

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

A rövid távú hipoxia és hiperoxia hatása a patkány hippocampális idegsejtek morfológiájára és funkciójára

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Hencz Alexandra Júlia

Témavezető: Dr. Pál József

Társ-témavezető: Dr. Sík Attila

Programvezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra



Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Élettani Intézet
Pécs, 2024

I. Bevezetés

A fiziológias oxigénszinttől eltérő, hirtelen oxigénkoncentráció változások gyakran túlmutatnak a szervezet kompenzációs mechanizmusain. Az oxigén (O₂) szintjének csökkenése a szövetekben hipoxiás állapotot eredményez, amely számos neurológiai rendellenesség, mint például az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór patogenezisében is szerepet játszik [1, 2]. Az újszülöttkori hipoxia-iszkémia a csecsemőhalandóság 23%-áért felelős, illetve komoly kockázati tényező különösen a kognitív és tanulási problémák kialakulásában [3-5]. Az enyhe hipoxiás kezeléseknél ugyanakkor egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a rehabilitációs stratégiák kidolgozásánál. Másrészt a súlyos hipoxia okozta károk csökkentése érdekében gyakran alkalmaznak többletoxigént. A kiegészítő O₂ alkalmazása széles körben elterjedt és gyakran javasolt különösen a kritikus ellátás alatt állók számára. Az oxigénterápia életmentő lehet például hipoxiás-iszkémiás állapot létrejöttkor, valamint tüdőbetegeknél (pl. krónikus obstruktív tüdőbetegség) és koraszülötteknél [6-8]. A különböző oxigénterápiák előnyei és hátrányai azonban továbbra is vitatottak, mivel a hipoxia, illetve a szövetekben a magasabb oxigénszintet jelentő hiperoxia egyaránt súlyos oxidatív stresszhez vezethet.

A metabolikus folyamatok megváltozása különösen veszélyes az agyra, mivel bár az emberi agy a teljes testtömegnek csak töredékét teszi ki (2%), az agy az egyik legnagyobb energiafogyasztó szervünk, és emberben a teljes oxigén-anyagcsere körülbelül 20%-a itt történik [9, 10]. A becslések szerint az agyban termelt energia 75-80%-át a neuronok használják fel [10]. Ennélfogva az idegsejtjeink nagyon érzékenyen reagálnak az oxigén koncentrációjának megváltozására. A hippokampusz, amely a memória-, tanulási folyamatokban, valamint a kognitív folyamatokban is részt vesz, különösen érzékeny az O₂-homeosztázis felborulására [11]. A fiziológias koncentrációtól eltérő oxigénszintek jelentősen befolyásolhatják a hippokampális neuronok idegi aktivitását, ezáltal felelősek lehetnek a hosszú távú változásokért, elsősorban a tanulási és térbeli memória zavarokért. Ebből fakadóan kulcsfontosságú a rövid távú hipoxiás és hiperoxiás kondíciók hippokampális idegsejtekre kifejtett hatásának minél alaposabb megértése annak érdekében, hogy a klinikai gyakorlatban és a rehabilitáció során pontosabban meg lehessen határozni az oxigénellátás optimális alsó és felső határait és jobban egyénre lehessen szabni az oxigénterápiát.

II. Célkitűzés

A doktori kutatás a hippokampusz rövid távú hipoxiával és hiperoxiával szembeni sérülékenységének feltárására, illetve azok háttérében álló mechanizmusok tisztázására irányult, ezért munkánk során a következő célokat tűztük ki:

- Az akut, enyhe hipoxia (16% O₂) és az akut, enyhe (30% O₂), illetve súlyos (100% O₂) hiperoxia idegsejt károsító hatásának vizsgálata a hippokampusz különböző rétegeiben.
- A hipoxia, illetve a hiperoxia során károsodott idegsejtek sejtspecifikus azonosítása interneuron-specifikus markerek segítségével.
- Az alkalmazott oxigénkoncentrációk hálózati oszcillációkra gyakorolt hatásának meghatározása a hippokampuszban.
- Azonosítani azokat az idegsejt populációkat, amelyek a tüzelési frekvenciájuk alapján a leginkább érzékenyek a megváltozott O₂-koncentrációkra.

III. Anyag és módszer

1. Felhasznált állatok

A kísérletekhez 250-300 g tömegű hím Wistar patkányokat (n = 60) használtunk fel. Az állatok kísérletben történő felhasználása során minden esetben a magyar Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács által jóváhagyott irányelvek és protokollok (engedélyszám: BA/73/0052-5/2022), valamint az Európai Közösségek Tanácsának irányelvei (2010/63/EU) alapján jártunk el.

2. Oxigén kezelési eljárás

A kísérlet elején a patkányokat véletlenszerűen három csoportba osztottuk: kontroll csoport, hipoxia csoport és hiperoxia csoport. A hipoxia csoport esetén az alkalmazott O₂-koncentráció 16% volt, míg a hiperoxia csoportnál 30% és 100% O₂. A hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz az állatokat (n = 10/csoport) indukciós kamrába helyeztük és az oxigén expozíció 1 óra volt. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a patkányokat (hipoxia n = 10, hiperoxia n = 10) uretánnal (1,1-1,3 g/kg) altattuk. A műtétet követően az állatok először 21% O₂-t lélegeztek be, majd az alapvonal felvétele után megváltoztattuk az anesztetikus

maszkon keresztül a belélegzett gázkeverék O₂ koncentrációját. Az expozíciós idő 1 óra volt, melynek az utolsó 15 percében elektrofiziológiai felvételeket készítettünk. A kísérlet végén az állatok túlaltatása uretánnal (2 g/kg) történt.

3. Hisztokémia

Gallyas-ezüstözés

Ez a festési eljárás nagy szelektivitással festi meg a kompaktálódott idegsejtek szómáját és neuritjait. Az 50 µm vastagságú agyszeleteket dehidrációs lépések sorozatának (1-propanol, 1-1 perc) vetettük alá, majd 1% kénsavat tartalmazó 1-propanolban (észterezés) 56 ° C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A rehidráció után a mintákat 5 percig 1% -os ecetsavval kezeltük majd ezt követően a fizikai előhívó oldatban inkubáltuk. A reakciót 1%-os ecetsavval állítottuk le (5 perc).

Apoptózis kimutatása

A sejtmagok DNS-fragmentációjának kimutatására kétféle TUNEL tesztet is alkalmaztunk. Az egyik esetben a metszetek TdT reakció pufferrel inkubáltuk 10 percig, majd TdT reakciókóktállal 60 percig 37 °C-on. A PBS-es mosást követően Click-iT reakció pufferrel inkubáltuk a mintákat 30 percig. A másik kit esetében a fixált agyszeleteket permeabilizáló oldattal (0,2% Triton X-100; 0,1% nátrium-citrát) inkubáltuk 2 percig jégen. Ezután a mintákat TUNEL reakciókeverékkel inkubáltuk 60 percig 37 °C-on, sötétben.

4. Immunhisztokémia

Az interneuron alosztályok azonosítása céljából különböző interneuron markerekkel (parvalbumin, szomatosztatin, neuropeptid Y, calbindin, calretinin, kolecisztokinin) jelöltük az agyszeleteket. Ezeken a mintákon végeztük el később a fentebb ismertetett Gallyas-féle ezüstözést. Továbbá anti-kaspáz-3 antitestet használtunk az apoptózis detektálásához. A metszeteket 1% Triton X-100-at és 2% kecskeszérumot tartalmazó foszfátpufferben (0,1 M PBS, pH = 7,4) blokkoltuk 2 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatot (elsődleges antitest, 2% kecskeszérum, 1% Triton X-100) pipettáztunk a szeletekre és egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. A PBS-es mosást követően (3x5 perc) a másodlagos antitesteket PBS-ben oldva a mintára helyeztük. Az inkubációs idő 2 óra volt.

5. Altatás és műtét

A sebészeti beavatkozáshoz a patkányokat intraperitoniálisan beadott uretán injekcióval (1,1-1,3 g/kg) altattuk. Az anesztézia mélységét ellenőriztük, majd az állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük. Az elektrofiziológiai vizsgálatainkhoz az elektródák helyét a hisztokémiai eredményeink alapján jelöltük ki. Ez alapján egy csontfúróval 2 mm átmérőjű furatokat készítettünk a koponyacsonton az előzetesen meghatározott koordináták szerint a hippokampusz felett. Az elvezetéshez használt elektródatömböt (A4x8-5mm-200-400-703, NeuroNexus Technologies, Inc., USA) 2%-os DiI-oldatba mártottuk, majd az elektródát mikromanipulátor segítségével behelyeztük a megtervezett agyterületre. Az elektródát egy 128 csatornás TDT erősítő rendszerhez csatlakoztattuk (Tucker-Davis Technologies Inc, Florida, USA). Az elektrofiziológiai adatokat a LabChart virtuális eszköz segítségével digitalizáltuk (AD Instrument), majd számítógépen rögzítettük későbbi adatfeldolgozás céljából. Az oxigénkoncentráció monitorozását az agyban módosított Clark-típusú oxigén mikroelektródával (OX-10, Unisense A/S, Aarhus, Dánia) végeztük.

6. Elektrofiziológiai adatok feldolgozása

A nyers adatokat MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, USA) programmal dolgoztuk fel és elemeztük. A többsejt-aktivitás (multiunit activity-MUA) elemzéséhez a rögzítőszoftver automatikus klaszterező algoritmusát használtuk 500-5000 Hz-es sávszűréssel a tüzelési sebesség és a tüskék közötti intervallum (inter-spike interval-ISI) értékek kimutatására.

7. Statisztikai elemzés

A mérési eredmények statisztikai analízisét SPSS 28 program (SPSS Inc., Chicago, IL, US) segítségével végeztük. A normál eloszlás és a szóráshomogenitás feltételének teljesülése esetén két minta átlagának összehasonlításához páros t-próbát, illetve kettőnél több csoportnál varianciaanalízist (egyutas ANOVA) alkalmaztunk. Azoknál a populációknál, amelyeknél a normalitásra vonatkozó feltétel nem teljesült Friedman próbát végeztünk a nem független csoportok esetében, illetve Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk a független mintáknál. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük. Az adatokat átlag \pm SEM formában tüntettük fel.

IV. Eredmények és megbeszélés

1. Hipoxia és hiperoxia hatása a idegsejtek károsodására a hippocampusban

A hippocampusban kompaktálódott idegsejteket korábban már megfigyeltek például epilepszia, hiperglikémia esetén [12, 13]. Továbbá agyi iszkémia során sötét neuronok képződhetnek a hilusban és CA1 régióban [14-16]. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy enyhe (16% O₂) hipoxiás kezelést követően kompaktálódott neuronok alakultak ki a gyrus dentatuson belül a hilusban, valamint a szubgranuláris zónában. Továbbá, kompaktálódott idegsejteket figyeltünk meg a CA1 és CA3 régióban is. Az egészséges kontroll állatok többségében egyáltalán nem fordultak elő sötét neuronok. A CA1 területén a legtöbb sérült neuron a str. pyramidale-ban ($4,67 \pm 2,43$) alakult ki. A rövid idejű hipoxiás kezelés átlagosan a legtöbb kompaktálódott idegsejtet a CA3 régióban eredményezte. Ezen belül is a str. oriensben ($17,57 \pm 4,44$) és str. pyramidale-ban ($17,57 \pm 5,26$) volt a legmagasabb az ezüstöződött neuronok száma. Hasonló eredményekről számoltak be korábban Mahakizadeh és munkatársai (2020), akik sötét neuron képződést figyeltek meg a CA1 és a CA3 régiókban krónikus hipoxia során [17]. Az általunk alkalmazott festési eljárás (Gallyas-féle ezüstözés) szakirodalmi adatok alapján gyakorlatilag az ép neuronok struktúráit nem festi meg, ezáltal a hiperargirofilia gyors megjelenése röviddel a külső inicializálás után az érintett sejtek károsodását jelzi [12-14].

A hipoxiával szemben hiperoxia esetén tudomásunk szerint még nem számoltak be sötét neuronok képződéséről az agyban. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az enyhe (30% O₂) és súlyos (100% O₂) hiperoxia egyaránt előidézhetheti a kompaktálódott idegsejtek megjelenését a hippocampusban. Az utóbbi esetben azonban a sötét neuronok számának jelentős növekedését ($9,88 \pm 0,66$) lehetett megfigyelni a kontroll csoporthoz, illetve a 30%-os oxigénnel ($2,32 \pm 0,17$) kezelt csoporthoz képest. A sérült neuronok nagyobb számban a hilusban ($29,63 \pm 1,33$) jöttek létre. A CA1 területén sötét neuronokat figyeltünk meg a str. oriensben ($13,80 \pm 0,97$), a str. pyramidale-ban ($15,00 \pm 1,17$) és a str. radiatumban ($1,03 \pm 0,21$). A CA3 régióban a legtöbb kompaktálódott idegsejt a str. radiatumban ($10,43 \pm 0,96$) volt. A kísérletünkben alkalmazott 16%-os és 100%-os O₂ közel hasonló mennyiségű sötét idegsejt kialakulását idézte elő, míg a 30%-os O₂ expozíciónál jelentősen kevesebb volt. Feltételezhetőleg a reaktív oxigén és nitrogén származékok (ROS és RNS) megemelkedett szintje lényeges szerepet játszhatott a kompaktálódott idegsejtek számának alakulását tekintve.

Munkánk során az apoptózis kimutatására TUNEL próbát és kaspáz-3 jelölést végeztünk, azonban nem volt specifikus jelölődés az alkalmazott 1 órás normobár hipoxiás

(16% O₂), valamint hiperoxiás (30% és 100% O₂) kezelés után sem. Szakirodalmi adatok alapján a 30 perces normobár hipoxia (5% O₂) a kezeléstől számított 3. órától jelentős morfológiai változásokat okoz a CA3 régió sejtjeiben, míg a gyrus dentatusban lévő szemcsesejtek kisebb mértékben érintettek, miközben a CA1 régió neuronjai többnyire ellenállnak a félórás hipoxiás károsodásnak [18]. Továbbá az 1 órás 100%-os hiperoxiás kezelés az agykéregben pro-apoptotikus Bax és Bad fehérjék expressziójának fokozódását váltja ki [19]. Ezen ismeretek tükrében feltételezzük, hogy az általunk alkalmazott rövid idejű O₂ kezelések potenciálisan apoptózist indukálók lehetnek, azonban ennek tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

2. A károsodott idegsejtek immunhisztokémiai jellemzése

A kompaktálódott neuronok identifikálásához a mintákat előzetesen különböző interneuron markerekkel jelöltük. Az immunhisztokémiai festés során a calbindin (CB), calretinin (CR), a kolecisztokinin (CCK), a neuropeptid Y (NPY) és a parvalbumin (PV) pozitív gátlósejteket azonosítottunk, azonban a fluoreszcens jelölés nem mutatott átfedést az ezüstözött neuronokkal sem a hipoxiás, sem a hiperoxiás minták esetében. Ezzel szemben az enyhe hipoxiás kezelésnél szomatosztatin (SST) immunreaktív kompaktálódott neuronokat figyeltünk meg. Az 1 órás, 16%-os hipoxiát követően a sötét idegsejtek 23,57%-a szomatosztatin pozitív neuron volt. A SST pozitív idegsejtek a hiluson belül helyezkedtek el. A hippocampusz CA1 és CA3 régiói ugyanakkor nem tartalmaztak SST immunreaktív kompaktálódott idegsejteket. A hiperoxiás mintáknál egyik hippocampális régióban sem voltak jelen SST pozitív sötét neuronok.

A hippocampális régiók közötti tapasztalt különbségek hipotézisünk szerint elsősorban nem régiók közötti, hanem sejtípus-specifikus különbségekből adódhatnak. A hippocampális interneuronok morfológiájukban, immunreaktivitásukban, szinaptikus tulajdonságaikban, lamináris elhelyezkedésükben és kapcsolódásukban különböznek. Megfigyelték korábban, hogy a hilusban az interneuronok bizonyos szubpopulációja érzékeny Ca²⁺ által kiváltott túlzott gerjesztésre [20, 21]. Így valószínű, hogy hasonló mechanizmus okozza az enyhe akut hipoxia esetén SST interneuron károsodást a hilusban. A hippocampuszban található SST immunpozitív idegsejtek mindegyike GABAerg, valamint az összes gátló interneuron 14%-a SST pozitív [22, 23]. A gyrus dentatusban az SST immunpozitív neuronok túlnyomórészt a hilusban, azon belül is elsősorban a szubgranuláris zónában helyezkednek el [24]. A szubgranuláris zónában a SST neuronok fuziformis szómával rendelkeznek és dendritjeik

párhuzamosan futnak a str. granulosummal. Ezeket túlnyomórészt hiláris interneuronokként írják le perforáns pálya-asszociált axonterminálisokkal (HIPP) [24]. A HIPP sejtek a PV-t tartalmazó periszomatikus kosáresejteket célozzák meg és szabályozzák a kosáresejtelek aktivitását [25]. Így az SST immunreaktív neuronok számának csökkenése a gyrus dentatus serkentő szemcsesejtek aktivitásának csökkenéséhez vezethet.

3. Oxigénkoncentráció *in vivo* mérése a hippocampusban

A funkcionális vizsgálataink során az oxigén koncentrációját a hippocampusba ágyazott O₂-szenzorral mértük. A hipoxiás (16% O₂) kezelésnél az oxigén szöveti parciális nyomása (PtO₂) 20,1 Hgmm-ről 8,71 Hgmm-re csökkent, amely beleesik más tanulmányok által meghatározott hipoxiás küszöb tartományába. A hipoxiás küszöbre vonatkozóan bár nincs egyértelműen meghatározott „kritikus” PtO₂ a patkányagy esetén, azonban korábbi munkákban ezt az értéket 6-10 Hgmm közötti értékre becsülték [26, 27]. A 30% O₂-nél 42,4 Hgmm-re nőtt, valamint az oxigén koncentráció további, 100%-ra történő növelésével 79,04 Hgmm-re emelkedett, amely a fiziológiástól eltérő, magasabb oxigénszintet jelez a hippocampusban.

4. A hipoxia és hiperoxia hálózati oszcillációra gyakorolt hatása

A hipoxia (1 óra), valamint a hiperoxia (1 óra) hálózati oszcillációra kifejtett hatásának vizsgálatához a hippocampusz rétegeiből helyi térpotenciálokat (LFP) vezettünk el. A magasabb frekvenciájú alfa (8-12 Hz), béta (12-30 Hz) és gamma (30-100 Hz) hullám esetén nem találtunk szignifikáns eltérést a hipoxiás expozíciónál. Az alacsonyabb frekvenciatartományban (1-4 Hz) azonban megjelent egy 2,18 Hz körüli aktivitás, amelynek a csúcshullám frekvenciája az oxigén koncentráció változtatásával eltolódott. Az alapvonal felvételénél a csúcshullám frekvencia átlaga 2,18 Hz volt, amely a 16%-os O₂ koncentrációnál 2,28 Hz-re nőtt. Az eltérés a varianciánál és az azt követő post hoc teszt alapján szignifikáns ($p < 0,05$) volt. A lassú hullám spektrális teljesítményét is megvizsgáltuk, és azt találtuk hogy a teljesítményspektrum nőtt, de különbség nem volt szignifikáns a kontrollhoz képest. Eredményeinkkel összhangban mások is megfigyelték a delta hullám aktivitásának növekedését hipoxia, valamint iszkémiás hipoxia alatt [28-31]. A delta aktivitás növekedése a kérgi neuronok tartós hiperpolarizációját és gátlását jelentheti, amely az entorhinális kérgen keresztül befolyásolja a hippocampusz aktivitását [28, 29, 32-34]. Ez alapján feltételezzük, hogy az enyhe hipoxia hatására csökkent a neuronpopulációk aktivációs szintje, valamint a hipoxia neuronális aktivitásra gyakorolt hatása valószínűleg csak bizonyos neuronok vagy

neuronpopulációk aktivitását csökkentette vagy gátolta. A hiperoxiás csoportban a kontrollnál a hipoxiás kísérlethez hasonló módon, a delta frekvenciasávban megjelent egy jól elkülöníthető lassú aktivitás 2 Hz körül. A 30%-os O₂ koncentrációnál az alapvonalhoz képest (2,18 Hz) csúcsfrekvencia szignifikánsan csökkent 1,92 Hz-re ($p < 0,05$). Az O₂ szint további növelésével, a 100%-os O₂ expozíciónál a lassú oszcilláció szignifikánsan csökkent 1,72 Hz-re csökkent ($p < 0,001$). Az oxigénkezelés során a delta hullám teljesítménye csökkent, de szignifikáns különbség nem volt kimutatható a normobár és a hiperoxiás állapotok között. A szakirodalom alapján a delta aktivitás csökkenése összefüggésben áll a neuronok megnövekedett tüzelési sebességével [35]. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a hiperoxia feltehetőleg számos idegsejt tüzelési sebességét fokozta, amely viszont eltérő módon nyilvánult meg az egyes neuronok és neuronpopulációk esetében. A hipoxia és hiperoxia során csökkent véráramlás alakulhat ki [36], ebből adódóan az alacsonyabb frekvenciák felé eltolódásban a véráramlás sebességének változása szerepet játszhat. A neokortikális kisülések az entorhinális bemeneten keresztül befolyásolják a hippocampális hálózat aktivitását [33], ezáltal feltehetően változatos mintázatokat hoznak létre a hippocampális delta hullámokban a megváltozott O₂ koncentrációk mellett. A hipoxia és a hiperoxia alatti lassú hullám frekvenciájának változása feltételezhetően szoros összefüggésben van az oxigén másodlagos hatásaival, de ennek megértéséhez további vizsgálatokra lenne szükség.

5. Hippokampális idegsejtek tüzelési aktivitásának változása hipoxia és hiperoxia alatt

A neuronok elektromos aktivitásuk miatt nagyon nagy energiaigényűek, ezért a mitokondriális károsodások okozta energiahiány különösen jelentős szerepet játszik az idegsejtek károsodásában [37]. Elemzéseink során azt találtuk, hogy hipoxia hatására a piramissejtek tüzelési gyakorisága megnőtt a CA1 és CA3 régiókban ($p < 0,05$ és $p < 0,001$), ami összefüggésben áll a hippocampális piramissejtek depolarizációjával. A hipoxiás állapotok az ATP mennyiségének csökkenését, a citoplazma szabad kalciumszintjének emelkedését és az extracelluláris adenzin (az ATP lebomlásakor keletkezik) felhalmozódását idézik elő. Ez zavart okoz az ionegyensúlyban, ami az elektromos aktivitás korai leállításához és a serkentő szinaptikus potenciálok eltűnéséhez vezet [38]. Ismert, hogy az idegsejtek többsége érzékeny a hipoxiára, ugyanakkor a különböző idegsejt típusok reakciója eltérő lehet ugyanazon agyi régióon belül is [39-41]. A hipoxia következtében az idegsejtek ingerlékenysége csökken a CA1 régióban, ami valószínűleg a K_{ATP} csatornák erős expressziójával magyarázható a CA1 neuronokban, és az ingerlékenységet legalább részben szabályozza a feszültségfüggő

káliumcsatornák elérhetősége és feszültségfüggése [42-45]. Hipoxiás modellünkben a hilus interneuronjainál az elektromos aktiváció csökkenése volt tapasztalható a hipoxiás kezelés során ($p < 0,005$). A SST immunreaktív interneuronok a hilusban különösen érzékenyek az iszkémiára. A hipoxia preszinaptikus gátlást vált ki a gyrus dentatus interneuronoknál, amelyet részben a metabotróp glutamát receptorok aktiválása közvetít [46-48]. Munkánk során a feltételezett interneuronokat az ISI értékek és tüzelési frekvencia alapján két csoportra osztottuk (I-es és II-es típus). Megfigyeltük, hogy az I-es típusú interneuronok elektromos ingerlékenysége a CA3 régióban csökkent hipoxiában ($p > 0,005$). Korábbi vizsgálatok alapján a gátló szinapszisok különösen érzékenyek a hipoxiára, valamint a hipoxiás hiperpolarizáció gyakran jelentős a gátló interneuronok populációjában [48, 49]. Vizsgálatunkban a hipoxiás expozíciónál azonban CA3 interneuronok egy másik csoportjának (II-es típus) tüzelési aktivitásában növekedést figyeltük meg ($p < 0,001$).

A hiperoxiás csoportnál is hasonló eredményt kaptunk, vagyis a CA3-ban az I-es típusú interneuronok tüzelési aktivitása csökkent (30% O_2 $p < 0,05$ és 100% O_2 $p < 0,005$), míg a II-es típusú interneuronok elektromos ingerlékenysége nőtt a 30%-os O_2 koncentrációnál (30% O_2 $p < 0,001$). A piramissejtek esetében a tüzelési frekvencia a CA1 régióban 30%-os, illetve 100%-os hiperoxiás expozíciónál nőtt (30% O_2 $p < 0,05$ és 100% O_2 $p < 0,05$). A hiperoxia hatására a CA3-nál is hasonló változást tapasztaltunk a tüzelési aktivitásban (30% O_2 $p < 0,001$ és 100% O_2 $p < 0,001$). A hiperoxia esetén viszont a hilus neuronjainak tüzelési aktivitásáról eredményeink nincsenek, ugyanis az adatok nagy részét el kellett vetnünk az ISI értékek nagy szórása miatt. A hipoxiánál hasonló okok miatt a CA1 feltételezett interneuronjairól sem kerültek eredmények bemutatásra. A hiperoxia kapcsán korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a hiperbár hiperoxia rontja a neuronális ingerlékenységet, de ez elsősorban a sejtek légköri nyomásra való érzékenységének tudható be [50-53]. A CA1 régióban egyetlen tranziens hiperbár hiperoxiás inger növeli az idegsejtek ingerlékenységét, ezenfelül kimutatták, hogy a normobár hiperoxia is fokozza CA1 neuronok ingerlékenységét [51]. Az ioncsatornák jellemzőiben vagy a csatornák expressziójában bekövetkező változások befolyásolhatják a neuronális ingerlékenységet [54-58]. A magas oxigénszint növeli a ROS-ok mennyiségét a mitokondriumokban, különösen a mitokondriális légzési lánc I. komplexében, amely kifejezetten érzékeny a reaktív O_2 származékokra [59-61]. Továbbá az uretán érzéstelenítés megváltoztathatja a neurotranszmissziót [62, 63], ezáltal érzékenyebbé teheti a neuronokat a hipoxiára és a hiperoxiára adott válaszra. Feltételezzük, hogy a normobár 1 órás hipoxia (16% O_2) és hiperoxia (30% és 100% O_2) a hippokampuszban a serkentő és gátló egyensúly

eltolódását eredményezi a gerjesztés irányába, vagyis a gátló interneuronok alacsonyabb aktivációja a piramis sejtek szabályozásának csökkenéséhez vezethet.

V. Új tudományos eredmények összefoglalása

1. Gallyas-féle ezüstözési festési eljárást alkalmazva elsőként mutattunk ki enyhe, illetve súlyos hiperoxiás expozíciót követően ultrastrukturális változással járó idegsejt károsodást (kompaktálódott idegsejtek) a hippocampusban.
2. Kimutattuk, hogy a rövid idejű, 1 órás hipoxiás és hiperoxiás expozíció egyaránt kiválthatja idegsejtek kompaktálódását, amely károsodás a gyrus dentatus, CA1 és CA3 régióban egyaránt jelen van. Elemeztük a sérült idegsejtek sejtrétegek szerinti eloszlását és megállapítottuk, hogy enyhe hipoxia (16% O₂) következtében a hilus, illetve a CA3 str. oriens és str. pyramidale rétegében volt a legjelentősebb az idegsejt kompaktálódás. Ezzel szemben a legmagasabb számban károsodott idegsejtek az enyhe hiperoxia (30% O₂) során a CA3 str. radiatumban, míg a súlyos hiperoxia (100% O₂) esetében a hilusban képződtek.
3. A kompaktálódott idegsejtek azonosításához kombináltuk az ezüst impregnálást immunhisztokémiával és kimutattuk, hogy enyhe hipoxia során a hilusban kompaktálódott neuronok egy része szomatosztatin pozitív interneuron.
4. A delta frekvencia tartományban 2,2 Hz körüli csúcshékvenciát detektáltunk, amely hékvencia növekedett az akut, enyhe hipoxia során, míg az akut hiperoxiánál alacsonyabb (30% O₂) és magasabb (100% O₂) oxigén koncentráció esetén hékvencia csökkenés volt tapasztalható.
5. Kimutattuk, hogy a rövid távú hipoxiás (16% O₂) és hiperoxiás (30% és 100% O₂) expozíció a tüzelési hékvencia növekedését indukálja a piramis sejtéknél a CA1, illetve CA3 régióban, azonban hippocampus különböző rétegeiben az interneuronok tüzelési válasza heterogénebb képet mutat. Az interneuronok tüzelési tulajdonságaiban megfigyelt tendencia alapján az interneuronokat két csoportba (I-es és II-es) osztottuk. Ez alapján megállapítottuk, hogy a CA3 régióban az I-es típusú interneuronok tüzelési aktivitása csökkent mind hipoxia, mind hiperoxia során. Ugyanakkor a 100% O₂ expozíció kivételével a II-es típusú interneuronok tüzelési aktivitása nőtt. Mindemellert az enyhe hipoxia tüzelési aktivitás jelentős csökkenését indukálta a hilus interneuronjai esetében.

VI. Publikációs jegyzék

Összesített impakt faktor: 16,2

1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Hencz AJ, Magony A, Thomas C, Kovacs K, Szilagyi G, Pal J, Sik A. (2024). Short-term hyperoxia-induced functional and morphological changes in rat hippocampus. *Front Cell Neuroscience* 18: 1376577. [IF: 5,3]

Hencz A, Magony A, Thomas C, Kovacs K, Szilagyi G, Pal J, Sik A. (2023). Mild hypoxia-induced structural and functional changes of the hippocampal network. *Front Cell Neuroscience* 29:17: 1277375. [IF: 5,3]

2. Egyéb impakt faktoros publikációk

Hencz A, Szabó-Meleg E,¹, Dayo MY, Bilibani A, Barkó Sz, Nyitrai M, Szatmári D.(2022). The p53 and Calcium Regulated Actin Rearrangement in Model Cells. *Int J Mol Sci* (2022) 23(16): 9078. [IF: 5,6]

3. Egyéb publikációk

Hencz AJ; Somogyi P, Halász H; Szabó-Meleg E (2022). Visualization of the effect of TR100 anti-cancer compound on membrane nanotubes with SR-SIM microscopy. *Resolution and Discovery* 6: 12-19.

Hencz AJ, Szilagyi G, Gyorfí N, Tenzlinger K, Szechenyi A, Odry A, Odry P, Karadi Z, Vizvari Z, Toth A, Pal J. (2022). Grafén és indium-ón-oxid elektródák összehasonlítása alacsony frekvenciás elektromos impedancia spektroszkópia mérésekkel. In: Tóth A; Vizvári Z (szerk.) *Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris, bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserezabályozás és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet* pp. 115-123. Pécsi Tudományegyetem, Pécs.

Filotas N, Helt R, **Hencz AJ**, Tenzlinger K, Odry A, Odry P, Karadi Z, Vizvar Z, Toth A, Gyorfí N, Szechenyi A, Pal J. (2022). Bioimpedancia mérő plate fejlesztése hipoxiás és hiperoxiás állapotok vizsgálatára sejt kultúrákban. In: Tóth A; Vizvári Z (szerk.) *Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris, bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserezabályozás*

és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet pp. 104-114. Pécsi Tudományegyetem, Pécs.

4. Konferencia szereplések

Hencz AJ, Magony A, Szilagyi G, Pal J, Sik A (2024). The impact of hypoxia and hyperoxia on the number of compacted neurons and brain activity. International Neuroscience Conference (INC), Pécs.

Hencz AJ, Szilagyi G, Gyorfı N, Tenzlinger K, Szechenyi A, Odry A, Odry P, Karadi Z, Vizvari Z, Toth A, Pal J. (2021). Comparative electrical impedance spectroscopy study of graphene and indium tin oxide electrodes during low frequency measurements. IEEE 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI), pp. 000147-000152.

Filotas N, Helt R, **Hencz AJ**, Tenzlinger K, Odry A, Odry P, Karadi Z, Vizvar Z, Toth A, Gyorfı N, Szechenyi A, Pal J. (2021). Development of a Bioimpedance Measuring Plate for the Study of Hypoxic and Hyperoxic Conditions in Cell Cultures. Conference: 2021 IEEE 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI), pp. 153-158.

Gál AR, Tóth A, Vizvári Z, Kovács A, **Hencz A**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Kiss T, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. (2019). Nem alkoholos eredetű zsírmáj elıidézése és állatkísérletes vizsgálata új típusú diagnosztikai eljárás bevezetéséhez.

In: Hadjadj L, Lajtai K, Benkő R, Ruisanchez É, Sziva RE, Gerszi D, Péterffy B, Bányai B, Várbır Sz. Vaszkuláris diszfunkció és policisztás petefészek szindróma: D-vitamin hiány és tesztoszteron hatása a nagyerek acetilkolin-függő relaxációjára és a nitratív stresszre fiatal nıstény patkányokban. pp .166-167. Magyar Anatómus Társaság, Budapest.

Hencz A, Turmer K, Nyitrai M, Szabo-Meleg E. (2018). In vivo examination of membrane nanotubes in developing zebrafish embryos. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MEDPECS), Pécs.

Hencz A, Turmer K, Nyitrai M, Szabo-Meleg E. (2018). In vivo examination of membrane nanotubes in developing zebrafish embryos. Visegrád Group Society for Developmental Biology: Inaugural Meeting (V4SDB), Brno.

Hencz AJ, Somogyi P, Madarász T, Nyitrai M, Matkó J, Bugyi B, Gunning P, Szabó-Meleg E. (2018). A T100 rákellenes szer hatása a membrán nanocsövek kialakulására és morfológiájára Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg.

Hencz AJ, Nyitrai M, Bugyi B, Madarász T, Halász H, Türmer K, Gunning P, Matkó J, Szabó-Meleg E. (2017). A membrán nanocsövek kialakulásának és morfológiájának változása egy kis rákellenes molekula, a TR100 hatására. XV. PhD-Konferencia (PEME), Budapest.

Hencz AJ, Nyitrai M, Bugyi B, Madarász T, Halász H, Türmer K, Gunning P, Matkó J, Szabó-Meleg E. (2017). TR100 hatása a membrán nanocső hálózatokra. A Magyar Biofizikai Társaság XXVI. kongresszusa, Szeged.

Hencz A, Perneckner B, Boda R, Mauchart P, Móra A, Csabai Z.(2016). Seasonal and spatial differences in the trophic spectrum of Balkan Goldenring (*Cordulagaster heros* Theischinger, 1979) in the Mecsek Mountains, SW, Hungary. 2nd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research (CESAMIR), Pécs.

VII. Irodalomjegyzék

- [1] G. Aliev, M. A. Smith, J. C. de la Torre, and G. Perry, "Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease," *Mitochondrion*, Article; Proceedings Paper vol. 4, no. 5-6, pp. 649-663, Sep 2004, doi: 10.1016/j.mito.2004.07.018.
- [2] O. Hwang, "Role of oxidative stress in Parkinson's disease," *Experimental neurobiology*, vol. 22, no. 1, pp. 11-7, 2013 Mar (Epub 2013 Mar 2013), doi: 10.5607/en.2013.22.1.11.
- [3] D. M. Ferriero, "Neonatal brain injury," (in eng), *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 19, pp. 1985-1995, 2004, doi: 10.1056/NEJMra041996.
- [4] R. Galinsky *et al.*, "Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury," *Developmental Medicine and Child Neurology*, vol. 60, no. 2, pp. 126-133, Feb 2018, doi: 10.1111/dmcn.13629.
- [5] J. Grow and J. D. E. Barks, "Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts," (in eng), *Clinics in Perinatology*, vol. 29, no. 4, pp. 585-602, v, 2002, doi: 10.1016/s0095-5108(02)00059-3.
- [6] A. Kayton, P. Timoney, L. Vargo, and J. A. Perez, "A Review of Oxygen Physiology and Appropriate Management of Oxygen Levels in Premature Neonates," *Advances in Neonatal Care*, vol. 18, no. 2, pp. 98-104, 2020/08/28/04:44:44 2018, doi: 10.1097/ANC.0000000000000434.
- [7] V. Kim, J. O. Benditt, R. A. Wise, and A. Sharafkhaneh, "Oxygen therapy in chronic obstructive pulmonary disease," *Proc Am Thorac Soc.*, vol. 5, no. 4, pp. 513-518, 2008, doi: 10.1513/pats.200708-124ET.
- [8] E. Calzia *et al.*, "Hyperoxia may be beneficial," (in eng), *Critical Care Medicine*, vol. 38, no. 10 Suppl, pp. S559-568, 2010, doi: 10.1097/CCM.0b013e3181f1fe70.
- [9] D. Attwell, A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. MacVicar, and E. A. Newman, "Glial and neuronal control of brain blood flow," *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 232-243, Nov 2010, doi: 10.1038/nature09613.
- [10] F. Hyder, D. L. Rothman, and M. R. Bennett, "Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels,"

- Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, vol. 110, no. 9, pp. 3549-3554, 2013, doi: 10.1073/pnas.1214912110.
- [11] S. Biswal *et al.*, "Global hypoxia induced impairment in learning and spatial memory is associated with precocious hippocampal aging," *Neurobiology of learning and memory*, vol. 133, pp. 157-170, 2016, doi: 10.1016/j.nlm.2016.05.011.
- [12] P. Baracska, Z. Szepesi, G. Orbán, G. Juhász, and A. Czurkó, "Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat," *Brain Research*, vol. 1228, pp. 217-228, Sep 2008, doi: 10.1016/j.brainres.2008.06.044.
- [13] S. Ahmadpour, Y. Sadeghi, and H. Haghiri, "Streptozotocin-induced Hyperglycemia Produces Dark Neuron in CA3 Region of Hippocampus in Rats," *Asian Journal of Medical Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 11-15, 2010.
- [14] T. Kirino, "Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia," (in eng), *Brain Research*, vol. 239, no. 1, pp. 57-69, 1982, doi: 10.1016/0006-8993(82)90833-2.
- [15] A. Czurkó and H. Nishino, "'Collapsed' (argyrophilic, dark) neurons in rat model of transient focal cerebral ischemia," (in eng), *Neuroscience Letters*, vol. 162, no. 1-2, pp. 71-74, 1993, doi: 10.1016/0304-3940(93)90562-y.
- [16] M. Hsu, A. Sik, F. Gallyas, Z. Horváth, and G. Buzsáki, "Short-term and long-term changes in the postischemic hippocampus," (in eng), *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 743, pp. 121-139; discussion 139-140, 1994, doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb55790.x.
- [17] S. Mahakizadeh, T. Mokhtari, F. Navaee, M. Poorhassan, A. Tajik, and G. Hassanzadeh, "Effects of chronic hypoxia on the expression of seladin-1/Tuj1 and the number of dark neurons of hippocampus," (in eng), *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 104, p. 101744, 2020, doi: 10.1016/j.jchemneu.2020.101744.
- [18] Y. Yamaoka, S. Shimohama, J. Kimura, R. Fukunaga, and T. Taniguchi, "Neuronal damage in the rat hippocampus induced by in vivo hypoxia," (in en), *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 45, no. 4, pp. 205-209, 2021/12/29/14:01:27 1993, doi: 10.1016/S0940-2993(11)80389-1.
- [19] N. A. Brutus, S. Hanley, Q. M. Ashraf, O. P. Mishra, and M. Delivoria-Papadopoulos, "Effect of Hyperoxia on Serine Phosphorylation of Apoptotic Proteins in Mitochondrial Membranes of the Cerebral Cortex of Newborn Piglets," *Neurochemical research*, vol. 34, no. 7, pp. 1219-1225, 2009, doi: 10.1007/s11064-008-9898-z.
- [20] M. Hsu and G. Buzsáki, "Vulnerability of mossy fiber targets in the rat hippocampus to forebrain ischemia," *Journal of Neuroscience*, vol. 13, no. 9, pp. 3964-3979, Sep 1993.
- [21] Z. Maglóczy and T. F. Freund, "Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield," *Neuroscience*, vol. 66, no. 4, pp. 847-860, Jun 1995, doi: 10.1016/0306-4522(94)00613-a.
- [22] P. Somogyi, A. J. Hodgson, A. D. Smith, M. G. Nunzi, A. Gorio, and J. Y. Wu, "DIFFERENT Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material," *Journal of Neuroscience*, vol. 4, no. 10, pp. 2590-2603, 1984.
- [23] T. Kosaka, J. Y. Wu, and R. Benoit, "GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus," *Experimental Brain Research*, vol. 71, no. 2, pp. 388-398, 1988.
- [24] T. F. Freund and G. Buzsáki, "Interneurons of the hippocampus," (in eng), *Hippocampus*, vol. 6, no. 4, pp. 347-470, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.
- [25] S. Savanthrapadian, T. Meyer, C. Elgueta, S. A. Booker, I. Vida, and M. Bartos, "Synaptic Properties of SOM- and CCK-Expressing Cells in Dentate Gyrus Interneuron Networks," *Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 24, pp. 8197-8209, Jun 2014, doi: 10.1523/jneurosci.5433-13.2014.
- [26] E. L. Rolett, A. Azzawi, K. J. Liu, M. N. Yongbi, H. M. Swartz, and J. F. Dunn, "Critical oxygen tension in rat brain: a combined (31)P-NMR and EPR oximetry study," *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 279, no. 1, pp. R9-R16, Jul 2000, doi: 10.1152/ajpregu.2000.279.1.R9.

- [27] K. A. Foster, C. J. Beaver, and D. A. Turner, "Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices," *Neuroscience*, vol. 132, no. 3, pp. 645-657, 2005, doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.040.
- [28] C. Fanciullacci *et al.*, "Delta Power Is Higher and More Symmetrical in Ischemic Stroke Patients with Cortical Involvement," (in eng), *Frontiers in Human Neuroscience*, vol. 11, p. 385, 2017, doi: 10.3389/fnhum.2017.00385.
- [29] L. O. Ferreira *et al.*, "Increased Relative Delta Bandpower and Delta Indices Revealed by Continuous qEEG Monitoring in a Rat Model of Ischemia-Reperfusion," *Frontiers in Neurology*, vol. 12, p. 645138, 2023/03/10/08:49:33 2021, doi: 10.3389/fneur.2021.645138.
- [30] H. Hamrahi, R. Stephenson, S. Mahamed, K. S. Liao, and R. L. Horner, "Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia - Selected Contribution: Regulation of sleep-wake states in response to intermittent hypoxic stimuli applied only in sleep," *Journal of Applied Physiology*, vol. 90, no. 6, pp. 2490-2501, Jun 2001, doi: 10.1152/jappl.2001.90.6.2490.
- [31] M. Hoshikawa *et al.*, "Sleep quality under mild hypoxia in men with low hypoxic ventilatory response," *European Journal of Sport Science*, vol. 14, pp. S205-S212, Jan 2014, doi: 10.1080/17461391.2012.681805.
- [32] B. Foreman and J. Claassen, "Quantitative EEG for the detection of brain ischemia," *Critical Care*, vol. 16, no. 2, p. 216, 2023/03/10/09:25:23 2012, doi: 10.1186/cc11230.
- [33] A. Sirota, J. Csicsvari, D. Buhl, and G. Buzsáki, "Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents," (in eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 4, pp. 2065-2069, 2003, doi: 10.1073/pnas.0437938100.
- [34] E. R. John and L. S. Pritchep, "The relevance of QEEG to the evaluation of behavioral disorders and pharmacological interventions," (in eng), *Clinical EEG and neuroscience*, vol. 37, no. 2, pp. 135-143, 2006, doi: 10.1177/155005940603700210.
- [35] M. J. Rasch, A. Grettton, Y. Murayama, W. Maass, and N. K. Logothetis, "Inferring spike trains from local field potentials," *Journal of neurophysiology*, vol. 99, no. 3, pp. 1461-1476, 2008, doi: 10.1152/jn.00919.2007.
- [36] A. Thomas *et al.*, "Oxygen Supplementation and Hyperoxia in Critically Ill Cardiac Patients: From Pathophysiology to Clinical Practice," *JACC: Advances*, vol. 1, no. 3, p. 100065, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jacadv.2022.100065>.
- [37] H. Lassmann and J. van Horssen, "Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions," *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, vol. 1862, no. 3, pp. 506-510, Mar 2016, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.09.018.
- [38] K. Krnjević, "Early effects of hypoxia on brain cell function," (in eng), *Croatian Medical Journal*, vol. 40, no. 3, pp. 375-380, 1999.
- [39] K. Kawasaki, S. F. Traynelis, and R. Dingledine, "Different responses of CA1 and CA3 regions to hypoxia in rat hippocampal slice," (in en), *Journal of Neurophysiology*, vol. 63, no. 3, pp. 385-394, 2021/12/29/09:15:27 1990, doi: 10.1152/jn.1990.63.3.385.
- [40] G. G. Haddad and C. Jiang, "O₂ deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury," (in eng), *Progress in Neurobiology*, vol. 40, no. 3, pp. 277-318, 1993, doi: 10.1016/0301-0082(93)90014-j.
- [41] F. Peña and J.-M. Ramirez, "Hypoxia-induced changes in neuronal network properties," (in eng), *Molecular Neurobiology*, vol. 32, no. 3, pp. 251-283, 2005, doi: 10.1385/MN:32:3:251.
- [42] H.-s. Sun and Z.-p. Feng, "Neuroprotective role of ATP-sensitive potassium channels in cerebral ischemia," (in en), *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 34, no. 1, pp. 24-32, 2023/06/18/11:38:43 2013, doi: 10.1038/aps.2012.138.
- [43] Y.-S. Yang, J. H. Choi, and J.-C. Rah, "Hypoxia with inflammation and reperfusion alters membrane resistance by dynamically regulating voltage-gated potassium channels in hippocampal CA1 neurons," *Molecular Brain*, vol. 14, no. 1, p. 147, 2023/06/23/08:22:28 2021, doi: 10.1186/s13041-021-00857-9.
- [44] Y.-S. Yang, S. J. Son, J. H. Choi, and J.-C. Rah, "Synaptic transmission and excitability during hypoxia with inflammation and reoxygenation in hippocampal CA1 neurons," (in en), *Neuropharmacology*, vol. 138, pp. 20-31, 2023/06/18/08:49:45 2018, doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.05.011.

- [45] C. Zawar, T. D. Plant, C. Schirra, A. Konnerth, and B. Neumcke, "Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus," *The Journal of Physiology*, vol. 514, no. Pt 2, pp. 327-341, 2023/06/18/11:36:00 1999, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.315ae.x.
- [46] F. F. Johansen, J. Zimmer, and N. H. Diemer, "Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss," (in eng), *Acta Neuropathologica*, vol. 73, no. 2, pp. 110-114, 1987, doi: 10.1007/BF00693775.
- [47] T. Matsuyama, M. Tsuchiyama, H. Nakamura, M. Matsumoto, and M. Sugita, "Hilar somatostatin neurons are more vulnerable to an ischemic insult than CA1 pyramidal neurons," (in eng), *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 13, no. 2, pp. 229-234, 1993, doi: 10.1038/jcbfm.1993.28.
- [48] J. Doherty and R. Dingledine, "Regulation of excitatory input to inhibitory interneurons of the dentate gyrus during hypoxia," (in eng), *Journal of Neurophysiology*, vol. 77, no. 1, pp. 393-404, 1997, doi: 10.1152/jn.1997.77.1.393.
- [49] R. Khazipov, P. Bregestovski, and Y. Ben-Ari, "Hippocampal inhibitory interneurons are functionally disconnected from excitatory inputs by anoxia," (in eng), *Journal of Neurophysiology*, vol. 70, no. 6, pp. 2251-2259, 1993, doi: 10.1152/jn.1993.70.6.2251.
- [50] C. A. Colton and J. S. Colton, "An electrophysiological analysis of oxygen and pressure on synaptic transmission," (in eng), *Brain Research*, vol. 251, no. 2, pp. 221-227, 1982, doi: 10.1016/0006-8993(82)90740-5.
- [51] A. J. Garcia, R. W. Putnam, and J. B. Dean, "Hyperbaric hyperoxia and normobaric reoxygenation increase excitability and activate oxygen-induced potentiation in CA1 hippocampal neurons," *Journal of Applied Physiology*, vol. 109, no. 3, pp. 804-819, 2020/08/27/17:35:20 2010, doi: 10.1152/jappphysiol.91429.2008.
- [52] A. J. Garcia, R. W. Putnam, and J. B. Dean, "Hyperoxic stimulation of synchronous orthodromic activity and induction of neural plasticity does not require changes in excitatory synaptic transmission," *Journal of Applied Physiology*, vol. 109, no. 3, pp. 820-829, 2023/02/28/11:04:07 2010, doi: 10.1152/jappphysiol.91430.2008.
- [53] D. Torbati, D. Parolla, and S. Lavy, "Changes in the electrical activity and Po₂ of the rat's brain under high oxygen pressure," (in en), *Experimental Neurology*, vol. 50, no. 2, pp. 439-447, 2023/02/28/11:24:45 1976, doi: 10.1016/0014-4886(76)90017-0.
- [54] D. P. D'Agostino, R. W. Putnam, and J. B. Dean, "Superoxide (*O₂⁻) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen," (in eng), *Journal of Neurophysiology*, vol. 98, no. 2, pp. 1030-1041, 2007, doi: 10.1152/jn.01003.2006.
- [55] D. P. D'Agostino, J. E. Olson, and J. B. Dean, "Acute hyperoxia increases lipid peroxidation and induces plasma membrane blebbing in human U87 glioblastoma cells," (in eng), *Neuroscience*, vol. 159, no. 3, pp. 1011-1022, 2009, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.062.
- [56] X. Q. Gu and G. G. Haddad, "Maturation of neuronal excitability in hippocampal neurons of mice chronically exposed to cyclic hypoxia," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 284, no. 5, pp. C1156-C1163, 2022/01/04/19:18:18 2003, doi: 10.1152/ajpcell.00432.2002.
- [57] D. K. Mulkey, R. A. Henderson, R. W. Putnam, and J. B. Dean, "Hyperbaric oxygen and chemical oxidants stimulate CO₂/H⁺-sensitive neurons in rat brain stem slices," *Journal of Applied Physiology*, vol. 95, no. 3, pp. 910-921, 2021/12/15/13:07:58 2003, doi: 10.1152/jappphysiol.00864.2002.
- [58] Y. Noda, P. L. McGeer, and E. G. McGeer, "Lipid peroxide distribution in brain and the effect of hyperbaric oxygen," (in eng), *Journal of Neurochemistry*, vol. 40, no. 5, pp. 1329-1332, 1983, doi: 10.1111/j.1471-4159.1983.tb13574.x.
- [59] P. Guo, H. Luo, Y. Fan, Y. Luo, and Q. Zhou, "Establishment and evaluation of an experimental animal model of high altitude cerebral edema," (in eng), *Neuroscience Letters*, vol. 547, pp. 82-86, 2013, doi: 10.1016/j.neulet.2013.05.008.
- [60] G. Lenaz, "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing," *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, vol. 1366, no. 1-2, pp. 53-67, Aug 1998, doi: 10.1016/s0005-2728(98)00120-0.
- [61] A. Morales-Martínez *et al.*, "Oxidative Stress and Mitochondrial Complex I Dysfunction Correlate with Neurodegeneration in an α -Synucleinopathy Animal Model," *International*

- Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 19, Oct 2022, Art no. 11394, doi: 10.3390/ijms231911394.
- [62] Y. Shirasaka and C. G. Wasterlain, "The effect of urethane anesthesia on evoked potentials in dentate gyrus," (in en), *European Journal of Pharmacology*, vol. 282, no. 1, pp. 11-17, 2023/06/22/12:08:39 1995, doi: 10.1016/0014-2999(95)00244-F.
- [63] M. P. Sceniak and M. B. Maciver, "Cellular actions of urethane on rat visual cortical neurons in vitro," (in eng), *Journal of Neurophysiology*, vol. 95, no. 6, pp. 3865-3874, 2006, doi: 10.1152/jn.01196.2005.