

## БИЛАТЕРАЛЬНАЯ СИНХРОНИЗАЦИЯ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ ТЕТА-ОСЦИЛЛЯЦИЙ *IN VITRO*

© 2023 г. И. Халилов<sup>1,2,§</sup>, А. Гайнутдинов<sup>1,§</sup>, Р. Хазипов<sup>1,2,\*§</sup>

<sup>1</sup>Институт нейробиологии Средиземноморья АМН Франции,  
Университет Экс-Марселя, Марсель, Франция

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

\*e-mail: roustem.khazipov@inserm.fr

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 22.04.2023 г.

Тета-осцилляции гиппокампа являются ключевым сетевым паттерном активности, вовлеченным в реализацию таких функций, как пространственная навигация, обучение и память. У животных *in vivo* тета-осцилляции гиппокампа демонстрируют билатеральную синхронизацию. Осцилляции в тета-частотном диапазоне также были описаны в интактных препаратах гиппокампа *in vitro*. Однако остается неясным, каким образом тета-осцилляции синхронизируются между левым и правым гиппокампами. Для исследования этого вопроса был использован препарат интактных гиппокампов, соединенных вентральными гиппокампальными комиссурами *in vitro*, полученных от ювенильных и взрослых крыс или мышей. Локальные полевые потенциалы и спайковая активность нейронов регистрировались с помощью внеклеточных электродов из слоя пирамидных клеток и *stratum radiatum* CA1 области левого и правого гиппокампа. Было обнаружено, что активность нейронной сети в левом и правом гиппокампе организована в тета-осцилляции, которые модулируют спайковую активность CA1 нейронов. Как спайковая активность CA1 нейронов, так и полевые тета-осцилляции демонстрировали высокий уровень двусторонней синхронизации в левом и правом гиппокампах. После хирургического рассечения вентральной комиссуры тета-осцилляции сохранялись с обеих сторон, но их двусторонняя синхронизация полностью устранялась. Таким образом, тета-осцилляции синхронизированы в левом и правом гиппокампах *in vitro*, и билатеральная синхронизация тета-осцилляций *in vitro* обеспечивается межгиппокампальными комиссуральными связями.

**Ключевые слова:** гиппокамп, тета-осцилляции, двусторонние, синхронизация, вентральная комиссура гиппокампа

**DOI:** 10.31857/S004445292303004X, **EDN:** YHGGYA

### ВВЕДЕНИЕ

Межполушарная (билатеральная) синхронизация является важным свойством нейронной сетевой активности в гиппокампальной системе. Одновременная регистрация активности в правом и левом гиппокампах позволила выявить высокий уровень синхронизации различных паттернов электрической активности в этих структурах [1–12]. Билатеральная синхронизация нейрональной активности является характерным свойством также и тета-осцилляций в гиппокампальной системе *in vivo* [3]. Тета-осцилляции возникают в гиппокампе во время движения животного (а также во время быстрого сна) и являются инструментом для связывания нейрональных ансамблей гиппокампа (так называемых “клеток места”) при навигации в пространстве [13–16]. Предполагается, что этот

процесс основан на сравнении сенсорной информации, поступающей в гиппокамп из энторинальной коры, и внутренних моделей, закодированных в нейронных сетях самого гиппокампа, в каждом цикле тета-осцилляций. Учитывая контралатеральную организацию сенсорных потоков, билатеральная синхронизация тета-активности в гиппокампальной системе является необходимым условием для их интеграции в ходе пространственной навигации. Было предположено, что это может достигаться синхронным входом из энторинальной коры, а также в результате билатеральной синхронизации в энторинальной коре посредством межкорковых связей [9, 17–19]. Было также предположено, что билатеральная синхронизация внутренних моделей может, в свою очередь, осуществляться посредством CA3–CA3 и CA3–CA1 билатеральных связей в составе гиппокампальной комиссуры [20]. Однако механизмы билатеральной синхронизации

<sup>§</sup> В равной степени участвующие авторы.

тета-осцилляций до сих пор остаются лишь гипотетическими и требуют прямой экспериментальной проверки.

Ранее было показано, что в *in vitro* препарате изолированного гиппокампа ювенильных и взрослых мышей возникают автономные спонтанные осцилляции в частотном диапазоне, близком к частоте тета-осцилляций, наблюдаемых *in vivo* [21–24]. Мы предположили, что более комплексная модель гиппокампальной системы *in vitro*, которая включает в себя оба изолированных интактных гиппокампа, соединенных вентральной комиссурой [25–28], может быть использована для исследования межгиппокампальной синхронизации тета-осцилляций посредством комиссуральных связей, что и было реализовано в настоящем исследовании.

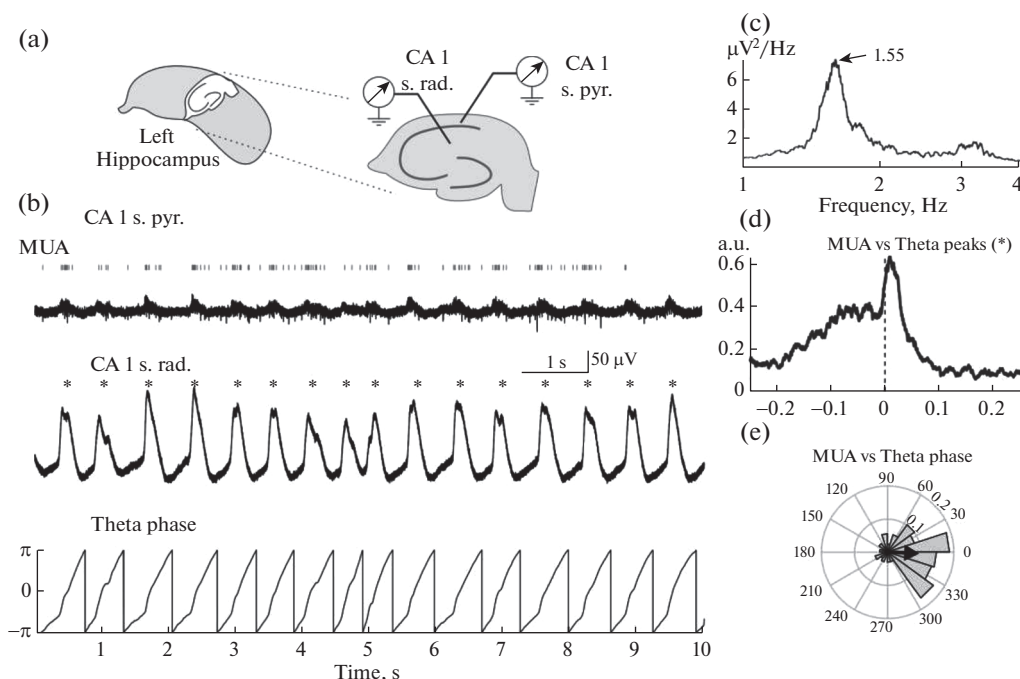
## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на препаратах целых гиппокампов, соединенных вентральной гиппокампальной комиссурой, выделенных у крыс породы Вистар в возрасте от P13 до P15 ( $n = 4$ ; P – возраст в днях после рождения) и мышей линии C57BL в возрасте P22, P57 и 1 год ( $n = 3$ ). Процедуры приготовления препарата гиппокампов подробно описаны ранее [26]. После декапитации под изофлюрановым наркозом мозг животных быстро извлекали и погружали в ледяной оксигенированный (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) раствор искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦСЖ) следующего состава (в мМ): NaCl – 126; KCl – 3.5; CaCl<sub>2</sub> – 2.0; MgCl<sub>2</sub> – 1.3; NaHCO<sub>3</sub> – 25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2; глюкоза – 11 (pH – 7.4). После удаления мозжечка и лобных долей комплекс, включающий два взаимосвязанных комиссурой гиппокампа, изолировался от окружающих структур с помощью следующей процедуры: ствол мозга, средний мозг и полосатое тело аккуратно отделялись от гиппокампа двумя шпательями. Затем неокортекс отсекался путем скольжения вдоль мозолистого тела вдоль дорсальной поверхности гиппокампа и перегородки шпателем, вставленным в боковой желудочек. Далее препарат двойного гиппокампа выделялся из септо-гиппокампального комплекса. В препарате сохранялись небольшие фрагменты окружающей ткани для механической фиксации в камере с дном, покрытым силгардом, с использованием энтомологических игл. Полная процедура извлечения препарата гиппокампов занимала 8–10 мин. Затем препарат осторожно переносили и выдерживали в ИЦСЖ при комнатной температуре (20–22°C) не менее одного часа перед регистрацией. Для регистрации препарат помещали в специальную камеру с дном из нейлоновой сетки и непрерывно перфузировали ИЦСЖ со скоростью ~15 мл/мин. Внеклеточную регистрацию локальных полевых потенциалов (ЛПП [local field potentials, LFP]) и множественных потенциалов действия нейронов (МПД [multiple

unit activity, MUA]) проводили с помощью электродов, изготовленных из вольфрамовой проволоки (диаметр 50 мкм, California Fine Wire, Grover Beach, CA, США), располагаемых в зоне пирамидного слоя или в stratum radiatum CA1 зоны гиппокампов. Регистрирующие электроды располагались в средней части гиппокампов на равном удалении от септального полюса. Усиление и оцифровку регистрируемых сигналов осуществляли с помощью усилителя DAM–8A ( $\times 1000$ , в полосе 0.1 Гц – 3 кГц) и аналого-цифрового преобразователя Digidata 1440A (Molecular Devices, CA, США) с частотой 10 кГц. Исходные данные были предварительно обработаны с помощью разработанных нами функций на основе пакета программ Matlab. Исходный сигнал был прорежен до 1 кГц и в дальнейшем использовался для анализа ЛПП. Для детекции потенциалов действия исходный сигнал был пропущен через фильтр низких частот (порог пропускания 200 Гц), и отрицательные события с амплитудой, превышающей 3 стандартные девиации, принимались за потенциалы действия. ЛПП и МПД анализировались с помощью разработанных нами функций на основе пакета программ Matlab (MathWorks, США). Для определения фазы тета-осцилляций применялись следующие операции. ЛПП раскладывался на реальную и воображаемую часть через преобразование Гильберта. Затем, чтобы получить угол в радианах в интервале  $[-\pi, \pi]$ , над полученными реальной и воображаемой частью применялась операция четырех-квadrантного арктангенса. Для анализа фазовой модуляции частоты МПД тета-осцилляциями использовался тест Релея из пакета функций для Matlab – circular statistics. Амплитуда результирующего вектора Релея показывает степень модуляции частоты МПД тета-осцилляциями, а его угол – фазу тета-осцилляции, на которой располагается результирующий вектор Релея. Групповые данные представлены как медиана (Q1 – Q3). Для сравнения тета-частот до и после перерезки комиссуральных связей применялся тест Уилкоксона для связанных выборок. Статистическую оценку различий в сравниваемых выборках оценивали для 5%-ного уровня значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спонтанная активность в изолированном гиппокампе крыс и мышей в возрасте старше 2 нед характеризовалась осцилляциями в тета-частотном диапазоне с циклическими изменениями ЛПП с максимальной амплитудой в stratum radiatum CA1 (рис. 1). По результатам анализа с использованием быстрого преобразования Фурье пиковые значения мощности 1.8 (0.6 – 8.0) мкВ<sup>2</sup>/Гц тета-осцилляций наблюдались на частоте 2.0 (1.5 – 2.4) Гц ( $n = 7$ ; минимум 1.5 и максимум 8.1 Гц). Спайковая активность в пирамидном слое CA1 значительно модулировалась тета-осцилляциями, что характеризо-



**Рис. 1.** Тета-осцилляции в изолированном гиппокампе *in vitro*. (a) – Схема расположения электродов в интактном гиппокампе *in vitro*. (b) – Примеры одновременной регистрации ЛПП и МПД в пирамидном слое и stratum radiatum CA1 гиппокампа. МПД обозначены вертикальными серыми линиями. \* – пики тета-осцилляций. Под записью ЛПП в stratum radiatum слое представлен результат преобразования Гильберта ЛПП-сигнала в фазы тета-осцилляции. (c) – График спектра мощности ЛПП в stratum radiatum CA1. (d) – Временная кросс-корреляция МПД в CA1 пирамидном слое с пиком ЛПП тета-осцилляций, записанных в stratum radiatum. (e) – Циркулярная гистограмма частоты МПД относительно фазы тета-осцилляции. Вектор Релея обозначен черным цветом.

валось высокими значениями кросс-корреляции между МПД и ЛПП тета-осцилляций (рис. 1d). В соответствии с этими наблюдениями, циркулярный статистический анализ активности нейронов выявил, что амплитуда значений вектора Релея (0.075 (0.054 – 0.112)) достигается непосредственно перед пиком тета-осцилляций (угол вектора Релея –32.8 (–35.7 – –5.1) градусов) ( $n = 7$ ) (рис. 1e).

Для исследования билатеральной организации тета-осцилляций была проведена одновременная регистрация активности в левом и правом гиппокампах с сохраненными комиссуральными связями (рис. 2). Было обнаружено, что тета-осцилляции высоко синхронизированы между обоими гиппокампами, о чем свидетельствовал высокий уровень кросс-корреляции между ЛПП в двух гиппокампах, значения которой достигали 0.77 (0.55 – 0.93), с временной задержкой 4.4 (–10.3 – 6.6) мс пиковых значений кросс-корреляции между правым и левым гиппокампом ( $n = 7$ ). Также о высоком уровне билатеральной синхронизации тета-осцилляций свидетельствовала высокая корреляция между МПД в правом и левом гиппокампах, достигающая значений 0.15 (0.12 – 0.18) с временной задержкой 2.9 (–43.7 – 19.8) мс пиковых значений кросс-корреляции МПД между правым и левым гиппокампами ( $n = 5$ ). В различных экспериментах наблюда-

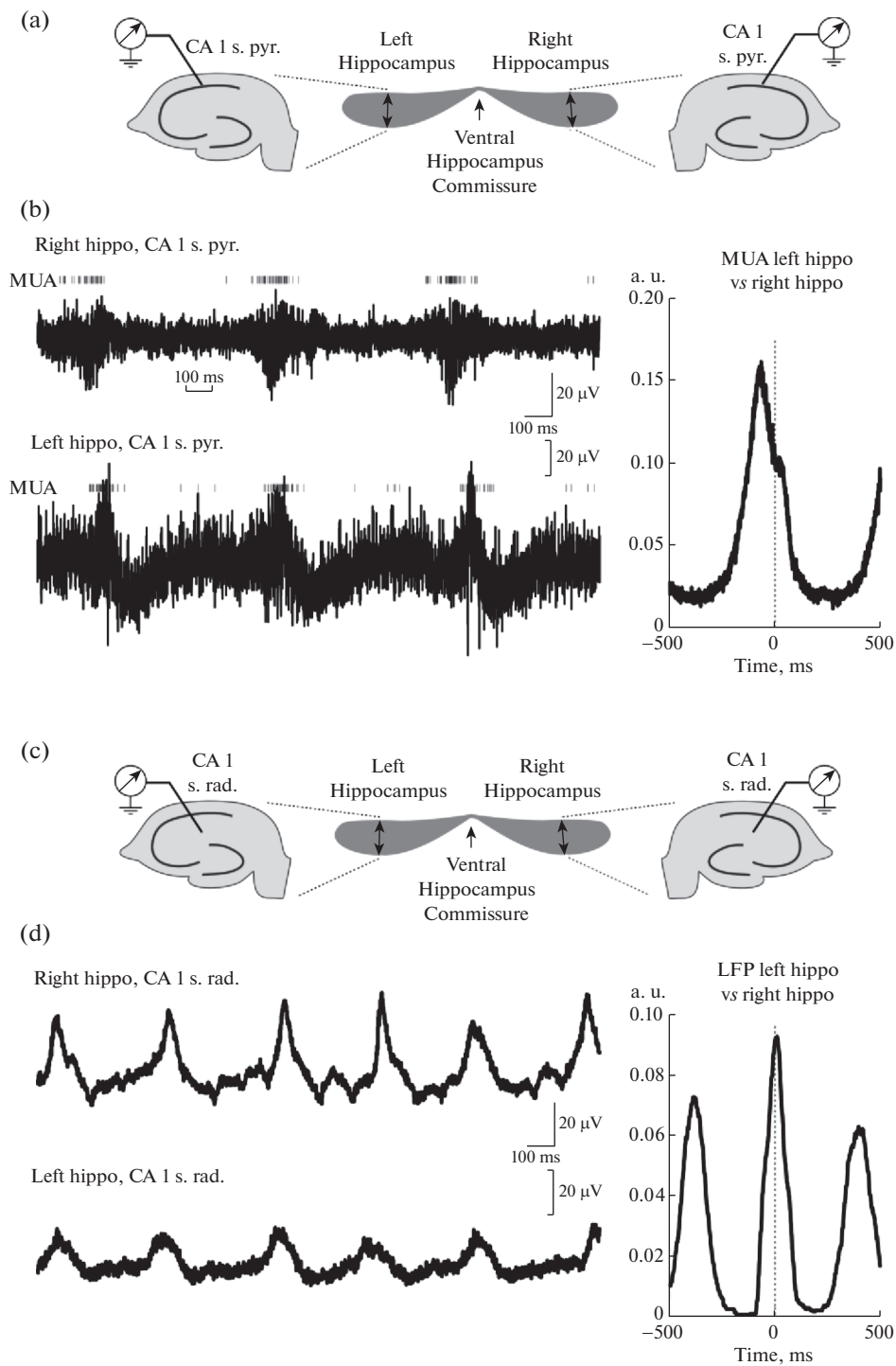
лось преобладающее лидерование либо левого, либо правого гиппокампа, но достоверного лидерования одной из сторон в генерации тета-осцилляций на групповом уровне не выявлялось.

Перерезка комиссуральных связей приводила к полной десинхронизации тета-осцилляций в левом и правом гиппокампах, о чем свидетельствовало исчезновение достоверной билатеральной корреляции между колебаниями ЛПП и МПД ( $n = 4$ ; рис. 3). Частота тета-осцилляций после перерезки комиссуральных связей достоверно не изменялась ни в правом, ни в левом гиппокампах ( $p = 0.93$ ;  $n = 4$ ).

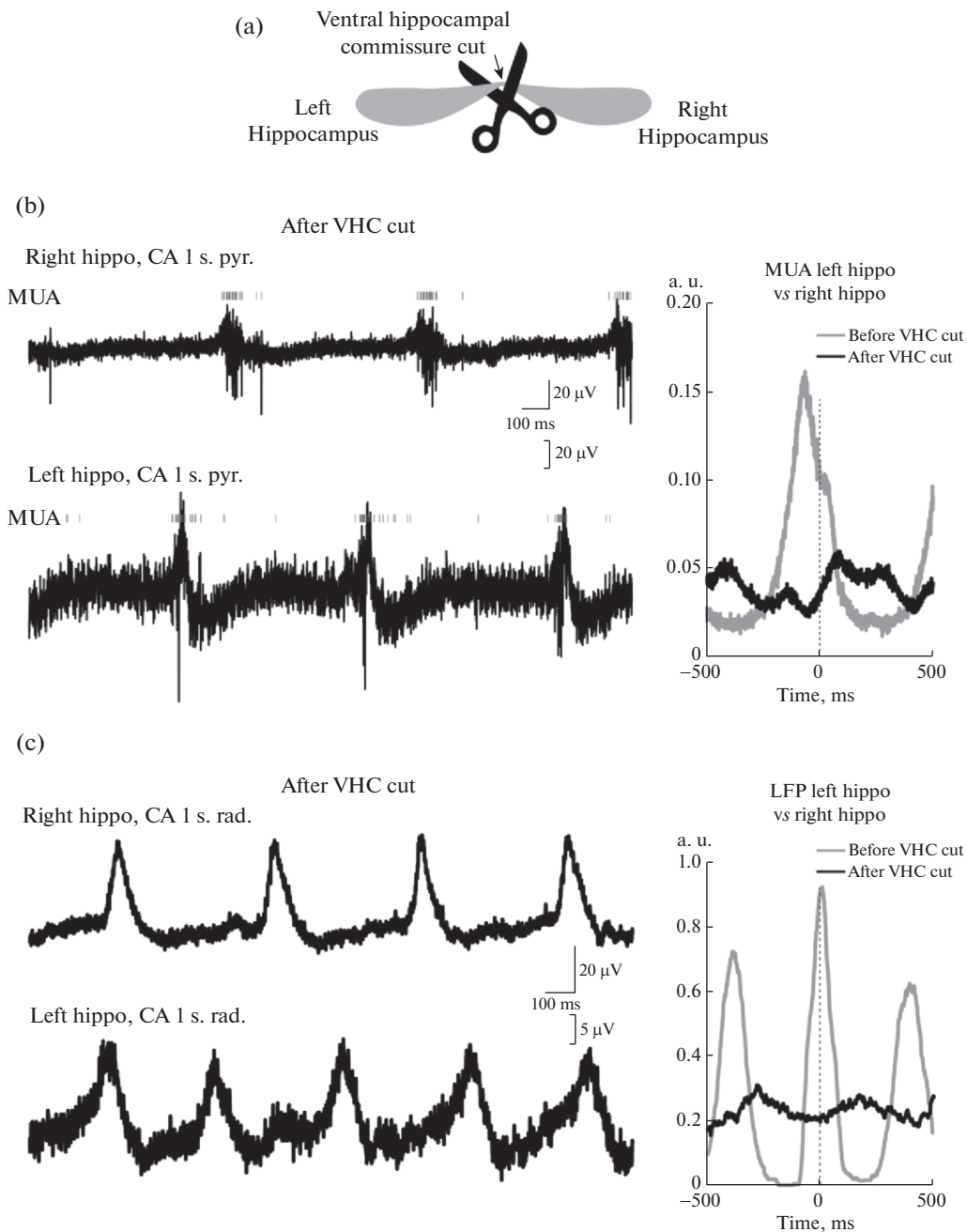
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными результатами настоящего исследования являются демонстрация высокого уровня синхронизации тета-осцилляций в препарате левого и правого гиппокампов ювенильных и взрослых крыс и мышей *in vitro*, и доказательство того, что билатеральная синхронизация этих тета-осцилляций обеспечивается комиссуральными связями между гиппокампами.

Модель гиппокампальной системы *in vitro*, которая включает в себя оба изолированных интактных гиппокампа, соединенных вентральной ко-



**Рис. 2.** Билатеральная синхронизация тета-осцилляции в связанных комиссурой правом и левом гиппокампах *in vitro*. (a) – Схема расположения электродов в препарате связанных комиссурой гиппокампов *in vitro*. (b) – Примеры одновременной регистрации ЛПП и МПД в пирамидном слое CA1 левого и правого гиппокампов. МПД обозначены вертикальными серыми линиями. Справа – график кросс-корреляции МПД в CA1 пирамидном слое левого и правого гиппокампов. (c) – Схема расположения электродов в препарате связанных комиссурой гиппокампов *in vitro* для регистрации ЛПП. (d) – Примеры одновременной регистрации ЛПП в stratum radiatum CA1 левого и правого гиппокампов. Справа – график кросс-корреляции ЛПП в левом и правом гиппокампах.



**Рис. 3.** Перерезка гиппокампальной комиссуры устраняет билатеральную синхронизацию тета-осцилляций. (a) – Схема расположения электродов в препарате двух гиппокампов *in vitro* после полной перерезки вентральной и дорсальной комиссур. (b) – Примеры одновременной регистрации ЛПП и МПД в пирамидном слое CA1 левого и правого гиппокампов. МПД обозначены вертикальными серыми линиями. Справа – график кросс-корреляции МПД в CA1 пирамидном слое левого и правого гиппокампов до и после перерезки вентральной комиссуры. (c) – Примеры одновременной регистрации ЛПП в stratum radiatum CA1 левого и правого гиппокампов. Справа – график кросс-корреляции ЛПП в левом и правом гиппокампах до и после перерезки вентральной комиссуры.

миссурой [25–28], была изначально разработана для онтогенетических исследований. Эта модель позволила охарактеризовать билатеральную синхронизацию посредством комиссуральных связей во время гигантских деполяризующих потенциалов [28], а также при распространении пароксиз-

мальных разрядов [25, 27, 29–31] в развивающейся гиппокампальной системе крыс и мышей. Изначально предполагалось, что данная модель имеет возрастные ограничения и может быть использована лишь в постнатальном периоде (до постнатального дня P10) в связи с увеличением толщины гип-

покампа и сужения внеклеточного пространства, что ухудшает проникновение метаболитов из омывающего раствора вглубь препарата по мере взросления, а также в связи с возрастным увеличением энергопотребления [26]. Однако оптимизация экспериментальных условий, в первую очередь, значительное увеличение скорости протока омывающего препарат раствора позволили добиться условий, при которых сохраняются мембранный потенциал нейронов, функциональные синаптические связи и сетевые взаимодействия в интактных гиппокампах даже взрослых животных [21]. Обнаружилось, что в этих условиях в изолированном гиппокампе ювенильных и взрослых мышей возникают автономные спонтанные осцилляции в частотном диапазоне, близком к частоте тета-осцилляций, наблюдаемых *in vivo*. Данная модель тета-осцилляций позволила получить важные знания о клеточных, синаптических и сетевых механизмах тета-осцилляций [21–24]. Очевидно, что данная модель имеет ограничения, связанные с отсутствием ряда ключевых корковых и подкорковых структур, которые принимают участие в тета-генезе *in vivo*, но при этом является вполне адекватной для исследования интрагиппокампального компонента тета-осцилляций.

Тета-осцилляции в изолированных гиппокампах *in vitro*, которые описываются в настоящем исследовании, генерируются в нейрональных сетях самих гиппокампов, поскольку энторинальная кора в этом препарате отсутствует. Таким образом, тета-осцилляции изолированных гиппокампов могут быть релевантными компоненту “внутренних моделей” тета-осцилляций *in vivo* и также соответствовать, например, генерируемому в СА3 сетях тета-осцилляциям у животных, находящихся под уретановым наркозом или после билатеральной резекции энторинальной коры [32–34]. Соответственно билатеральная синхронизация тета-осцилляций в препарате двух гиппокампов *in vitro*, которая была обнаружена в настоящем исследовании, может свидетельствовать о наличии механизма интеграции “внутренних моделей” путем билатеральной синхронизации нейрональных сетей гиппокампов в тета-осцилляции посредством прямых связей, организованных в вентральной гиппокампальной комиссуре. Для того, чтобы установить значимость комиссуральных связей в билатеральной синхронизации физиологических тета-осцилляций *in vivo*, в дальнейших исследованиях представляет интерес проверить эффект перерезки комиссуральных связей на билатеральную тета-синхронизацию в интактном животном.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые с использованием животных, соответствовали этическим стандартам, утвер-

жденным законодательными актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации и рекомендациям Директивы 2010/63/EU по проведению экспериментов на животных, все протоколы по использованию животных были одобрены Национальным институтом здравоохранения и медицинских исследований Франции (APAFIS #16992- 2020070612319346 v2) и локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (#24/ 22.09.2020).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Agence Nationale de la Recherche (проект № ANR-21-CE16-0005-01 “DevHippo”) и в рамках программы исследований Приоритет-2030, запланированных в Казанском (Приволжском) федеральном Университете.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Р.Х.), сбор данных (И.Х.), обработка данных (А.Г.), написание и редактирование манускрипта (Р.Х., А.Г., И.Х.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suzuki SS, Smith GK (1987) Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates, laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67 (4): 348–359. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(87\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(87)90123-4)
2. Buzsaki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience* 31 (3): 551–570. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90423-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90423-5)
3. Buzsaki G, Buhl DL, Harris KD, Csicsvari J, Czeh B, Morozov A (2003) Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* 116 (1): 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00669-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00669-3)
4. Buzsaki G (2015) Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25 (10): 1073–1188. <https://doi.org/10.1002/hipo.22488>
5. Carr MF, Karlsson MP, Frank LM (2012) Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay. *Neuron* 75 (4): 700–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.014>
6. Shinohara Y, Hosoya A, Hirase H (2013) Experience enhances gamma oscillations and interhemispheric asymmetry in the hippocampus. *Nat Commun* 4: 1652. <https://doi.org/10.1038/ncomms2658>
7. Pfeiffer BE, Foster DJ (2015) PLACE CELLS. Autoassociative dynamics in the generation of sequences of hippocampal place cells. *Science* 349 (6244): 180–183. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9633>

8. Wang Y, Toprani S, Tang Y, Vrabec T, Durand DM (2014) Mechanism of highly synchronized bilateral hippocampal activity. *Exp Neurol* 251: 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.014>
9. Benito N, Martin-Vazquez G, Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2016) The right hippocampus leads the bilateral integration of gamma-parsed lateralized information. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16658>
10. Tanaka M, Wang X, Mikoshiba K, Hirase H, Shinohara Y (2017) Rearing-environment-dependent hippocampal local field potential differences in wild-type and inositol trisphosphate receptor type 2 knockout mice. *J Physiol* 595 (20): 6557–6568. <https://doi.org/10.1113/JP274573>
11. Valeeva G, Nasretidinov A, Rychkova V, Khazipov R (2019) Bilateral Synchronization of Hippocampal Early Sharp Waves in Neonatal Rats. *Front Cell Neurosci* 13: 29. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00029>
12. Khazipov R, Holmes GL (2003) Synchronization of kainate-induced epileptic activity via GABAergic inhibition in the superfused rat hippocampus *in vivo*. *J Neurosci* 23 (12): 5337–5341. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05337.2003>
13. Buzsaki G (2002) Theta Oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325–340. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00586-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00586-x)
14. Buzsaki G, Moser EI. (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 16 (2): 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
15. Colgin LL (2013) Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annu Rev Neurosci* 36: 295–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170330>
16. Hasselmo ME (2005) What is the function of hippocampal theta rhythm?—Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus* 15 (7): 936–949. <https://doi.org/10.1002/hipo.20116>
17. Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Buzsaki G (2009) Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 64 (2): 267–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.037>
18. Shinohara Y, Hosoya A, Yahagi K, Ferecsko AS, Yaguchi K, Sik A, Itakura M, Takahashi M, Hirase H (2012) Hippocampal CA3 and CA2 have distinct bilateral innervation patterns to CA1 in rodents. *Eur J Neurosci* 35 (5): 702–710. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.07993.x>
19. Fernandez-Ruiz A, Oliva A, Nagy GA, Maurer AP, Berenyi A, Buzsaki G (2017) Entorhinal-CA3 Dual-Input Control of Spike Timing in the Hippocampus by Theta-Gamma Coupling. *Neuron* 93: 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.017>
20. Buzsaki G, Eidelberg E (1982) Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 237 (2): 283–295. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90442-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90442-5)
21. Goutagny R, Jackson J, Williams S (2009) Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12 (12): 1491–1493. <https://doi.org/10.1038/nn.2440>
22. Ducharme G, Lowe GC, Goutagny R, Williams S (2012) Early Alterations in Hippocampal Circuitry and Theta Rhythm Generation in a Mouse Model of Prenatal Infection: Implications for Schizophrenia. *Plos One* 7 (1):8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029754>
23. Jackson J, Amilhon B, Goutagny R, Bott JB, Manseau F, Kortleven C, Bressler SL, Williams S (2014) Reversal of theta rhythm flow through intact hippocampal circuits. *Nat Neurosci* 17 (10): 1362–1370. <https://doi.org/10.1038/nn.3803>
24. Amilhon B, Huh CYL, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, Williams S (2015) Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron* 86 (5): 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.027>
25. Khalilov I, Dzhalal V, Medina I, Leinekugel X, Melyan Z, Lamsa K, Khazipov R, Ben-Ari Y (1999) Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures *in vitro*. *Eur J Neurosci* 11 (10): 3468–3480. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00768.x>
26. Khalilov I, Esclapez M, Medina I, Aggoun D, Lamsa K, Leinekugel X, Khazipov R, Ben-Ari Y (1997) A novel *in vitro* preparation: the intact hippocampal formation. *Neuron* 19 (4): 743–749. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80956-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80956-3)
27. Khazipov R, Desfreres L, Khalilov I, Ben-Ari Y (1999) Three-independent-compartment chamber to study *in vitro* commissural synapses. *J Neurophysiol* 81 (2): 921–924. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.2.921>
28. Leinekugel X, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1998) Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex *in vitro*. *J Neurosci* 18 (16): 6349–6357. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06349.1998>
29. Khalilov I, Holmes GL, Ben Ari Y (2003) *In vitro* formation of a secondary epileptogenic mirror focus by inter-hippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 6 (10): 1079–1085. <https://doi.org/10.1038/nn1125>
30. Khalilov I, Le Van QM, Gozlan H, Ben Ari Y (2005) Epileptogenic Actions of GABA and Fast Oscillations in the Developing Hippocampus. *Neuron* 48 (5): 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.026>
31. Nardou R, Ben-Ari Y, Khalilov I (2009) Bumetanide, an NKCC1 antagonist, does not prevent formation of epileptogenic focus but blocks epileptic focus seizures in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 101 (6): 2878–2888. <https://doi.org/10.1152/jn.90761.2008>
32. Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, Buzsaki G (1995) Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus* 5 (1): 78–90. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050110>

33. *Buzsaki G, Czopf J, Kondakor I, Kellenyi L* (1986) Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res* 365 (1): 125–137.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90729-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90729-8)
34. *Kamondi A, Acsady L, Wang XJ, Buzsaki G* (1998) Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells *in vivo*: activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus* 8 (3): 244–261.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J)

## BILATERAL SYNCHRONIZATION OF HIPPOCAMPAL THETA-OSCILLATIONS *IN VITRO*

I. Khalilov<sup>a,b</sup>, A. Gainutdinov<sup>a</sup>, and R. Khazipov<sup>a,b,#</sup>

<sup>a</sup>*Aix-Marseille University, INMED, INSERM, Marseille, France*

<sup>b</sup>*Laboratory of Neurobiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: roustem.khazipov@inserm.fr*

Hippocampal theta oscillations are pivotal for hippocampal functions of spatial navigation, learning and memory. In the behaving animals *in vivo*, hippocampal theta oscillations display bilateral synchronization. Internally generated oscillations in the theta frequency range have also been described in the intact hippocampus preparation *in vitro*. How theta oscillations are synchronized between the left and right hippocampi remains elusive, however. We used preparation of the intact hippocampi interconnected by the ventral hippocampal commissure prepared from juvenile and adult mice and rats *in vitro*. Local field potentials and multiunit activity were recorded using extracellular electrodes from the pyramidal cell layer and stratum radiatum of the left and right hippocampi. Neuronal network activity in the left and right hippocampi was organized in theta oscillations, which strongly modulated neuronal firing of CA1 neurons. Both neuronal activity and field potential theta oscillations showed high levels of bilateral synchronization. Theta oscillations persisted on both sides, but their bilateral synchronization was eliminated after surgical cut of the ventral hippocampal commissure. Thus, theta oscillations are synchronized in the left and right hippocampi *in vitro*, and their bilateral synchronization is provided by the ventral commissural connections.

*Keywords:* hippocampus, theta oscillations, bilateral, synchronization, ventral hippocampal commissure