

Streszczenie pracy doktorskiej pt. „Characteristics of neurons in the nucleus incertus of the rat – electrophysiological studies in vivo.”:

Jądro niepewne (ang. nucleus incertus, NI) jest niewielką bilateralną strukturą pnia mózgu, zlokalizowaną poniżej IV komory mózgu wzdłuż linii przyśrodkowej nakrywki. NI zawiera głównie neurony GABAergiczne oraz mniejszą frakcję neuronów glutamatergicznych. Wcześniejsze badania sklasyfikowały te komórki na trzy typy ze względu na częstotliwość generowania potencjałów czynnościowych. NI unerwia wiele jąder w przodomózgowiu, śródmózgowiu i mózdzku. Subpopulacja neuronów NI zawierająca neuropeptyd, relaksynę-3 (ang. relaxin-3, RLN3) jest źródłem układu relaksynergicznego zaangażowanego w odpowiedź stresową oraz behawioralną aktywację organizmu. Wykazano, że jądro niepewne jest jednym z kluczowych elementów wstępującego układu synchronizującego hipokamp, który odgrywa ważną rolę w generowaniu rytmu theta.

Rytm theta to zjawisko oscylacyjne charakteryzujące się częstotliwością w zakresie od 3 – 12 Hz, które można zaobserwować na poziomie lokalnego potencjału polowego, wzorca generowania potencjałów czynnościowych oraz zmian potencjału błonowego neuronów. Aktywność sieci hipokampalnej leżącej u podstaw oscylacji theta odgrywa ważną rolę w wielu procesach, tj. nawigacja w przestrzeni, formowanie pamięci czy generowanie różnych stanów behawioralnych. Badania pokazały, że aktywacja NI wpływa na hipokampalne oscylacje theta. Jądro niepewne samo jest częścią sieci pracującej w częstotliwości theta. Jednakże, charakterystyka elektrofizjologiczna neuronów jądra niepewnego oraz udział NI w mechanizmie generowania rytmu theta pozostają niejasne.

Celem moich badań było określenie właściwości elektrofizjologicznych neuronów jądra niepewnego w odniesieniu do hipokampalnych oscylacji theta oraz określenie interakcji pomiędzy NI a jądrem przyśrodkowym przegrody (ang. medial septum, MS), które jest głównym stymulatorem rytmu theta.

Aby osiągnąć ten cel wykorzystano różne techniki elektrofizjologiczne (rejestracje z wykorzystaniem macierzy wielokanałowych, technika rejestracji w konfiguracji juxtacellular, stymulacje optogenetyczne) i anatomiczne (znakowanie szlaków neuronalnych, barwienia immunohistochemiczne). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Sprague-Dawley. Eksperymenty in vivo przeprowadzano pod wpływem głębokiej anestezji uretanowej, która wywołuje spontaniczne, cykliczne zmiany stanu mózgowia: aktywację oraz aktywność wolnofalową, charakteryzujące się kolejno dominacją fal theta i delta.

Aktywność neuronów NI rejestrowano zewnątrzkomórkowo przy użyciu wielokanałowego systemu do rejestracji. Bazując na generowaniu potencjałów czynnościowych w odniesieniu do fazy oscylacji theta zidentyfikowano dwie populacje neuronów NI: niezależną od fazy rytmu theta (61%, 135/220) oraz związaną z fazą oscylacji theta (39%, 85/220). Pierwszą grupę można podzielić na neurony regularne o wysokiej częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych i komórki nieregularne o niższej aktywności. W obrębie drugiej grupy zaobserwowano liczne komórki generujące paczki (ang. bursts) potencjałów czynnościowych w rytmie theta (66%, 56/85). Ich lokalizacja jest ograniczona do lateralnej części struktury, zwanej częścią rozproszoną jądra niepewnego. Wszystkie neurony o aktywności związanej z fazą rytmu theta wykazują silną preferencję do generowania potencjałów czynnościowych na fazie wstępującej oscylacji theta rejestrowanej z warstwy stratum lacunosum moleculare pola CA1 hipokampa.

Eksperymenty z optogenetyczną stymulacją jądra przyśrodkowego przegrody wykazały, że wszystkie neurony generujące paczki potencjałów czynnościowych w rytmie theta otrzymują wejścia z MS i reagują w jednolity sposób z początkowym przyhamowaniem, po którym następuje zwiększenie częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych. Wyniki te wskazują na silny wpływ sygnału wejściowego z MS na tę grupę neuronów. Tylko część pozostałych neuronów o aktywności związanej z fazą rytmu theta (50%) oraz neuronów o nieregularnej aktywności niezwiązanej z fazą rytmu theta (39%) reagowała na stymulację jądra przyśrodkowego przegrody, a ich odpowiedzi były niejednorodne (hamowanie lub pobudzenie). Jednocześnie żaden z neuronów o szybkiej regularnej aktywności niezależnej od fazy rytmu theta nie reagował na stymulację MS. Co ciekawe, tylko neurony o regularnym, szybkim wzorcu aktywności niezwiązanym z fazą oscylacji theta zostały zidentyfikowane jako komórki unerwiające jądro przyśrodkowe przegrody. Wskazuje to, na udział tej populacji neuronów NI w jednokierunkowym przesyłaniu informacji do MS. Znakowanie szlaków neuronalnych pokazało, że neurony jądra niepewnego unerwiające MS to głównie komórki zawierające relaksynę-3, a ich aksony są silnie rozgałęzione tworząc niespecyficzny system unerwiający liczne obszary mózgu. Eksperymenty z wykorzystaniem techniki rejestracji w konfiguracji juxtacellular potwierdziły największy odsetek neuronów zawierających relaksynę-3 wśród neuronów o regularnej aktywności niezależnej od fazy rytmu theta.

Dogłębna charakterystyka neuronów NI, przedstawiona w niniejszej rozprawie, ujawniła obecność dwóch elektrofizjologicznie, anatomicznie i funkcjonalnie odrębnych subpopulacji komórek różniących się kierunkiem komunikacji z układem septohipokampalnym. Wyniki te rzuciły nowe światło na rolę jądra niepewnego, pokazując, że

może ono zawierać osobne populacje neuronalne odpowiedzialne odpowiednio za generowanie i synchronizację hipokampalnych oscylacji theta.

~~Akceptuję~~
~~Tomasz Błażek~~

Aleksandra Trenk

Abstract: „Characteristics of neurons in the nucleus incertus of the rat – electrophysiological studies in vivo.”

The nucleus incertus (NI) is a small bilateral brainstem structure located just below the IV ventricle, along the midline of the tegmentum. NI contains mostly GABAergic neurons and a smaller fraction of glutamatergic neurons. Previous studies classified these cells into three types basing on the firing rate. NI innervates many nuclei in the forebrain, midbrain and hindbrain. A subpopulation of NI neurons containing neuropeptide relaxin-3 (RLN3) gives rise to the relaxinergic system involved in stress response and behavioural activation of the animal. It has also been shown that NI is one of the key nuclei of the ascending brainstem hippocampal synchronizing system, which plays an important role in theta rhythm generation.

Theta rhythm is an oscillatory phenomenon characterised by the frequency of 3 – 12 Hz observable at the level of the local field potential, the pattern of neuronal firing and the membrane potential of neurons. The hippocampal network activity underlying the theta oscillations plays an important role in many functions, such as navigation in space, memory formation or the generation of different behavioural states. Several experiments have shown that activation of NI affects the hippocampal theta oscillations. Nucleus incertus itself is a part of a network working at theta frequency. However, the electrophysiological characteristics of the nucleus incertus neurons and the involvement of NI in the mechanism of theta rhythm generation and synchronization are unclear.

Therefore, the goal of my research was to determine electrophysiological properties of the nucleus incertus neurons in relation to the hippocampal theta oscillations and to determine the interaction between NI and the medial septum (MS), which is the pacemaker of theta rhythm.

To accomplish this, various electrophysiological (recordings with multielectrode arrays, juxtacellular recording-labelling technique, optogenetics) and anatomical (tract-tracing, immunohistochemistry) techniques have been used. All experiments have been performed on male Sprague-Dawley rats. The in vivo electrophysiological experiments were performed under deep urethane anaesthesia which induces spontaneous, cyclical alternations of brain state: activation and slow-wave activity (SWA), characterized by the dominance of the hippocampal theta and delta waves respectively.

The neuronal activity of NI neurons was recorded extracellularly using the multichannel recording system. Based on action potential firing in relation to the phase of theta oscillation, two subpopulations of NI neurons have been identified: theta phase-independent (61%,

135/220) and theta phase-locked (39%, 85/220). The first group could be further subdivided into regular, fast-firing and irregular, slow-firing neurons. Within the second group, numerous theta-bursting neurons (66%, 56/85) have been observed. Their localization is limited to the pars dissipata of the nucleus incertus. All theta phase-locked cells have a strong preference to fire action potentials at the rising phase of the hippocampal theta oscillation recorded from the stratum lacunosum moleculare of the CA1 field.

The optogenetic stimulation of medial septum revealed that all theta-bursting NI neurons receive input from MS and all react uniformly with initial inhibition followed by rebound excitation. This indicates that theta-bursting NI neurons are under strong control of MS originating input. Only a fraction of the non-bursting theta phase-locked (50%) and irregular, slow-firing theta phase-independent NI neurons (39%) responded to the MS stimulation, and their responses were heterogeneous (inhibition or excitation). At the same time, none of the regular, fast-firing theta phase-independent NI neurons responded to the medial septum stimulation. Interestingly, only regular, fast-firing theta phase-independent NI neurons, were optogenetically identified as projecting to MS. This indicates that this population of NI neurons is involved in the unidirectional transmission of information to MS. The tract-tracing studies have shown that neurons targeting medial septum are mostly relaxinergic and their axons are highly collateralized and form a widespread projection system innervating numerous brain regions. Experiments using juxtacellular recording-labelling technique have confirmed that the highest proportion of RLN3-positive neurons are the regular, fast-firing theta phase-independent NI neurons.

The in-depth characterization of NI neurons presented in this dissertation, has revealed the presence of two electrophysiologically, anatomically and functionally distinct subpopulations of cells, which also differ in the direction of communication with the septohippocampal system. These results shed new light on the role of NI, showing that it may contain separate neural populations responsible for generating and synchronizing hippocampal theta oscillations, respectively.

Accepted
1.
TOMASZ BEASAK

Alexandra Trenek