

Patkány és ember agykérgi piramis sejtek jel terjedési sebességének vizsgálata

Doktori tézis

Oláh Gáspár

Témavezető:

Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Biológia Doktori Iskola



2023

Szeged

Bevezetés

Az agykéreg a törzsfejlődés során legkésőbb kialakult központi idegrendszeri struktúra. A neocortex citoarchitektúrájának komplexitása már a XIX. század végén lenyűgözte a kutatókat. A kortikális neuronok morfológiai sokszínűségét Santiago Ramón y Cajal viszonylag részletesen leírta. Annak ellenére, hogy e korai anatómiai megfigyelések jelentős része emberi agykérgi mintákon történtek, a sejteken és mikrohálózatokon végzett kísérletes eredmények, amely funkciójuk leírására és megértésére irányulnak, túlnyomórészt rágcsálókban készült preparátumokon végzett kísérletekből származnak.

Az emberi agykéreg kiterjedése jelentősen nagyobb, mint a rágcsálóké. A nyilvánvaló méretbeli különbségek mellett azonban strukturális differenciákat is meg lehet figyelni a két faj között. Az emberi agykéreg vastagsága jelentősen meghaladja a rágcsálókét. A legmarkánsabb eltérés a II/III. réteg kiterjedésében tűnik fel, az evolúció során ezen agykérgi réteg mutatta a legnagyobb mértékű méretbeli növekedést. Ám nemcsak az agykérgi rétegek vastagságában lehet különbségeket találni patkány és ember között, hanem a sejtek mérete is jelentősen nagyobb fajunkban. A patkány és ember piramis sejtek dendritjeinek morfológiáját vizsgálva is jelentős különbségeket tapasztalhatunk. Az emberi piramissejtek dendritikus kiterjedése, illetve morfológiai komplexitása - ideértve a dendritek összesített hosszát, illetve a dendritfán az elágazások számát - jelentősen nagyobb. Belátható, hogy a külvilágból érkező jelek gyors feldolgozása fontos, hogy egy élőlény ne kerüljön szelektív hátrányba. A rágcsálók és az emberi electro-enkefalogram (EEG) hasonló frekvencia komponensű hullámokat tartalmaz, ami egyben azt is jelenti, hogy az információ feldolgozás időbeli lefutásában nem számíthatunk jelentős eltérésekre. Ezzel egyhangzóan korábbi kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a humán mikrohálózatok temporális felbontása hasonló a két fajban. Azt mára már több független munka is bemutatta, hogy a szinaptikus latenciákban nem lehet jelentős különbséget tapasztalni ember és rágcsáló sejt-pár elvezetésekben.

Felmerül a kérdés, milyen evolúciós újítás állhat annak hátterében, hogy a humán mikrohálózat az azt felépítő sejtek nyilvánvaló méretbeli különbségei ellenére hasonló időbeli felbontással rendelkezik, mint a rágcsáló mikrohálózat? A sejtek közötti kommunikációban résztvevő nyúlványok működésében milyen különbségek lehetnek?

Célkitűzések

PhD munkám során célul tűztük ki:

1. a humán és rágcsáló neuron hálózatok temporális dinamikájának vizsgálatát páros whole cell elvezetésekkel,
2. a dendritikus és axonális vezetési sebesség meghatározását szimultán szomatikus és dendritikus whole cell elvezetésekkel mind patkány, mind ember agykérgi piramissejtjeiben,
3. a dendritikus vezetési sebesség különbségeit okozó mechanizmusok vizsgálatát.

Anyagok és módszerek

Túlélő agyszelet preparátumok készítése

Kísérleteinket túlélő neocortikális agyszelet preparátumokon végeztük a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével (ref. no. XX/897/2018, ref. 75/2014) a Helsinki Nyilatkozat figyelembevételével mellett. Munkánk során fiatal felnőtt (P20-45) Wistar patkányokat (nemre való tekintet nélkül), illetve műtéti úton eltávolított emberi agykérgi szövet darabokat használtunk fel.

A patkányok halothánnal történő altatása után az állatokat dekapitáltuk, majd a koponyát felbontva agyukat eltávolítottuk. Az emberi agyszövet-mintákat a műtőben hideg mesterséges agy-gerincvelői folyadékba helyeztük (melynek összetétele megegyezett az agyszeletek készítése során használt oldatával, lásd később) majd a szövetdarabok transzportálása során végéig hidegen tartottuk. Az emberi és patkány agyszöveteket ettől kezdve azonos módon dolgoztuk fel. Az agykéregből 320 μm vastag koronális szeleteket készítettünk. Az agyszeletek metszése hideg (4°C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékban történt, melynek összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 75 szacharóz, 84 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 4 MgSO₄, 25 D-(+)-glükóz. Vágást követően az agyszeleteket 36°C-on inkubáltuk 30 percig, ezt követően a folyadékot fokozatosan lecseréltük alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékra, melynek összetétele a következő volt mM-ban kifejezve: 130 NaCl, 3.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄, 10 D-(+)-glükóz. Az inkubációt követően 17 °C-on tartottuk az agyszeleteket az alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékban egészen a kísérlet megkezdéséig. Méréseinkhez az agyszeleteket 36 °C-os kamrába

helyezettünk, amelyen keresztül elvezető oldatot áramoltattunk 4-5 ml/perc sebességgel. A mérő oldat összetétele megegyezett az alacsony Ca^{2+} tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékéval, kivéve a magasabb 3 mM CaCl_2 és alacsonyabb 1.5 mM MgSO_4 koncentrációt. Az emberi szövet szállítása, az agyszeletek készítése, illetve a mérés közben használt oldatok kivétel nélkül folyamatosan telítve voltak 95% oxigén és 5% szén-dioxid keverékével.

Elektrofiziológiai mérések

Az elektrofiziológiai méréseink során szimultán patch-clamp elvezetéseket végeztünk. A sejteket először differencia interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópiával tettük láthatóvá. A sejtestek formája és elhelyezkedésük alapján választottuk ki a mérésre szánt II/III rétegi piramissejteket. A szomatikus páros elvezetésekhez használt pipettákat (3-5 $\text{M}\Omega$) intracelluláris oldattal töltöttük meg melynek összetétele a következő volt: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP- Na_2 , 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát és 8 mM biocytin. A szomatikus whole-cell konfiguráció kialakítása után a sejtek passzív elektromos jellemzőit, illetve tüzelési mintázatát 800 ms hosszú, 0 pA parancs-áram mellett, -100 pA-es kezdő négyszög impulzussal vizsgáltuk, melyet ismételve 20 pA-rel növeltünk addig, amíg a sejt tüzelési frekvenciája az átfutáson belül az átlagosan 10 Hz-et el nem érte. A piramis sejtek közötti szinaptikus kapcsolatok jelenlétét current-clamp módban teszteltük. Amennyiben a preszinaptikus sejten kiváltott akcióspotenciál után rövid késéssel (<2 ms) EPSP-t tapasztaltunk, feltételeztük a monoszinaptikus kapcsolat jelenlétét és a mérés befejezése után a szeletet fixáltuk további anatómiai vizsgálatok céljából.

A szomato-dendritikus illetve szomato-axonális szimultán elvezetésekhez használt intracelluláris oldat további 10 μM Alexa 594 hidrazid fluorescens festéket is tartalmazott. Méréseinket a páros elvezetésekhez hasonlóan DIC videomikroszkópos képalkotás alkalmazásával kezdtük. A szomatikus whole-cell konfiguráció kialakítása után regisztráltuk a sejt tüzelési mintázatát a korábban már leírtak szerint. Ezt követően 5-10 percen keresztül hagytuk, hogy az intracelluláris oldat a dendritekbe diffundáljon. 2 foton képalkotás segítségével láthatóvá tettük a mért sejt dendritarborizációját, majd egy másik elektródával (12-25 $\text{M}\Omega$) célzott dendritikus elvezetést végeztünk. A szomato-dendritikus elvezetések során 800 ms hosszú a sejt reobázisánál nagyobb szomatikus áraminjekciót végeztünk és a kialakuló akciós potenciálok

dendritekbe történő visszaterjedését regisztráltuk. A szimulált EPSP elvezetésekhez rövid leszálló „rampa” stimulációt alkalmaztunk melynek amplitúdóját úgy állítottuk be, hogy a szomatikus elektródán mért jel amplitúdója 1-3 mV közé essen. A mérések végeztével a festékkel feltöltött sejtekről fluorescens módban Z irányú sorozat felvételt vettünk fel melynek segítségével későbbiekben lehetőségünk nyílt az elvezetési pontok közötti dendritszakaszok hosszának és vastagságának lemérésére.

A specifikus membránkapacitás meghatározásához *nucleated patch* elvezetéseket végeztünk. Ezen mérések során cézium-klorid alapú intracelluláris oldatot használtunk a korábban már leírt protokoll szerint. A méréseket sylgard-dal bevont elektródákkal (3-5 M Ω) végeztük a pipetta kapacitásának minimalizálása céljából. A szomatikus whole-cell konfiguráció kialakítás után a sejtmagot kihúztuk a sejtéből ügyelve arra, hogy a patch minősége ne romoljon. Amennyiben a -70 mV tartó potenciál mellett több mint 200 pA leak áramot mértünk, akkor a mérést nem folytattuk. A nucleated patch-et -70 mV-on tartva 300 rövid 10 ms-os -5mV-os feszültség lépcsőt adtunk (Axon Multiclamp 700B). Ezt követően az elektródát óvatosan sylgardhoz nyomtuk a reziduális kapacitás meghatározása céljából. A stimulációra kialakuló áramot 200 kHz-en digitalizáltuk (Molecular Devices, Axon Digidata 1440).

Mért sejtek anatómiai vizsgálata

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a biocytinnel megjelölt idegsejteket tartalmazó agyszeleteket előkészítettük a fénymikroszkópos vizsgálatokra. Az agyszeleteket 4% paraformaldehid, 15% pikrin sav és 1,25% glutáraldehid tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatba (pH= 7,4) helyeztük és ezen oldatban tartottuk 4°C-on legalább 12 óráig. A fixáló oldatot többszöri 0,1 M foszfátpuffer oldattal történő átmosással eltávolítottuk a szeletekről. Ezt követően 10%, majd 20% szacharóz tartalmú foszfátpuffer oldatba helyeztük a szeleteket. Az agyszeleteket néhány másodpercig folyékony nitrogénben fagyasztottuk, ezt követően 10%-os zselatinba ágyaztuk és hideg foszfát puffer oldatban újra metszettük 60 μ m vastag metszetekre (Leica VT 1000S mikrotóm). A metszeteket tris pufferben oldott (pH= 7,4) avidin-biotin peroxidáz komplexben (1:100; Vector Labs) tároltuk 4°C-on egy éjszakán át. Az enzimreakcióhoz kromogénként 0,05%-os 3’3-diaminobenzidine tetrahidrokloridot (DAB), oxidánsként pedig 0,01 %-os H₂O₂-ot használtunk. A szeleteket utó-fixáltuk 1% OsO₄ tartalmú 0.1 M foszfátpuffer oldatban. Többszöri desztillált vízzel történő mosást követően pedig 1%-os uranil-acetáttal kezeltük és felszálló alkoholsorral dehidratáltuk. Végezetül epoxigyantába (Durcupan,

SigmaAldrich, USA) ágyaztuk és tárgylemezre helyeztük. A metszeteket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk, illetve rekonstruáltuk (NeuroLucida). A lehetséges szinaptikus helyeket megjelöltük és a 3 dimenziós rekonstrukciók alapján lemértük a szómától való távolságukat.

Dendrit-hossz és vastagság mérése

A dendritikus és axonális elvezetések után készített Z-stackeken a mérési pontok közötti nyúlványszakaszokat rekonstruáltuk, és meghatároztuk hosszukat (ImageJ, Simple Neurite Tracer plugin). A rekonstruált szakaszok vastagságát az SNT „fitting” algoritmusával határoztuk meg. A dendriteket az átlagos vastagság értékükkel jellemeztük.

Elektrofiziológiai jelek analízise

Elvezetéseinket saját fejlesztésű python scriptekkel analizáltuk. Méréseinket ASCII formátumba kiexportáltuk (HEKA, Fitmaster). A páros elvezetések esetében a szinaptikus látenciát a preszinaptikus sejten kiváltott akciós potenciál és a posztszinaptikus sejten megjelenő EPSP onsetje közötti időkülönbségként határoztuk meg.

A szomato-dendritikus elvezetések analízise során a visszaterjedő AP-k látenciájának mérését a két elvezetési ponton mért hullámformák különböző pontjain is elvégeztük. Hasonlóan jártunk el a szomato-axonális illetve a szimulált EPSP elvezetésekénél is. A dolgozat ábráin a jelek csúcsonál mért latenciái és ezekből számolt sebesség értékek láthatóak.

A specifikus membránkapacitás meghatározásához készített *nucleated patch* elvezetéseket Clampfit (Molecular Devices) programmal értékeltük ki. Az egyedi méréseken belül a kapacitív tranzienseket átlagoltuk, majd kivontuk belőlük a mérés végén regisztrált reziduális kapacitás meghatározása céljából felvett átfutások átlagát. Az így kapott kapacitív tranziensek felszálló ágára exponenciális görbét illesztettünk, oly módon, hogy az illesztést a tranziens negatív csúcspontjától 10 μ s-al később kezdtük és a csúcspont után 300 μ s-mal határoztuk meg az illesztés végpontját. Az exponenciális illesztést extrapoláltuk a feszültség lépcső kezdőpontjáig. Az így kapott exponenciális görbe τ értékét használtuk a sejtmagot körülzáró membrán kapacitásának kiszámításához. A nucleus kapacitás értékét ezt követően felületegységre vonatkoztattuk.

Membrán vastagság mérése

A sejtmembránok vastagságának mérését egy, a csoportunk korábbi publikációjához (Molnár et al., 2016) már felhasznált adatsoron végeztük. A transzmissziós elektronmikroszkópos képeken olyan membrán struktúrákat kerestünk melyek egyértelműen dendritekhez tartoztak, erre

az adott metszeten a posztszinaptikus denzitás jelenlétéből következtettünk. A vastagság méréseket a posztszinaptikus denzitásoktól legalább 20 nm-re végeztük. A membránra merőleges vonalat húztunk és e vonal mentén megvizsgáltuk, hogy mely pontokon haladja meg a gradiens magnitúdó az 50-es küszöbértéket, majd a két pont távolságát lemértük a vonal mentén.

Modellezés

Számítógépes modellt terveztünk, hogy megvizsgáljuk a dendritikus vastagság, az aktív és passzív membránparaméterek hatását az AP-k alakjára és terjedési sebességére. A modell egy szomatikus kompartmentből, egy axonális és egy dendritikus kábel kompartmentből állt, mindkettő 200 μm hosszúságú volt. Az axonális és a dendritikus kábel átmérőjét 1,6, illetve 1,2 mm értékre állítottuk be. A modellneuron szomatikus membránkapacitását 40 pF-re, míg a kábel kompartmentek felületi kapacitását 20 fF/mm² értékre. A szomatikus szivárgási konduktancia 1,0 nS volt, a szivárgási áram reverz potenciálja pedig -62 mV. A modell 7 feszültségfüggő áramot tartalmazott, nevezetesen a tranziens és perzisztens Na-áramok, a késleltetett egyenirányító K-áram, a h-áram, a lassan aktiválódó M-típusú K-áram, a magas feszültséggel aktiválódó Ca-áram és a Ca-dependens K-áram. A feszültségfüggő tranziens Na-, M- és Kd-áramok az axonális és szomatikus kompartmentekhez, míg a perzisztens Na-, h-, Ca- és K(Ca)-áramok a szomatikus és dendritikus kompartmentekhez lettek hozzárendelve. A modellt a biológiai neuronoknál használt stimulációnak megfelelő áramlépcső protokollal teszteltük (0,5 s időtartamú négyszög impulzusok -100 pA-tól kezdődően, +20 pA-val növelve). A szimulált szomatikus áraminjekcióra kialakuló AP-k dendritbe történő visszaterjedésének késését a hullámforma csúcsánál mértük.

Eredmények

Szinaptikus latenciák ember és patkány mikrohálózatban

Tapasztalható-e különbség az ember és patkány neokortikális mikrohálózatának időbeli felbontásában? Páros elvezetéseket végeztünk piramissejt-piramissejt sejt párokból, e kérdés vizsgálatára.

A páros elvezetések során mind a pre- mind a postszinaptikus sejtet current-clamp módban tartva a preszinaptikus sejtben kiváltott AP-t követő posztszinaptikus válaszok latenciáit vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondható, hogy nem találtunk szignifikáns különbséget a patkányokból (n=24), illetve a humán mintákból (n=30) mért páros elvezetésekben a szinaptikus latenciák között (patkány: $1,132 \pm 0,239$ ms, ember: $1,122 \pm 0,381$ ms, Mann-Whitney teszt: $P=0.657$). Az elektrofiziológiai méréseket követően a sejt pároknak egy részét, melyeken mind a preszinaptikus axonok mind a posztszinaptikus dendritek hiánytalanul jelölve lettek (n=5 patkány, n=8 ember) fénymikroszkópos analízisnek vetettük alá. A lehetséges szinaptikus kontakt helyek sejttesttől való távolságát megmértük mind a poszt- mind a preszinaptikus sejteken. A preszinaptikus sejtek szinaptikus helyekig vezető axonjainak és a szinaptikus helyektől a posztszinaptikus sejt sejttestéig vezető dendritek hosszát lemértük, majd e két szám összegeként határoztuk meg az interszomatikus hosszt. Az így kapott eredmények alapján elmondható, hogy az emberi mintákból származó sejt párok esetében szignifikánsan hosszabb interszomatikus távolságot tapasztaltunk a patkány mintákhoz képest (patkány: $262,22 \pm 53,639$ μm , ember: $385,7 \pm 74,277$ μm , két mintás t-teszt: $P = 0,008$).

Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az emberi neuron hálózatokban az információ terjedése gyorsabb a rágcsálókhoz képest. De mi okozhatja a két faj közötti különbséget? E kérdés megválaszolására a nyúlványok vezetési sebességének direkt mérése adhat választ.

Axonális terjedési sebesség mérése

Az axonális szignál propagáció sebességének meghatározásához szimultán whole-cell clamp elvezetéseket végeztünk II/III rétegi piramissejt szómájáról és axon bleb-jeiről. A sejteken szomatikus áraminjekcióval kiváltott AP-ok két elektródán történő megjelenésük latenciájából és az axon hosszából hozzávetőlegesen ki lehet számolni az axonális vezetési sebességet. Feltételezve hogy az AP-k kialakulási helye a két fajban azonos távolságra van a

sejttesttől, a két elvezetési ponton mért szomatikusan kiváltott AP-k csúcsának megjelenése közötti időkülönbségben nem találtunk szignifikáns különbséget a két fajban. Méréseink alapján elmondható, hogy a patkány és ember II/III rétegi piramissejtjeinek axonjain hasonló sebességgel futnak végig az AP-k (patkány: $n=8, 0,848 \pm 0,291$ m/s, ember: $n=9, 0,851 \pm 0,387$ m/s, kétmintás t-teszt: $p=0,282$).

Mivel az axonális elvezetéseink eredményei nem magyarázzák a két faj közötti információ áramlási sebesség különbséget melyet a páros elvezetések során tapasztaltunk, a dendritek szisztematikus vizsgálatát kezdtük meg.

Szimulált EPSP-k terjedési sebességének vizsgálata

Szimultán elvezetések végeztünk piramissejtek sejttestjéről és apikális dendritjeiről, melynek során mind dendritikus és szomatikus áraminjekcióra kialakuló membránpotenciál változások terjedését vizsgáltuk a sejteken. Elsőként a dendritikus elvezetési elektródán keresztül serkentő postszinaptikus áramhoz hasonló formájú áraminjekciót végeztünk, mely során a dendritikus elvezetési helyen kialakított membránpotenciálváltozás szómába történő terjedésének sebességét vizsgáltuk. E szimulált EPSP-k (sEPSP) terjedési sebessége szignifikánsan gyorsabb volt az ember dendritjeiben, mint a patkány dendritekben (patkány: $0,074 \pm 0,018$ m/s vs. ember: $0,093 \pm 0,025$ m/s, két mintás t teszt: $P = 0,004$). Ezt követően megvizsgáltuk e dendritekben a bAP-k terjedési sebességét is és szignifikáns korrelációt találtunk a dendritek ortogonális és retrográd vezetési sebessége között.

Mivel a dendritikus áraminjekció hatására méréseink jelentős részében a mérés minősége jelentősen romlott (nagy szivárgó áramokat mértünk az áraminjekció után), és szignifikáns korrelációt tapasztaltunk a dendritek különböző irányba történő vezetése között, a további farmakológiai kísérleteinket szomatikus áraminjekcióra adott AP-k dendritbe történő visszaerjedésén végeztük. Ehhez elsőként alaposabban megvizsgáltuk, hogy a bAP-k terjedési sebességében tapasztalható-e bármi különbség a két fajban.

Visszaerjedő akciós potenciálok terjedési sebessége

A bAP-k terjedési sebessége patkányban $0,233 \pm 0,095$ m/s míg emberben szignifikánsan nagyobb, $0,344 \pm 0,139$ m/s sebesség értékeket mértünk (Mann-Whitney teszt: $P = 6,369 \times 10^{-6}$).

Méréseink alapján tehát elmondható, hogy az ember dendritjeiben mind a dendritek felől a szóma felé mind a sejttest felől a dendritek felé szignifikánsan gyorsabban terjednek az elektromos jelek. Az ortodromikus vezetés ~1,26-szor gyorsabb míg a bAP-k terjedési sebessége ~1,47-szer gyorsabb volt a humán dendritekben a patkányokhoz képest.

Az elektromos jelek terjedésében fontos szerepet játszanak a különböző feszültség- függő ioncsatornák. Korábbi munkák már kimutatták hogy a HCN csatornák denzitásában számottevő különbségek tapasztalhatóak rágcsálók és ember között. Kalmbach és munkatársai modellezési kísérleteik alapján azt jósolták, hogy a HCN csatornák konduktanciájának eliminálása megnöveli a szinaptikus jelek sejttestbe történő terjedésének késését. De vajon az általuk tapasztalt különbségek a két faj között magyarázzák-e a dendritikus vezetési sebességében általunk megfigyelt differenciát? E kérdés megválaszolására a HCN csatornák specifikus blokkolásával történő kísérleteket végeztünk. 10 perc kontroll szakasz felvétele után 20 μ M ZD7288 mostunk a sejtre és további 20-30 percig mértük a bAP-k terjedési sebességét. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a HCN csatornák blokkolása a dendritikus vezetési sebesség enyhe csökkenéséhez vezetett mindkét fajban (patkány: kontroll: $0,163 \pm 0,054$ m/s, ZD7288: $0,149 \pm 0,057$ m/s, n = 9, páros mintás t teszt: P = 0,062) és e változás az emberi piramis sejtek esetén statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (kontroll: $0,322 \pm 0,073$ m/s, ZD7288: $0,268 \pm 0,066$ m/s, n = 8, páros mintás t teszt: P = 0,022). A humán sejteken tapasztalt jelentősebb változás a HCN csatornák konduktanciájának kikapcsolásának hatására egybevág Kalmbach és munkatársai eredményeivel, hiszen az ember neocorticális II/III. rétegi piramis sejtjein több HCN csatornát találhatunk, mint a rágcsálókén, így ezek gátlása prominensebb hatást kell, hogy mutasson elektrofiziológiai elvezetésekben. Esetünkben az ember apikális dendritjeiben szignifikánsan nagyobb csökkenést találtunk a HCN csatornák blokkolását követően a patkányhoz képest (patkány: $-0,014 \pm 0,019$ m/s, ember: $-0,054 \pm 0,052$ m/s, két mintás t teszt: P = 0,048). Ennek ellenére kijelenthető, hogy a két faj között megfigyelhető különbség a HCN csatornák tulajdonságaiban önmagában nem elegendőek ahhoz, hogy az emberi sejtekre jellemző nagyobb vezetési sebességet kialakítsák, hiszen a csatorna blokkolását követően a humán sejtek még mindig gyorsabb vezetési sebességgel voltak jellemezhetőek.

Előfordulhat, hogy a HCN csatornához hasonló különbségek más feszültség függő csatorna esetén is fennállnak a két faj között. A bAP-k terjedésében jelentős szerepet játszanak a

feszültség függő Na⁺ csatornák. Felmerül a kérdés, vajon a dendritikus regeneratív események kialakításában szerepet játszó feszültség függő csatornák közötti különbségek okozhatják-e az emberi sejtekre jellemző nagyobb vezetési sebességet? E kérdés megválaszolására további farmakológiai kísérleteket végeztünk. Szimultán szomato-dendritikus elvezetéseink során 10 perc kontroll szakasz felvételét követően 1 μM TTX-et, 200 μM CdCl₂-ot, és 20 μM AP5-ot tartalmazó aCSF-et mostunk a szeleteinkre a feszültség függő Na, Ca, és NMDA csatornák blokkolása céljából. Ennek köszönhetően a dendriteket közel passzív állapotba hoztuk, tehát a bAP-k terjedését a dendritek kábel tulajdonságai határozták meg. Mind a patkány, mind az ember piramissejtjein a feszültség-függő csatornák blokkolása szignifikánsan csökkentette a dendritikus vezetési sebességet (patkány kontroll: $0,199 \pm 0,053$ m/s, patkány TTX/CdCl₂/AP5: $0,076 \pm 0,03$ m/s, páros mintás t teszt: $P = 2,099 \times 10^{-5}$, ember kontroll: $0,395 \pm 0,14$ m/s, ember TTX/CdCl₂/AP5: $0,184 \pm 0,061$ m/s, Wilcoxon teszt: $P = 0,016$).

E farmakológiai módszerrel „passzív” állapotba hozott dendriteken továbbra is megfigyelhető volt, hogy a humán sejtek nyúlványain a jelek szignifikánsan gyorsabban futnak végig a patkány sejtek nyúlványaihoz képest (patkány: $0,076 \pm 0,03$ m/s, n = 8, ember: $0,184 \pm 0,061$ m/s, n = 8, Mann-Whitney teszt: $P = 0,001$).

Mindezt összevetve arra a következtetésre jutottunk, hogy a két faj közötti különbséget a passzív paraméterek további vizsgálatával tudjuk jobban megérteni.

Ember és patkány piramissejtek specifikus membrán kapacitása

A páros elvezetéseink és szimultán szomato-dendritikus méréseink alapján tehát arra következtethetünk, hogy az ember piramissejtjein az ingerület gyorsabban futhat végig, és a két faj közötti különbség nem a feszültség-függő ioncsatornák fajonkénti jellegzetes tulajdonságaiból adódik. Ha a sejtek nyúlványait passzív kábelekként képzeljük el, akkor alapvetően két paraméter befolyásolhatja az elektromos jelek terjedésének sebességét. A sejtmembrán kapacitása, illetve a nyúlvány axiális ellenállása.

Mivel a szakirodalomban ellentmondásos eredmények találhatóak az emberi és rágcsáló sejtek specifikus membrán kapacitását tekintve szükségesnek éreztük saját mérések elvégzését. *Nucleated patch*-eket húztunk II-III. rétegi piramissejtekből, majd ezen membránok felületét és kapacitás értékét felhasználva kiszámoltuk a sejtekre jellemző fajlagos membrán kapacitást (C_m).

A C_m értékben nem találtunk különbséget a két fajban (patkány: $n = 20$, $1,092 \pm 0,14 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, ember: $n = 19$, $0,987 \pm 0,196 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, két mintás t teszt: $P = 0,0615$). A fajlagos membrán kapacitást a membrán dielektromos állandója, és a két töltéssel rendelkező térrészt elválasztó szigetelő vastagsága, következésképpen a membrán vastagsága határozza meg. A sejt membránjának vastagságát kísérletes úton mérni lehet. Az elektrofiziológiai fajlagos membránkapacitás méréseink megerősítése céljából transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken megvizsgáltuk, hogy tapasztalható-e különbség a sejtmembrán vastagságában a két fajban. Ha a sejtmembrán vastagabb, az a kapacitásának csökkenését okozza, mivel az ionok által létrehozott elektromágneses kölcsönhatás a membrán túlsó oldalán jelentősen lecsökken. Elektronmikroszkópos felvételeinken olyan struktúrák membránjának vastagságát mértük le, melyek egyértelműen beköthetőek voltak egy dendrithez. A sejtmembrán vastagságában nem találtunk különbséget a két fajban (patkány: $n = 3$, ROI $n = 151$, $4,122 \pm 0,779 \text{ nm}$, ember: $n = 3$, ROI $n = 213$, $4,271 \pm 0,873 \text{ nm}$, Mann-Whitney teszt: $P = 0,212$). Elektrofiziológiai eredményeinket tehát egy független módszerrel is alátámasztottuk.

Ez alapján kijelenthető, hogy a különböző fajokból származó sejtek ingerületvezetési sebességében tapasztalt különbség oka nem a fajlagos membránkapacitásban keresendő.

A dendritek vastagsága

Egy nyúlvány vezetési sebessége függhet az axiális rezisztenciájától. Az axiális rezisztenciát két paraméter képes befolyásolni: a nyúlvány citoplazmájának összetétele, illetve a nyúlvány vastagsága. Mivel méréseink során a szomatikus elektródán keresztül dializáltuk a sejteket, így juttatva az intracelluláris térbe a fluoreszcens jelölő anyagot, ezért a citoplazma összetételének esetleges különbségeit így jelentősen csökkentettük. Ennek következtében azt feltételeztük, hogy a dendritszakaszok axiális ellenállását túlnyomó részben a nyúlványok vastagsága határozta meg a méréseink során. A mért dendritszakaszokról Z irányú sorozatképet készítettünk 2 foton mikroszkóppal. Az így kapott képeken rekonstruáltuk a mért nyúlványokat, melyeknek vastagságát lemértük. A sejttest és a dendriten történt elvezetési pontok közötti átlagos dendritikus vastagságot minden mért sejtre meghatároztuk. Az általunk mért ember mintákban a dendritikus vastagság (a nyúlvány átlagos átmérője) szignifikánsan nagyobb volt, mint a patkány minták esetében (ember: $n = 62$, $2,272 \pm 0,584 \mu\text{m}$; patkány: $n = 46$, $2,032 \pm 0,413 \mu\text{m}$, két mintás t teszt: $P = 0,019$). Mind a patkány, mind a humán sejteknél pozitív korrelációt tapasztaltunk az elvezetett nyúlványok vastagsága és vezetési sebesség között.

Mindezek alapján elmondható, hogy az ember agykérgének piramisneuronjainak dendritjein gyorsabban képes az ingerület végigfutni, és ennek háttérben az az egyszerű biofizikai tulajdonság állhat, hogy a neuronok nyúlványai vastagabbak és ennek köszönhetően az axiális ellenállásuk kisebb, illetve hozzájárulhat továbbá a HCN csatornák magasabb expressziója a dendritben. A dendritvastagság és a vezetési sebesség közötti ok-okozati kapcsolat feltárása kísérletes módszerekkel nehezen vizsgálható, hiszen ehhez olyan intervenciót kellene alkalmazni a mérések során, melyek hatására a dendritikus átmérő megváltozik, de a sejt alapvető fiziológiai paramétereire nincs hatással. Mivel ez technikailag szinte kivitelezhetetlen, a modellezés adta lehetőségek kihasználásával próbáltuk a feltételezett ok-okozati viszonyt feltárni.

A dendrit vastagságának hatása a vezetési sebességre modellben

A dendritek vastagságának vezetési sebességre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából egy viszonylag egyszerű modellt építettünk, melyben a sejttestet egy izoelektromos gömbbel, a dendritet és az axont pedig egy-egy hosszanti irányban állandó átmérőjű hengerrel helyettesítettük. Az axonban és a dendritben különböző feszültségfüggő csatornákat helyeztünk el, melyek eloszlását a modell számos fiziológiai jellemzőjét reprodukálta egy agykérgi neuronnak.

A modellben megvizsgáltuk, miként működnek a dendritek passzív állapotban, illetve ha aktív konduktanciákkal rendelkeznek. A szimuláció közben a különböző paramétereket fixen tartottuk, csupán a nyúlványok vastagságát változtattuk, és mértük a visszaterjedő AP-k csúcánál mérhető késést a sejttesthez képest, majd kiszámoltuk a terjedési sebességet.

E viszonylag egyszerű modell alkalmasnak bizonyult arra, hogy a dendritikus vastagság és a vezetési sebesség között fennálló ok-okozati viszonyt feltárjuk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a dendritikus átmérő változtatásával arányosan nőtt a vezetési sebesség mind a passzív, mind az aktív dendritekben.

Eredmények megbeszélése

A neurobiológiában már régóta ismert tény, hogy a különböző állatok agyát különböző méretű sejtek építik fel. Már a korai EEG elvezetések is azt mutatták, hogy az agykéregben mind a kiváltott válaszok, mind a spontán oszcillációk hasonló konzervált temporális dinamikákat mutatnak. Ezért már régóta felmerült a kérdés, vajon az ingerület terjedése gyorsabb azokban a fajokban, amelyekben nagyobbak a sejtek?

Kísérleteinkhez a széleskörben elterjedt rágcsáló modellt (patkányt) és műtéti úton eltávolított emberi agyszövetet választottunk annak megválaszolására, hogy vajon az emberi agykéreg II/III rétegi piramissejtjei által létrehozott mikrohálózatokban valóban gyorsabb-e az információ áramlása?

Páros elvezetésekkel bemutattunk, hogy az emberi agykéreg piramissejtjei közötti monoszintaptikus kommunikáció hasonló szinaptikus késésekkel jellemezhető, mint a patkány sejtjei közötti, ám emberben az interszomatikus távolság, melyen a jelnek végig kellett futnia átlagosan 1,47-szer hosszabb volt. Ebből az következik, hogy az emberi agykéreg sejtjein az ingerületnek gyorsabban kell végigfutnia. Ezt követően axonális és dendritikus elvezetéseket végeztünk annak vizsgálatára, hogy mely nyúlványtípus játszhat szerepet e jelenségben. Legjobb tudomásunk szerint elsőként vezettünk el emberi axonokról elektromos jeleket, így elsőként határoztuk meg a lokális kapcsolatok távolság tartományába eső axonok vezetési sebességét. Méréseink során nem találtunk szignifikáns különbséget a patkány és ember axonális vezetési sebessége között, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a páros elvezetések során tapasztalt különbségek háttérben a dendritikus tulajdonságok különbségei állhatnak. Dendritikus elvezetéseinkkel meghatároztuk a dendrit felől a sejttest felé, illetve a szóma felől a dendritbe történő elektromos jelek terjedésének sebességét, és mindkét irányba az emberi sejtek gyorsabban vezettek. Mivel a két vezetési irányban mért sebességek között szignifikáns korrelációt tapasztaltunk, a további farmakológiai kísérleteinket a visszaterjedő akciós potenciálok terjedésének vizsgálatával végeztük, mivel e jelek kiváltása és mérése technikailag egyszerűbb. Farmakológiai vizsgálataink alapján kijelenthető, hogy az ember agykérgi piramissejtjein tapasztalható magasabb HCN csatorna expresszió hozzájárulhat a gyorsabb vezetési sebességhez, ám önmagában nem elégséges, hogy magyarázza a két faj közötti különbséget. A dendritikus feszültség függő csatornák blokkolása után a passzívra tett dendriteknél is megfigyelhető volt,

hogy a humán dendriteken szignifikánsan gyorsabban futnak végig az elektromos jelek. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a nyúlványok passzív kábel tulajdonságait meghatározó paraméterekben is lehet különbség a két fajban. Elsőként a sejtek fajlagos membránkapacitását vizsgáltuk és nem találtunk szignifikáns különbséget a két faj között. Ezt egy független módszerrel, a membrán vastagságának elektronmikroszkópos vizsgálatával is megerősítettük, hiszen méréseink szerint nincs szignifikáns különbség a két faj membránjának vastagságában. Az axiális ellenállást nagy mértékben befolyásoló nyúlványvastagságban azonban szignifikáns különbséget találtunk, az emberi agykéreg sejteinek nyúlványai vastagabbak voltak, mint a rágcsálóban, mitöbb szignifikáns pozitív korrelációt tapasztaltunk a dendritek átlagos átmérője és vezetési sebességük között. Ez utóbbi megfigyelésünk ok-okozati viszonyait feltárandó modellezéses kísérleteket végeztünk, melyek során bemutattuk, hogy önmagában a sejt nyúlvány vastagságának növelésével, a modellben szereplő többi paraméter fixen tartása mellett a vezetési sebesség is növekedett.

Mindezt összefoglalva a munkánk során bemutattuk, hogy az emberi agykéreg II/III. rétegi piramissejtjeiből felépülő rekurrens serkentő hálózatban az információ terjedésének sebessége magasabb, mint rágcsálóban, és ennek hátterében a dendritikus tulajdonságok közül szerepet játszik a magasabb HCN csatorna expresszió, illetve az emberi neuronokra jellemző nagyobb dendritikus átmérő. E folyamatok állhatnak tehát annak hátterében, hogy a külvilág ingereit hasonló sebességgel tudjuk feldolgozni, mint a minket körülvevő más fajok, annak ellenére, hogy az agyunkat felépítő sejtek jelentősen nagyobbak, minek következtében több kapcsolatot képesek kialakítani és bonyolultabb számításokat is véghez vihetnek.

Közlemények

MTMT azonosító: **10040852**

Összesített IF: **217,858**

G. Oláh*, R. Lákovics*, S. Shapira*, Y. Leibner, A. Szűcs, É. Csajbók, P. Barzó, G. Molnár, I. Segev, G. Tamás, „Accelerated signal propagation speed in human neocortical microcircuits”, *Közlés alatt*.

*: társelsőszerző

*Thomas Chartrand, Rachel Dalley, Jennie Close, Natalia A. Goriounova, Brian R. Lee, Rusty Mann, Jeremy A. Miller, Gabor Molnar, Alice Mukora, Lauren Alfiler, Katherine Baker, Trygve E. Bakken, Jim Berg, Darren Bertagnolli, Thomas Braun, Krissy Brouner, Tamara Casper, Eva Adrienn Csajbok, Nick Dee, Tom Egdorf, Rachel Enstrom, Anna A. Galakhova, Amanda Gary, Emily Gelfand, Jeff Goldy, Kristen Hadley, Tim S. Heistek, DiJon Hill, Nik Jorstad, Lisa Kim, Agnes Katalin Kocsis, Lauren Kruse, Michael Kunst, Gabriela Leon, Brian Long, Matthew Mallory, Medea McGraw, Delissa McMillen, Erica J. Melief, Norbert Mihut, Lindsay Ng, Julie Nyhus, **Gáspár Oláh**, Attila Ozsvár, Victoria Omstead, Zoltan Peterfi, Alice Pom, Lydia Potekhina, Ramkumar Rajanbabu, Marton Rozsa, Augustin Ruiz, Joanna Sandle, Susan M. Sunkin, Ildiko Szots, Michael Tieu, Martin Toth, Jessica Trinh, Sara Vargas, David Vumbaco, Grace Williams, Julia Wilson, Zizhen Yao, Pal Barzo, Charles Cobbs, Richard G. Ellenbogen, Luke Esposito, Manuel Ferreira, Nathan W. Gouwens, Benjamin Grannan, Ryder P. Gwinn, Jason S. Hauptman, Tim Jarsky, C. Dirk Keene, Andrew L. Ko, Christof Koch, Jeffrey G. Ojemann, Anoop Patel, Jacob Ruzevick, Daniel L. Silbergeld, Kimberly Smith, Staci A. Sorensen, Bosiljka Tasic, Jonathan T. Ting, Jack Waters, Christiaan P.J. de Kock, Huib D. Mansvelder, Gabor Tamas, Hongkui Zeng, Brian Kalmbach, Ed S. Lein, „Morphoelectric and transcriptomic divergence of the layer 1 interneuron repertoire in human versus mouse neocortex”, *SCIENCE*, 382, eadf0805, 2023*

IF: 63.83

*M. Rózsa, M. Tóth, **G. Oláh**, J. Baka, R. Lákovics, P. Barzó, G. Tamás, “Temporal disparity of action potentials triggered in axon initial segments and distal axons in the neocortex”, *SCIENCE ADVANCES*, 9, eade4511, 2023*

IF: 13.6

J. Berg, S. A. Sorensen, J. T. Ting, J. A. Miller, T. Chartrand, A. Buchin, T. E. Bakken, A. Budzillo, N. Dee, S.-L. Ding, N. W. Gouwens, R. D. Hodge, B. Kalmbach, C. Lee, B. R. Lee, L. Alfiler, K. Baker, E. Barkan, A. Beller, K. Berry, D. Bertagnolli, K. Bickley, J. Bomben, T. Braun, K. Brouner, T. Casper, P. Chong, K. Crichton, R. Dalley, F. R. de, T. Desta, S. D. Lee, F. D’Orazi, N. Dotson, T. Egdorf, R. Enstrom, C. Farrell, D. Feng, O. Fong, S. Furdan, A. A. Galakhova, C. Gamlin, A. Gary, A. Glandon, J. Goldy, M. Gorham, N. A. Goriounova, S. Gratiy, L. Graybuck, H. Gu, K. Hadley, N. Hansen, T. S.

Heistek, A. M. Henry, D. B. Heyer, D. J. Hill, C. Hill, M. Hupp, T. Jarsky, S. Kebede, L. Keene, L. Kim, M.-H. Kim, M. Kroll, C. Latimer, B. P. Levi, K. E. Link, M. Mallory, R. Mann, D. Marshall, M. Maxwell, M. McGraw, D. McMillen, E. Melief, E. J. Mertens, L. Mezei, N. Mihut, S. Mok, G. Molnar, A. Mukora, L. Ng, K. Ngo, P. R. Nicovich, J. Nyhus, **G. Olah**, A. Oldre, V. Omstead, A. Ozsvár, D. Park, H. Peng, T. Pham, C. A. Pom, L. Potekhina, R. Rajanbabu, S. Ransford, D. Reid, C. Rimorin, A. Ruiz, D. Sandman, J. Sulc, S. M. Sunkin, A. Szafer, V. Szemenyei, E. R. Thomsen, M. Tieu, A. Torkelson, J. Trinh, H. Tung, W. Wakeman, F. Waleboer, K. Ward, R. Wilbers, G. Williams, Z. Yao, J.-G. Yoon, C. Anastassiou, A. Arkhipov, P. Barzo, A. Bernard, C. Cobbs, W. H. P. C. de, R. G. Ellenbogen, L. Esposito, M. Ferreira, R. P. Gwinn, M. J. Hawrylycz, P. R. Hof, S. Idema, A. R. Jones, C. D. Keene, A. L. Ko, G. J. Murphy, L. Ng, J. G. Ojemann, A. P. Patel, J. W. Phillips, D. L. Silbergeld, K. Smith, B. Tasic, R. Yuste, I. Segev, K. C. P. J. de, H. D. Mansvelder, G. Tamas, H. Zeng, C. Koch, and E. S. Lein, “Human neocortical expansion involves glutamatergic neuron diversification,” *NATURE*, vol. 598, no. 7879, pp. 151–158, 2021.

IF: 69,504

A. Ozsvár, G. Komlosi, **G. Olah**, J. Baka, G. Molnar, and G. Tamas, “Predominantly linear summation of metabotropic postsynaptic potentials follows coactivation of neurogliaform interneurons,” *ELIFE*, vol. 10, 2021.

IF: 8,713

K. Koos*, **G. Olah***, T. Balassa, N. Mihut, M. Rozsa, A. Ozsvár, E. Tasnadi, P. Barzo, N. Farago, L. Puskas, G. Molnar, J. Molnar, G. Tamas, and P. Horvath, “Automatic deep learning-driven label-free image-guided patch clamp system,” *NATURE COMMUNICATIONS*, vol. 12, no. 1, 2021.

*: társelsőszerző

IF: 17,694

E. Boldog, T. Bakken, R. Hodge, M. Novotny, B. Aevertmann, J. Baka, S. Borde, J. Close, F. Diez-Fuertes, S. Ding, N. Farago, A. Kocsis, B. Kovacs, Z. Maltzer, J. McCarrison, J. Miller, G. Molnar, **G. Olah**, A. Ozsvár, M. Rozsa, S. Shehata, K. Smith, S. Sunkin, D. Tran, P. Venepally, A. Wall, L. Puskas, P. Barzo, F. Steemers, N. Schork, R. Scheuermann, R. Lasken, E. Lein, and G. Tamas, “Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type,” *NATURE NEUROSCIENCE*, vol. 21, no. 9, pp. 1185–1195, 2018.

IF: 21,126

N. Farago, A. Kocsis, C. Brasko, S. Lovas, M. Rozsa, J. Baka, B. Kovacs, K. Mikite, V. Szemenyei, G. Molnar, A. Ozsvár, **G. Olah**, I. Piszar, A. Zvara, A. Patocs, P. Barzo, L. Puskas, and G. Tamas, “Human neuronal changes in brain edema and increased intracranial pressure,” *ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS*, vol. 4, no. 1, 2016.

IF: 5,414

K. Kocsis, L. Knapp, L. Gellert, **G. Olah**, Z. Kis, H. Takakuwa, N. Iwamori, E. Ono, J. Toldi, and T. Farkas, “Acetyl-L-carnitine normalizes the impaired long-term potentiation and spine density in a rat model of global ischemia,” *NEUROSCIENCE*, vol. 269, pp. 265–272, 2014.

IF: 3,327

L. Knapp, L. Gellért, J. Herédi, K. Kocsis, **G. Oláh**, J. Fuzik, Z. Kis, L. Vécsei, J. Toldi, and T. Farkas, "A simple novel technique to induce short-lasting local brain ischaemia in the rat," *NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY*, vol. 40, no. 5, pp. 603–609, 2014.

IF: 4,970

G. Oláh, J. Herédi, A. Menyhárt, Z. Czinege, D. Nagy, J. Fuzik, K. Kocsis, L. Knapp, E. Krucsó, L. Gellért, Z. Kis, T. Farkas, F. Fülöp, A. Párdutz, J. Tajti, L. Vécsei, and J. Toldi, "Unexpected effects of peripherally administered kynurenic acid on cortical spreading depression and related blood-brain barrier permeability," *DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY*, vol. 7, pp. 981–987, 2013.

IF: 3,026

L. Gellert, L. Knapp, K. Nemeth, J. Heredi, D. Varga, **G. Olah**, K. Kocsis, A. Menyhart, Z. Kis, T. Farkas, L. Vecsei, and J. Toldi, "Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion," *NEUROSCIENCE*, vol. 247, pp. 95–101, 2013.

IF: 3,327

J. Fuzik, L. Gellért, **G. Oláh**, J. Herédi, K. Kocsis, L. Knapp, D. Nagy, Z. Kincses, Z. Kis, T. Farkas, and J. Toldi, "Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia," *NEUROSCIENCE*, vol. 228, pp. 371–381, 2013.

IF: 3,327

G. Oláh, D. Nagy, M. Marosi, T. Farkas, Z. Kis, Á. Párdutz, J. Tajti, V. László, and J. Toldi, "Spreading depression and evoked potentials recorded in the somatosensory cortex of the rat," *ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS*, vol. 54, no. 2, pp. 161–164, 2010.

IF: -