunek zmian w obu przypadkach był podobny, to istniała różnica w dynamice obserwowanej odpowiedzi. Przejawiające się obniżeniem amplitudy i mocy hipokampalnego rytmu theta tłumienie, po zastosowaniu chininy związane było najprawdopodobniej z odmiennym zakresem działania, w porównaniu z karbenoksolonem. Chinina jako selektywny bloker GJ ma potencjalnie mniejszy zasięg oddziaływania na synapsy elektryczne niż mniej selektywny karbenoksolon. Karbenoksolon jako nieswoisty bloker GJ wpływa na wszystkie hipokampalne połączenia szczelinowe. Wskutek zablokowania transmisji elektrycznej w HPC dochodzi do stopniowej desynchronizacji aktywności neuronów oraz zmniejszenia liczby komórek generujących aktywnie rytmiczne oscylacje potencjału błonowego (rhythmic membrane potential oscillations – MPOs) [18]. Zanik aktywności neuronów generujących MPOs prowadzi do zaniku rytmicznego potencjału połowego – rytmu theta [19,52,57]. Natomiast ograniczone do koneksyny Cx36, działanie chininy ma mniejszy wpływ na rytm theta, a widoczna różnica przekłada się na stopień hamowania badanego wzorca EEG. Zamiast blokowania obserwowane jest jedynie zmniejszenie amplitudy i mocy badanego wzorca EEG [23].

Wpływ blokerów koneksyny Cx36 na aktywność rytmiczną obserwowany był również w innych doświadczeniach [1,12,41]. Gołębiewski i wsp. [41], w badaniach prowadzonych na kotach, obserwowali blokujące lub tłumiące działanie chininy, w zależności od sposobu podania blokera (iniekcje dootrzewnowe vs. dohipokampalne). Podobnie Bissiere'a i wsp. [12] donosili o zaniku hipokampalnego rytmu theta u nienarkotyzowanych szczurów, po dootrzewnowych iniekcjach innego selektywnego blokera Cx36 – meflochiny. Na udział koneksyny Cx36 w powstawaniu oscylacji theta wskazują również najnowsze badania Allena i wsp. [1] prowadzone na myszach pozbawionych genu kodującego koneksynę Cx36. Warto podkreślić, że problemem do dziś nierozwiązanym jest mechanizm blokowania GJ przez chininę czy meflochinę.

W badaniach *in vivo* dotyczących ośrodkowych mechanizmów oscylacyjnych i synchronizacyjnych, poza karbenoksolonem i chininą, stosowana była także trimetyloamina (TMA) tzw. „otwieracz” synaps elektrycznych. Najogólniej działanie farmakologiczne tego związku sprowadza się do usprawnienia transmisji elektrycznej

w sieciach neuronalnych. Wpływ TMA na ośrodkową aktywność oscylacyjną badany był w różnych układach doświadczalnych [23,37,49,74,91,95]. Wykazano, że TMA wydłużała czas trwania napadów epileptycznych, zwiększała stopień synchronizacji w aktywnych ogniskach epileptycznych [36,74] oraz indukowała napady epileptyczne w korze [37] i skrawkach hipokampalnych [49]. Antagonistyczne działanie TMA w stosunku do karbenoksolonu i chininy wykazano także w badaniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach. Domózgowe iniekcje „otwieracza” GJ u uretanizowanych szczurów wywoływały w HPC dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie i mocy [23]. Co ciekawe, iniekcje TMA nie miały wpływu na częstotliwość badanego wzorca. Obserwowany w badaniach *in vivo* efekt był krótkotrwały (ograniczony do 3 godz.) i w pełni odwracalny. Wydaje się zatem, że mechanizm działania „otwieracza” synaps elektrycznych jest inny niż opisanych wyżej blokerów. Wyniki wcześniejszych badań wydają się potwierdzać tę sugestię, wskazując na możliwość oddziaływania TMA poprzez zmiany pH środowiska wewnątrzkomórkowego [38,47,94]. Widoczny po zastosowaniu TMA wzrost częstotliwości hipokampalnego rytmu gamma tłumaczony był wzrostem sprawności lokalnych synaps elektrycznych pojawiającym się w odpowiedzi na zmiany wewnątrzkomórkowego pH [38,94]. Jednocześnie wykazano, że obniżenie pH prowadzi do zamknięcia koneksonu Cx43 na skutek oddziaływania końca karboksylowego koneksyny z fragmentem białka tworzącego światło półkanału [32,66]. Zważywszy na dane wskazujące na alkalizację środowiska wewnątrzkomórkowego po zastosowaniu TMA [89,109] wydaje się, że usprawnienie transmisji elektrycznej jest wynikiem otwarcia GJs na skutek destabilizacji połączenia utworzonego między końcem karboksylowym koneksyny i fragmentem białka tworzącego światło koneksonu [66]. Nie udało się jednak ustalić, czy działanie TMA jest ograniczone do koneksyny Cx36 [69], czy też jako nieselektywny „otwieracz” TMA działa także na koneksynę Cx43 [36].

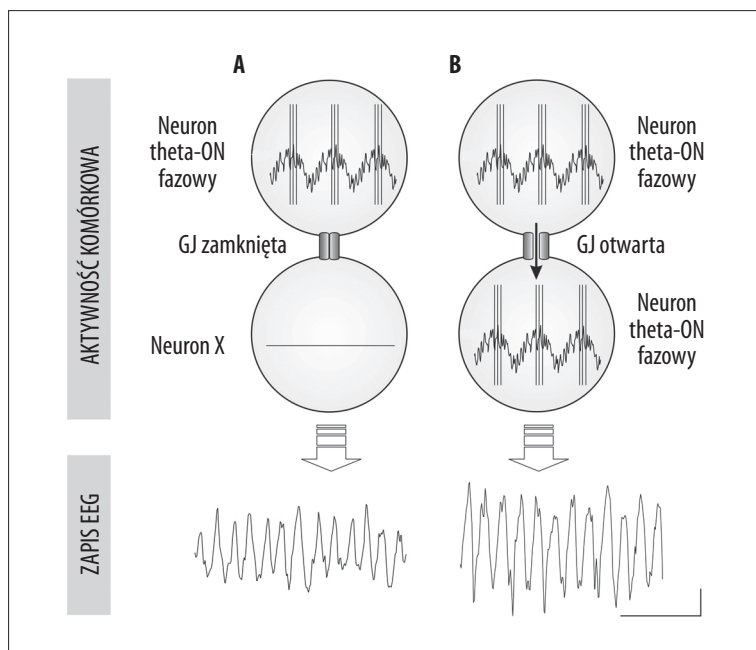
W niedawnych badaniach *in vivo* [23] podjęto także próbę wyjaśnienia mechanizmu neuronalnego odpowiedzialnego za zwiększenie amplitudy hipokampalnego rytmu theta po iniekcjach TMA. W sformułowaniu hipotezy tłumaczącej ten mechanizm miały pomóc badania, podczas których prowadzono równoległe rejestracje polowego EEG oraz aktywności hipokampalnych neuronów. Liczne badania elektrofizjologiczne wykazały, że polowa aktywność theta jest skorelowana z aktywnością określonej populacji komórek nerwowych tzw. neuronów związanych z rytmem theta (theta-related cells) [19,30,39,52,71,92,104]. Na podstawie różnic w generowaniu potencjałów czynnościowych w czasie jednocześnie rejestrowanej aktywności polowej theta wyodrębniono dwa typy tych komórek: neurony theta-ON oraz theta-OFF (ryc. 4) [30]. Cechą charakterystyczną neuronów theta-ON jest brak aktywności podczas desynchronizacji (LIA) oraz wzmożone generowanie potencjałów czynnościowych w czasie rytmu theta (ryc. 4). Dodatkowo, w oparciu o wzór wyładowań obserwowany w czasie rytmu, wyodrębniono dwa podtypy komórek theta-ON. Pierwszy podtyp stanowią komórki toniczne, zwiększające liczbę generowanych w sposób nieregularny potencjałów czynnościowych podczas aktywności rytmicznej (ryc. 4). Drugą, neurony fazowe, które podobnie jak neurony toniczne zwiększają liczbę generowanych

potencjałów w czasie rejestrowanego polowo rytmu, lecz w przeciwieństwie do nich wyładowują w sposób rytmiczny i zgodny z fazą lokalnie rejestrowanej aktywności theta (ryc. 4). Neurony fazowe i toniczne obserwowane są także wśród nieaktywnych podczas rytmu i włączających w czasie LIA, neuronów theta-OFF (ryc. 4) [30].

Uzyskane w badaniach prowadzonych na anestetyzowanych szczurach wyniki wykazały, że aktywność komórek związanych z rytmem theta jest wrażliwa na manipulacje chemiczne [23]. Dohipokampalne iniekcje TMA wywoływały u anestetyzowanych szczurów dobrze zsynchronizowany rytm theta o podwyższonej amplitudzie, któremu towarzyszył wzrost liczby fazowych neuronów theta-ON. Ponadto TMA zwiększała liczbę generowanych w salwach potencjałów czynnościowych pojawiających się zgodnie z fazą lokalnie rejestrowanego rytmu theta. Powyższe wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi na udział fazowych neuronów theta-ON w kontrolowaniu amplitudy omawianego wzorca EEG [2,19,39,92,104]. Badania wewnątrzkomórkowe, aktywnych podczas rytmu theta neuronów fazowych pokazały, że potencjał błonowy tych komórek był niestabilny i ulegał rytmicznym oscylacjom (MPOs) [19,39,52,71,92,104]. Co ciekawe, obserwowane zmiany potencjału, nazywane także wewnątrzkomórkowym rytmem theta [19,52], skorelowane były z fazą rejestrowanej zewnętrznie aktywności rytmicznej i zanikały z chwilą pojawienia się w zapisie EEG aktywności zdesynchronizowanej [19,52]. Warto podkreślić, że wieloletnie badania elektrofizjologiczne potwierdziły ścisły związek MPOs z amplitudą rejestrowanego polowo theta [2,19,39,92,104]. Obecnie wiadomo, że amplituda aktywności polowej theta jest funkcją liczby rytmicznie wyładowujących neuronów theta-ON fazowych. Innymi słowy amplituda rejestrowanego polowo rytmu theta jest tym większa im większa liczba neuronów fazowych theta-ON jest aktywna w danej chwili. Pojawia się pytanie: w jaki sposób iniekcje TMA zwiększają liczbę fazowych neuronów theta-ON w hipokampalnej sieci neuronalnej anestetyzowanych zwierząt?

Wydaje się, że usprawnienie transmisji elektrycznej pojawiające się w następstwie otwarcia GJs umożliwia przekazanie, generowanego przez neurony theta-ON fazowe, rytmicznego wzorca wyładowań na sąsiadujące z tym typem neuronów komórki (ryc. 6). Najprawdopodobniej komórki tworzące synapsę elektryczną z neuronem fazowym, zmieniają wzór wyładowań po iniekcjach TMA, tzn. zaczynają generować potencjały czynnościowe zgodnie z fazą polowo rejestrowanej aktywności theta. Opisane zmiany prowadzą do zwiększenia liczby rytmicznie wyładowujących neuronów theta-ON wywołując tym samym wzrost amplitudy rytmu theta. Zwiększenie amplitudy obserwowane jest tak długo, jak długo utrzymuje się farmakologiczne działanie zastosowanego w badaniach związku.

Dohipokampalne iniekcje TMA u anestetyzowanych szczurów, poza zwiększeniem liczby neuronów fazowych theta-ON, obniżały także liczbę aktywnych podczas LIA komórek theta-OFF [23]. Okazało się, że rejestrowane po podaniu TMA epizody rytmu theta miały nie tylko wyższą amplitudę, ale również dłuższy czas trwania, w porównaniu z epizodami rejestrowanymi w warunkach kontrolnych. Spadek liczby neuronów theta-OFF wynikał zatem z obniżonego prawdopodobieństwa rejestracji wspomnianego



Ryc. 6. Model wyjaśniający rolę synaps elektrycznych (GJs), w obserwowanej po iniekcjach trimetyloaminy (TMA), wzroście amplitudy hipokampalnego rytmu theta. (A) – charakteryzujący się rytmicznym wzorcem wyładowań oraz oscylacjami potencjału błonowego (MPOs) neuronu fazy theta-ON w niepoddanej iniekcjom TMA sieci neuronalnej nie jest w stanie przekazać rytmicznego wzorca wyładowań na neuron X z powodu zamknięcia GJ. (B) – iniekcje TMA usprawniając przewodnictwo typu elektrycznego (przez otwarcie GJ) ułatwiają przekazywanie rytmicznego wzorca wyładowań z sąsiadującą z neuronem fazy theta-ON komórką. Zwiększona liczba wykazujących wewnętrzkomórkowe wahania potencjału błonowego neuronów theta-ON fazy wywołuje potencjał połowy (rytm theta) o wyższej amplitudzie. Kalibracja: 1 s/200 μ V

typu komórek podczas wydłużonego czasu trwania aktywności rytmicznej.

Podsumowując, wyniki uzyskane w badaniach prowadzonych na szczurach poddanych narkozie uretanowej [23] wskazują, że obserwowany w neuronach związanych z rytmem theta wzór wyładowań nie jest ostatecznie określony i może ulec zmianie po zastosowaniu związków chemicznych modulujących aktywność GJ. Co ciekawe, na możliwość zmiany aktywności neuronów związanych z rytmem theta wskazali także kilka lat wcześniej Bland i wsp. [19]. Autorzy tych badań obserwowali zmianę wzorca wyładowań neuronów związanych z rytmem theta w następstwie depolaryzacji i hiperpolaryzacji błony komórkowej [19].

Na zakończenie warto zwrócić uwagę na różnice w dynamice zmian podstawowych parametrów hipokampalnego rytmu theta po lokalnych iniekcjach blokerów GJ oraz trimetyloaminy w badaniach *in vivo*. Podczas gdy amplituda i moc aktywności rytmicznej theta malały w czasie rozwijania się działania blokującego lub hamującego po iniekcjach karbeneksolonu lub chininy, częstotliwość rytmu nie ulegała zmianom [22,41]. Również w badaniach z zastosowaniem „otwieracza” nie obserwowano zmian w częstotliwości rytmu theta [23]. Taki przebieg zmian parametrów rytmu theta po dohipokampalnych iniekcjach związków modulujących aktywność GJ świadczy o niezależnej kontroli amplitudy i mocy oraz częstotliwości badanego wzorca EEG. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami *in vivo*. Pierwsze dane wskazujące na odrębne programowanie poszczególnych parametrów aktywności theta pojawiły się na początku lat 90. ub.w. [48,72,93]. Wówczas

wykazano, że za kodowanie amplitudy i mocy rytmu theta odpowiada formacja hipokampa i obszar przyśrodkowej przegrody, które stanowią ostatnie ogniwa wstępującego układu synchronizującego, odpowiedzialnego za powstawanie hipokampalnej aktywności oscylacyjnej w HPC [20]. Nic więc dziwnego, że dohipokampalne iniekcje związków modulujących aktywność GJ prowadziły wyłącznie do zmian amplitudy i mocy rytmu, pozostając bez wpływu na częstotliwość omawianego wzorca EEG. Kwestia kodowania częstotliwości hipokampalnego rytmu theta, mimo licznych prób określenia substratu neuronalnego odpowiedzialnego za programowanie tego parametru, pozostaje wciąż nierozwiązana i wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań, prowadzonych na różnych modelach doświadczalnych, wskazują na istotną rolę transmisji elektrycznej w powstawaniu oscylacji o różnej częstotliwości. Wprawdzie praca poświęcona została aktywności rytmicznej theta, ale podczas omawiania wyników licznych badań wykazany został także udział połączeń szczelinowych w powstawaniu rytmu gamma, aktywności epileptycznej oraz szybkich oscylacji. Co więcej, przedstawione dane sugerują, że synapsy elektryczne stanowią alternatywny do przewodnictwa chemicznego sposób komunikowania się neuronów w strukturach związanych z powstawaniem aktywności rytmicznej. Mimo że oba typy przewodnictwa (elektryczny i chemiczny) wzajemnie się uzupełniają, to wydaje się, że sprawna transmisja chemiczna jest niewystarczająca do zapewnienia optymalnego poziomu synchronizacji w sieciach neuronalnych.

PIŚMIENNICTWO

[1] Allen K., Fuchs E.C., Jaschonek H., Bannerman D.M., Monyer H.: Gap junctions between interneurons are required for normal spatial coding in the hippocampus and short-term spatial memory. *J. Neurosci.*, 2011; 31: 6542–6552

[2] Artemenko D.P.: Participation of hippocampal neurons in the generation of theta-waves. *Neurofizjologija*, 1972; 4: 531–539

[3] Azoulay L., Cajal S.: Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux chez l'homme et chez les vertébrés. Reinwald C. & Cie., Éditeurs Libraires, Paris, 1894

- [4] Baker R., Llinás R.: Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *J. Physiol.*, 1971; 212: 45–63
- [5] Baude A., Bleasdale C., Dalezios Y., Somogyi P., Klausberger T.: Immunoreactivity for the GABAA receptor alpha subunit, somatostatin and Connexin36 distinguishes axoaxonic, basket, and bistratified interneurons of the rat hippocampus. *Cereb. Cortex*, 2007; 17: 2094–2107
- [6] Beheshti S., Sayyah M., Golkar M., Sepehri H., Babaie J., Vaziri B.: Changes in hippocampal connexin 36 mRNA and protein levels during epileptogenesis in the kindling model of epilepsy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2010; 34: 510–515
- [7] Bennett M.V.: Electrical transmission: a functional analysis and comparison to chemical transmission. W: *The Handbook of Physiology. The Nervous System. Part I.* red. Kandel E.R., American Physiological Society. Washington, 1977; 357–416
- [8] Bennett M.V., Barrio L.C., Bargiello T.A., Spray D.C., Hertzberg E., Sáez J.C.: Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*, 1991; 6: 305–320
- [9] Bennett M.V., Crain S.M., Grundfest H.: Electrophysiology of supra-medullary neurons in Spheroides maculatus. I. Orthodromic and antidromic responses. *J. Gen. Physiol.*, 1959; 43: 159–188
- [10] Bennett M.V., Crain S.M., Grundfest H.: Electrophysiology of supra-medullary neurons in Spheroides maculatus. II. Properties of the electrically excitable membrane. *J. Gen. Physiol.*, 1959; 43: 189–219
- [11] Beyer E.C., Paul D.L., Goodenough D.A.: Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.*, 1987; 105: 2621–2629
- [12] Bissiere S., Zelikowsky M., Ponnusamy R., Jacobs N.S., Blair H.T., Fanselow M.S.: Electrical synapses control hippocampal contributions to fear learning and memory. *Science*, 2011; 331: 87–91
- [13] Bland B.H.: Medial septum: Node of the Ascending Brainstem Hippocampal Synchronizing Pathway. W: *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region.* red.: Numer R., Springer Verlag, New York, 2000; 115–145
- [14] Bland B.H.: The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.*, 1986; 26: 1–54
- [15] Bland B.H., Bland C.E., Colom L.V., Roth S.H., DeClerk S., Dypvik A., Bird J., Deliyannides A.: Effect of halothane on type 2 immobility-related hippocampal theta field activity and theta on/theta off cell discharges. *Hippocampus*, 2003; 13: 38–47
- [16] Bland B.H., Colom L.V.: Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.*, 1993; 41: 157–208
- [17] Bland B.H., Declerck S., Jackson J., Glasgow S., Oddie S.: Septohippocampal properties of N-methyl-D-aspartate-induced theta-band oscillation and synchrony. *Synapse*, 2007; 61: 185–197
- [18] Bland B.H., Konopacki J., Dyck R.: Heterogeneity among hippocampal pyramidal neurons revealed by their relation to theta-band oscillation and synchrony. *Exp. Neurol.*, 2005; 195: 458–474
- [19] Bland B.H., Konopacki J., Dyck R.H.: Relationship between membrane potential oscillations and rhythmic discharges in identified hippocampal theta-related cells. *J. Neurophysiol.*, 2002; 88: 3046–3066
- [20] Bland B.H., Oddie S.D.: Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 259–273
- [21] Bland B.H., Oddie S.D.: Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav. Brain Res.*, 2001; 127: 119–136
- [22] Bocian R., Postuszny A., Kowalczyk T., Gołębiewski H., Konopacki J.: The effect of carbenoxolone on hippocampal formation theta rhythm in rats: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Brain Res. Bull.*, 2009; 78: 290–298
- [23] Bocian R., Postuszny A., Kowalczyk T., Kaźmierska P., Konopacki J.: Gap junction modulation of hippocampal formation theta and local cell discharges in anesthetized rats. *Eur. J. Neurosci.*, 2011; 33: 471–481
- [24] Bostanci M.Ö., Bağirici F.: Anticonvulsive effects of carbenoxolone on penicillin-induced epileptiform activity: An *in vivo* study. *Neuropharmacology*, 2007; 52: 362–367
- [25] Buzsáki G.: Electroanatomy of the hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat. W: *Electrical activity of the archicortex.* red.: Buzsáki G., Vanderwolf C.H., Akademiai Kiado, Budapest, 1985; 143–164
- [26] Cajal S.: Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trimest. Histol. Norm. Patol.*, 1888; 1: 1–10
- [27] Carlen P.L., Skinner F., Zhang L., Naus C., Kushnir M., Perez-Velazquez J.L.: The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2000; 32: 235–241
- [28] Cascio W.E., Yang H., Muller-Borer B.J., Johnson T.A.: Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *J. Electrocardiol.*, 2005; 38(4 Suppl.): 55–59
- [29] Chepkova A.N., Sergeeva O.A., Haas H.L.: Carbenoxolone impairs LTP and blocks NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology*, 2008; 55: 139–147
- [30] Colom L.V., Bland B.H.: State-dependent spike train dynamics of hippocampal formation neurons: evidence for theta-on and theta-off cells. *Brain Res.*, 1987; 422: 277–286
- [31] Draguhn A., Traub R.D., Schmitz D., Jefferys G.R.: Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus *in vitro*. *Nature*, 1998; 394: 189–192
- [32] Duffy H.S., Sorgen P.L., Girvin M.E., O'Donnell P., Coombs W., Taffet S.M., Delmar M., Spray D.C.: pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 36706–36714
- [33] Evans W.H., Martin P.E.: Lighting up gap junction channels in a flash. *Bioessays*, 2002; 24: 876–880
- [34] Falk M.M., Buehler L.K., Kumar N.M., Gilula N.B.: Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.*, 1997; 16: 2703–2716
- [35] Furshpan E.J., Furukawa T.: Intracellular and extracellular responses of the several regions of the Mauthner cell of the goldfish. *J. Neurophysiol.*, 1962; 25: 732–771
- [36] Gajda Z., Gyengési E., Hermesz E., Ali K.S., Szente M.: Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats *in vivo*. *Epilepsia*, 2003; 44: 1596–1600
- [37] Gajda Z., Hermesz E., Gyengési E., Szupera Z., Szente M.: The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats. *Epilepsia*, 2006; 47: 1009–1022
- [38] Galarreta M., Hestrin S.: A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, 1999; 402: 72–75
- [39] García-Muñoz A., Barrio L.C., Buño V.: Membrane potential oscillations in CA1 hippocampal pyramidal neurons *in vitro*: intrinsic rhythms and fluctuations entrained by sinusoidal injected current. *Exp. Brain Res.*, 1993; 97: 325–333
- [40] Garner H.L., Whittington M.A., Henderson Z.: Induction by kainate of theta frequency rhythmic activity in the rat medial septum-diagonal band complex *in vitro*. *J. Physiol.*, 2005; 564: 83–102
- [41] Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J.: Electrical coupling underlies theta rhythm in freely moving cats. *Eur. J. Neurosci.*, 2006; 24: 1759–1770
- [42] He D.S., Burt J.M.: Mechanism and selectivity of the effects of halothane on gap junction channel function. *Circ. Res.*, 2000; 86: E104–E109
- [43] Hjorth J., Blackwell K.T., Kotaleski J.H.: Gap junctions between striatal fast-spiking interneurons regulate spiking activity and synchronization as a function of cortical activity. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 5276–5286
- [44] Hughes S.W., Lörincz M., Cope D.W., Blethyn K.L., Kékesi K.A., Parri H.R., Juhász G., Crunelli V.: Synchronized oscillations at alpha and theta frequencies in the lateral geniculate nucleus. *Neuron*, 2004; 42: 253–268
- [45] Joels M., de Kloet E.R.: Mineralocorticoid receptor-mediated changes in membrane properties of rat CA1 pyramidal neurons *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 4495–4498
- [46] Juszczak G.R., Świergiel A.H.: Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2009; 33: 181–198
- [47] Kelly T., Church J.: The weak bases NH(3) and trimethylamine inhibit the medium and slow afterhyperpolarizations in rat CA1 pyramidal neurons. *Pflugers Arch.*, 2005; 451: 418–427
- [48] Kirk I.J., McNaughton N.: Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmic slow activity. *Hippocampus*, 1993; 3: 517–525
- [49] Köhling R., Gladwell S.J., Bracci E., Vreugdenhil M., Jefferys J.G.: Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg²⁺ in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. *Neuroscience*, 2001; 105: 579–587
- [50] Konopacki J.: Development of oscillatory activity in the limbic cortex *in vitro*. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1996; 56: 407–421

- [51] Konopacki J.: Theta-like activity in the limbic cortex *in vitro*. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 311–323
- [52] Konopacki J., Bland B.H., Colom L.V., Oddie S.D.: *In vivo* intracellular correlates of hippocampal formation theta-on and theta-off cells. *Brain Res.*, 1992; 586: 247–255
- [53] Konopacki J., Bland B.H., MacIver M.B., Roth S.H.: Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators. *Brain Res.*, 1987; 436: 217–222
- [54] Konopacki J., Bland B.H., Roth S.H.: Carbachol-induced EEG “theta” in hippocampal formation slices: evidence for a third generator of theta in CA3c area. *Brain Res.*, 1988; 451: 33–42
- [55] Konopacki J., Bland B.H., Roth S.H.: Evidence that activation of *in vitro* hippocampal θ rhythm only involves muscarinic receptors. *Brain Res.*, 1988; 455: 110–114
- [56] Konopacki J., Bland B.H., Roth S.H.: The development of carbachol-induced EEG ‘theta’ examined in hippocampal formation slices. *Brain Res.*, 1988; 466: 229–232
- [57] Konopacki J., Gołbiewski H., Eckersdorf B., Kowalczyk T., Bocian R.: *In vitro* recorded theta-like activity in the limbic cortex: comparison with spontaneous theta and epileptiform discharges. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2000; 60: 67–85
- [58] Konopacki J., Kowalczyk T., Gołbiewski H.: Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res.*, 2004; 1019: 270–274
- [59] Kowalczyk T., Gołbiewski H., Konopacki J.: Is the dentate gyrus an independent generator of *in vitro* recorded theta rhythm? *Brain Res. Bull.*, 2009; 80: 139–146
- [60] Kramis R., Vanderwolf C.H., Bland B.H.: Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp. Neurol.*, 1975; 49: 58–85
- [61] Kumar N.M., Gilula N.B.: Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.*, 1986; 103: 767–776
- [62] Llinás R., Baker R., Sotelo C.: Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J. Neurophysiol.*, 1974; 37: 560–571
- [63] Loewi O.: The chemical transmission of nerve action. W: Nobel lectures. *Physiology or medicine, 1922–1941*. Elsevier, Amsterdam, 1965; 416–429
- [64] Mikov M., Kevresan S., Kuhajda K., Jakovljevic V., Vasovic V.: $3\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy-12-oxo- 5β -cholanoate as blood-brain barrier permeator. *Pol. J. Pharmacol.*, 2004; 56: 367–371
- [65] Miller R.: Discovery and general behavioral correlates of the hippocampal theta rhythm. W: *Cortico-hippocampal interplay and the representation of contexts in the brain*. red.: Braitenberg V., Barlow H. B., Bullock T.H., Florey E., Grüsser O.J., Peters A., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991; 60–97
- [66] Morley G.E., Taffet S.M., Delmar M.: Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.*, 1996; 70: 1294–1302
- [67] Murphy D., Costall B., Smythe J.W.: Regulation of hippocampal theta activity by corticosterone: Opposing functions of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Brain Res. Bull.*, 1998; 45: 631–635
- [68] Nagy J.I., Dudek F.E., Rash J.E.: Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2004; 47: 191–215
- [69] Nassiri-Asl M., Zamansoltani F., Zangivand A.A.: The inhibitory effect of trimethylamine on the anticonvulsant activities of quinine in the pentylenetetrazole model in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2008; 32: 1496–1500
- [70] Nishikawa K., MacIver M.B.: Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology*, 2000; 92: 228–236
- [71] Núñez A., García-Austt E., Buno W. Jr.: Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res.*, 1987; 416: 289–300
- [72] Oddie S.D., Bland B.H., Colom L.V., Vertes R.P.: The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*, 1994; 4: 454–473
- [73] Papatheodoropoulos C.: NMDA receptor-dependent high-frequency network oscillations (100–300 Hz) in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, 2007; 414: 197–202
- [74] Perez-Velazquez J.L., Valiante T.A., Carlen P.L.: Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J. Neurosci.*, 1994; 14: 4308–4317
- [75] Pitkänen M., Sirviö J., Ylinen A., Koivisto E., Riekkinen P.Sr.: Effects of NMDA receptor modulation on hippocampal type 2 theta activity in rats. *Gen. Pharmacol.*, 1995; 26: 1065–1070
- [76] Rao A., Kim E., Sheng M., Craig A.M.: Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 1217–1229
- [77] Rash J.E., Yasumura T., Dudek F.E.: Ultrastructure, histological distribution, and freeze-fracture immunocytochemistry of gap junctions in rat brain and spinal cord. *Cell Biol. Int.*, 1998; 22: 731–749
- [78] Roberts A.J., Keith L.D.: Mineralocorticoid receptors mediate the enhancing effects of corticosterone on convulsion susceptibility in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994; 270: 505–511
- [79] Robertson J.D.: The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. Cell Biol.*, 1963; 19: 201–202
- [80] Rodriguez-Sinovas A., Garcia-Dorado D., Ruiz-Meana M., Soler-Soler J.: Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J. Physiol.*, 2004; 559: 245–257
- [81] Ross F.M., Gwyn P., Spanswick D., Davies S.N.: Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience*, 2000; 100: 789–796
- [82] Sainsbury R.S.: Hippocampal theta: a sensory-inhibition theory of function. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1998; 22: 237–241
- [83] Schwartzkroin P.A.: To slice or not to slice. W: *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*, red.: Kerkut G.A., Wheal H.V. Academic Press, London, 1981; 143–164
- [84] Segretain D., Falk M.M.: Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1662: 3–21
- [85] Sherrington C.S.: *The integrative action of the nervous system*. Yale University Press, 1906
- [86] Smythe J.W., Colom L.V., Bland B.H.: The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1992; 16: 289–308
- [87] Sotelo C., Llinás R., Baker R.: Structural study of inferior olivary nucleus of the cat: morphological correlates of electrotonic coupling. *J. Neurophysiol.*, 1974; 37: 541–559
- [88] Sotelo C., Llinás R.: Specialized membrane junctions between neurons in the vertebrate cerebellar cortex. *J. Cell Biol.*, 1972; 53: 271–289
- [89] Spray D.C., Harris A.L., Bennett M.V.: Comparison of pH and calcium dependence of gap junctional conductance. *Kroc. Found. Ser.*, 1981; 15: 445–461
- [90] Stauffer K.A.: The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 6768–6772
- [91] Stenkamp K., Palva J.M., Uusisaari M., Schuchmann S., Schmitz D., Heinemann U., Kaila K.: Enhanced temporal stability of cholinergic hippocampal gamma oscillations following respiratory alkalosis *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, 2001; 85: 2063–2069
- [92] Strata F.: Intrinsic oscillations in CA3 hippocampal pyramids: physiological relevance to theta rhythm generation. *Hippocampus*, 1998; 8: 666–679
- [93] Thinschmidt J.S., Kinney G.G., Kocsis B.: The supramammillary nucleus: is it necessary for the mediation of hippocampal theta rhythm? *Neuroscience*, 1995; 67: 301–312
- [94] Traub R.D., Bibbig A., Fisahn A., LeBeau F.E., Whittington M.A., Buhl E.H.: A model of gamma frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 4093–4106
- [95] Traub R.D., Draguhn A., Whittington M.A., Baldeweg T., Bibbig A., Buhl E.H., Schmitz D.: Axonal gap junctions between principal neurons: A novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Rev. Neurosci.*, 2002; 13: 1–30
- [96] Traub R.D., Kopell N., Bibbig A., Buhl E.H., LeBeau F.E.N., Whittington M.A.: Gap junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 9478–9486

- [97] Traub R.D., Whittington M.A., Buhl E.H., LeBeau F.E., Bibbig A., Boyd S., Cross H., Baldeweg T.: A possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. *Epilepsia*, 2001; 42: 153–170
- [98] Uusisaari M., Smirnov S., Voipio J., Kaila K.: Spontaneous epileptiform activity mediated by GABA_A receptors and gap junctions in the rat hippocampal slice following long-term exposure to GABA_B antagonists. *Neuropharmacology*, 2002; 43: 563–572
- [99] Vanderwolf C.H.: Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1969; 26: 407–418
- [100] Vanderwolf C.H.: Neocortical and hippocampal activation in relation to behavior: effects of atropine, eserine, phenothiazines, and amphetamine. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 1975; 88: 300–323
- [101] Vanderwolf C.H., Robinson T.E.: Reticulo-cortical activity and behavior: a critique of the arousal theory and the new synthesis. *Behav. Brain Res.*, 1981; 4: 459–514
- [102] Washbourne P., Liu X.B., Jones E.G., McAllister A.K.: Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 8253–8264
- [103] Watanabe A.: The interaction of electrical activity among neurons of lobster cardiac ganglion. *Jpn. J. Physiol.*, 1958; 8: 305–318
- [104] Watanabe H., Aihara T., Tsukada M.: Phase shift of subthreshold theta oscillation in hippocampal CA1 pyramidal cell membrane by excitatory synaptic input. *Neuroscience*, 2006; 140: 1189–1199
- [105] Weickert S., Ray A., Zoidl G., Dermietzel R.: Expression of neural connexins and pannexin1 in the hippocampus and inferior olive: a quantitative approach. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2005; 133: 102–109
- [106] Welberg L.A., Seckl J.R., Holmes M.C.: Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 1047–1054
- [107] Wentlandt K., Samoilova M., Carlen P.L., El Beheiry H.: General anesthetics inhibit gap junction communication in cultured organotypic hippocampal slices. *Anesth. Analg.*, 2006; 102: 1692–1698
- [108] Wishaw I.Q., Vanderwolf C.H.: Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav. Biol.*, 1973; 8: 461–484
- [109] Willoughby D., Thomas R., Schwiening C.: The effects of intracellular pH changes on resting cytosolic calcium in voltage-clamped snail neurones. *J. Physiol.*, 2001; 530: 405–416
- [110] Winlow W., Spencer G.E., Syed N.I., Qazzaz M.M.: Modulation of reconstructed peptidergic synapses and electrical synapses by general anaesthetics. *Toxicol. Lett.*, 1998; 100–101: 77–84
- [111] Yang Q., Michelson H.B.: Gap junctions synchronize the firing of inhibitory interneurons in guinea pig hippocampus. *Brain Res.*, 2001; 907: 139–143

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.