

Életkorfüggő morfo-elektrofiziológiai különbségek és a dendritikus Ca^{2+} -dinamika vizsgálata emberi agykérgi piramissejtekben.

Doktori értekezés

Szöts Ildikó

Témavezető:

Dr. Molnár Gábor

Egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem



Szeged

2025

Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
Az agykéreg felépítése.....	5
Életkorral összefüggő változások az idegsejtekben.....	6
Visszaterjedő akciós potenciál.....	7
2. Célkitűzés.....	10
3. Közreműködések.....	11
4. Anyagok és módszerek	12
Túlélő agyszelet preparátumok készítése	12
<i>In vitro</i> elektrofiziológiai elvezetések.....	12
Két-foton Ca^{2+} -képalkotás	13
Elektrofiziológiai adatok analízise.....	14
Hisztológia	16
Háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció	16
Statisztika.....	17
5. Eredmények.....	18
Életkorfüggő különbségek a küszöb alatti membrántulajdonságokban.....	18
Korcsoportok közötti különbségek az akciós potenciál kinetikájában	20
A tüzelési mintázat korfüggő különbségei.....	24
Az emberi agykérgi szupragranuláris piramissejtjeinek morfológiai jellemzői az élet különböző szakaszaiban.....	25
Szomatikus akciós potenciál által indukált Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó-eloszlása az apikális dendrit mentén.....	31
Ca^{2+} -csatorna altípusok hozzájárulása a Ca^{2+} -jelek amplitúdójához az apikális dendritben	33
A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóinak térbeli profilja az elsődleges és a leágazó apikális dendriteken.....	36

6. Diszkusszió	38
Az elektrofiziológiai tulajdonságok életkorral összefüggő változásai	38
A dendritikus arborizáció tulajdonságai és a dendrittüskék eloszlása az életkor függvényében.....	41
Szomatikus akciós potenciál által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek térbeli eloszlása	43
7. Összefoglalás.....	47
Életkorral összefüggő morfológiai és elektrofiziológiai különbségek emberi agykérgi piramissejtekben	47
A visszaterjedő akciós potenciálok által kiváltott kalcium-tranziensek térbeli profilja humán agykérgi piramissejt dendritekben	48
8. Summary	51
Age-related differences in morphophysiological properties of human cortical pyramidal cells	51
Spatial profile of calcium-transients evoked by backpropagating action potential in human cortical pyramidal dendrites.....	52
9. Köszönetnyilvánítás	54
10. Irodalomjegyzék	55

Ábrajegyzék

1. ábra: Ramón y Cajal rajza, amely az agykéreg rétegeit mutatja be	5
2. ábra: Az idegsejtek küszöb alatti tulajdonságainak életszakaszok közötti különbségei	20
3. ábra: Életkorral kapcsolatos különbségek az akciós potenciál kinetikájában	22
4. ábra: Elektrofiziológiai különbségek az első életévben	23
5. ábra: Az AP tüzelési mintázatának életkor függése	25
6. ábra: A vizsgált humán L2/3 piramissejtek 3D rekonstrukciói	26
7. ábra: A humán L2/3 piramissejtjeinek morfológiai jellemzői az élet különböző szakaszaiban	28
8. ábra: Dendrittüskék számának összehasonlítása a csecsemő és az időskori korcsoportok piramissejtei között	30
9. ábra: Szomatikus akciós potenciál által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó-eloszlása az apikális dendrit mentén	33
10. ábra: Specifikus VGCC blokkolók hatása a kiváltott Ca^{2+} -jelekre különböző dendritikus régiókban	35
11. ábra: A tranziensek amplitúdó-eloszlása a szómától való távolság függvényében az elsődleges és a leágazó dendriteken	37

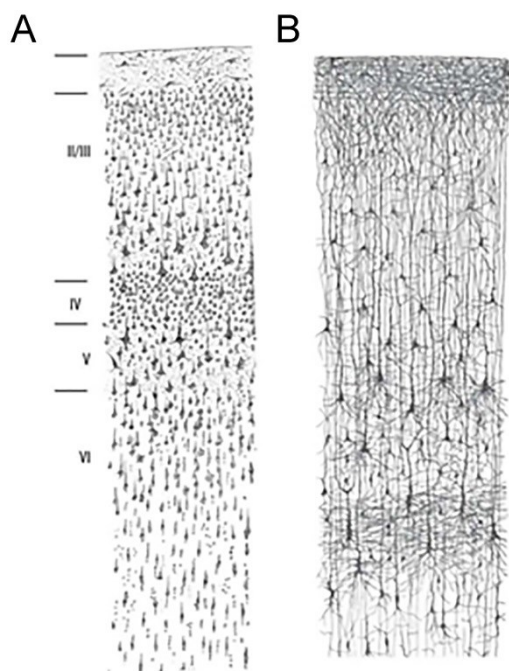
Rövidítések jegyzéke

ADP	Utódepolarizáció (<i>afterdepolarization</i>)
AHP	Utóhiperpolarizáció (<i>afterhyperpolarization</i>)
AP	Akciós potenciál
bAP	Visszaterjedő akciós potenciál (<i>backpropagating action potential</i>)
DIC	Infravörös differenciál interferencia kontraszt videómikroszkópia
GABA	Gamma-amino-vajsav (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
HCN	Hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid kapuzott (<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated</i>)
HVA	Magas-feszültség aktivált (<i>high-voltage-activated</i>)
KCNK	Két pórus-doménnel rendelkező K ⁺ -csatorna
L1	I. kortikális réteg (<i>layer 1</i>)
L2/3	II-III. kortikális réteg (<i>layer 2/3</i>)
LVA	Alacsony-feszültség aktivált (<i>low-voltage-activated</i>)
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav
OGB-1	Oregon Green BAPTA - 1
PB	Foszfátpuffer
STDP	AP időzítés-függő plaszticitás (<i>spike timing dependent plasticity</i>)
TBS	Tris-puffer oldat
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
VGCC	Feszültségfüggő Ca ²⁺ -csatorna (<i>voltage-gated calcium channel</i>)
VGSC	Feszültségfüggő Na ⁺ -csatorna (<i>voltage-gated sodium channel</i>)

1. Bevezetés

Az agykéreg felépítése

Az emberi agykéreg a legbonyolultabb sejtszerveződés, az alapvető motoros és szenzoros funkciókon kívül képes más magasabb rendű kognitív és asszociációs funkciókat is ellátni, amelyekért különböző kortikális területek felelősek. A funkcionális területek réteges felépítésében a kortikális rétegek vastagságának aránya eltérő. Az agykérget tartalmazó idegsejtek morfológiai sokszínűségét és annak 6 rétegű struktúráját (1. ábra) Santiago Ramón y Cajal munkásságának köszönhetően már a XIX. század óta ismerjük (Ramón y Cajal, 1904, 1909). Az emberi agykéreg citoarchitektonikailag vizsgálva Brodmann a XX. század elején 52 elkülönülő régióra osztotta (Brodmann, 1909).



1. ábra: Ramón y Cajal rajza, amely az agykéreg rétegeit mutatja be

A: Nissl-festéssel láthatóvá tett sejttestek mikroszkópos felvétele látható, egy felnőtt emberi motoros kérgi területről. A baloldalon római számokkal az agykéreg rétegei vannak jelölve. **B:** Golgi-festési eljárást követően készített mikroszkópos kép látható újszülött emberi agykéreg sejtjeiről (Ramón y Cajal, 1899).

A humán agyat megközelítőleg $8,6 \times 10^{10}$ idegsejt és ezzel körülbelül azonos mennyiségű $8,4 \times 10^{10}$ gliasejt alkotja (Azevedo és mtsai., 2009). A neuronokat neurotranszmitterük alapján két fő csoportra oszthatjuk, a glutamátot termelő, serkentő piramisneuronok, illetve a gamma-aminovajsavat (GABA) termelő, gátló interneuronok csoportjára. A kérgi idegsejtek ~80%-át kitevő piramisneuronok az agykéreg principális sejtjei, a neocortex minden rétegében megtalálhatóak az első réteg kivételével (Winfield és mtsai., 1980). A piramisneuronok felépítése nagyon jellegzetes, azonban az egyes kérgi rétegek, illetve a piramisneuronok transzkriptomikailag

elkülönülő altípusai mutathatnak specifikus morfológiai jellemzőket (Berg és mtsai., 2021). A principális sejtekre jellemző piramis alakú sejttestből - amelyről a nevüket is kapták - egyetlen a *pia mater* (lágyszövet agyhártya) felé irányuló, arra merőleges apikális dendrit, illetve a szóma alapi részéből több bazális dendrit ered. Az apikális dendrit jellemzően sűrűn elágazó, szinte az agyfelszínig húzódó nyúlvány, míg a bazális dendritek általában nem lépnek ki a szómát tartalmazó kérgi rétegből. Szintén a sejttest bazális oldaláról lép ki egyetlen fő axon, amely a fehér állomány felé irányul, innen tovább haladva pedig más kérgi vagy kéreg alatti struktúrákkal alakít ki kapcsolatokat, a fehérállományba lépése előtt leváló oldalágai, kollaterálisai pedig a helyi idegsejtekkel alakítanak ki szinaptikus kapcsolatokat (DeFelipe és Fariñas, 1992). A piramissejtekre továbbá az is jellemző, hogy dendritjeiket dendritikus tüskék tarkítják. A dendrittüskék kulcsfontosságú szerepet töltenek be a kortikális mikrohálózatokban, ugyanis a serkentő szinapszisok elsődleges helyeül szolgálnak, ezenfelül pedig rendkívül képlékeny struktúrák. A dendrittüskék mérete és formája utalhat a rajtuk kialakult szinapszisok erősségére és stabilitására (Matsuzaki és mtsai., 2001; Rodriguez és mtsai., 2008). Morfológiájuk alapján elkülönítjük a nagy tüskefejű gombaszerű, a kis fejűvel rendelkező vékony, a több tüskefejűvel rendelkező elágazó dendrit tüskéket, ezenfelül a hosszú, fejűvel nem rendelkező, vékony filopódiumokat és a tönkszerű tüskéket, amelyek nyak nélkül türemkednek ki a dendriteken (Luebke és mtsai., 2015). A nagyobb fejű tüskék nagyobb posztszinaptikus denzitással, több glutamát receptorral rendelkeznek, ezek alapján a nagyobb dendritikus tüskék funkcionálisan erősebbek, azonban a kisebb tüskék is megnagyobbodhatnak vagy akár el is tűnhetnek a szinaptikus bementek aktivitásától függően (Bourne és Harris, 2008).

Életkorral összefüggő változások az idegsejtekben

A születés után az agy hosszú fejlődési időszakon megy keresztül, amely egy sor összetett és pontosan összehangolt folyamatot foglal magába (Rakic, 2009). A neuronok létrejötte és migrációja a posztnatális fejlődés kezdetén nagyrészt befejeződik, majd születés után a fejlődési folyamatok tovább folytatódnak: a szürke- és fehérállomány megvastagodása, a mielinizáció, a szinaptogenezis, valamint a kezdeti idegpálya-funkcióhoz szükséges alapvető anatómiai architektúra kialakítása. Ezután az agykérgi hálózatokon belüli helyi kapcsolatok finomhangolódnak, és egyre összetettebb, hosszabb távú kapcsolatok jönnek létre a hálózatok között (Stiles és Jernigan, 2010). Az idegrendszer korai fejlődését követően a változások nem

érnek véget, hanem az egész emberi élet során folytatódnak, ezeket többnyire környezeti hatások és tapasztalatok befolyásolják, és ezzel az anyagcsere változásaihoz (Kuzawa és mtsai., 2014), a funkcionális kapcsolatok mintázatainak módosulásához (Kelly és mtsai., 2009), valamint a fehérállomány éréseivel (Yeatman és mtsai., 2014; Beck és mtsai., 2021) a hosszútávú jelátvitel sebességének változásaihoz vezetnek (van Blooij és mtsai., 2023). Az élettartam utolsó fázisa az öregedés, amely során az agy, a szürkeállomány térfogata zsugorodik, a szinapszisok száma és azok plaszticitása is csökken, ami a kognitív jelfeldolgozási funkciók hanyatlásával jár, és gyakran neurodegeneratív betegségekhez vezet (Peters, 2006). Az agykérgi piramisisejt biztosítja a gerjesztő szinaptikus bemeneteket a helyi gátló áramkörök és más piramisisejtek számára, melyek segítségével különálló alhálózatokat hoznak létre (Yoshimura és mtsai., 2005). A piramisisejtek dendritjeinek (Koenderink és Uylings, 1995; Petanjek és mtsai., 2008) és szinapszisainak (Huttenlocher és Dabholkar, 1997) fejlődését és kialakulását az emberi agykéregben a postmortem vizsgálatok bizonyos mértékig dokumentálták, ugyanakkor sokkal kevesebbet tudunk biofizikai éréseükről és elektromos tulajdonságaikról a fejlődés korai szakaszában, valamint a későbbi életkorokban bekövetkező változásukról vagy fenntartásukról. Számos vizsgálat igazolta nem főemlős állatmodelleken, hogy a neuronok elektromos tulajdonságai a korai posztnatális szakaszban markánsan megváltoznak (Molnár és mtsai., 2020). A makákó és rágcsáló piramisisejtek éréseivel kapcsolatban a mérhető membrántulajdonságok (Picken Bahrey és Moody, 2003), a bemeneti ellenállás vagy a kiváltott akciós potenciálok kinetikájának változásáról számoltak be (Elston és Fujita, 2014; Kroon és mtsai., 2019). Mindeddig azonban nem végeztek korosztályokon átívelő vizsgálatokat az emberi piramisisejtek elektrofiziológiai paramétereivel kapcsolatban.

Visszaterjedő akciós potenciál

A kérgi piramisisejtek legnagyobb membrán felületét a dendritikus arborizáció alkotja. A dendritikus nyúlványokhoz korábban csak a beérkező posztszinaptikus események összegzését és annak passzív kábelként a sejttestbe való vezetését kapcsolták. Azonban már tudjuk, hogy a passzív elektromos tulajdonságaik mellett a dendritek aktívan, feszültségfüggő ion csatornák révén hozzájárulnak a beérkező posztszinaptikus potenciálok integrációjához. Cajal korai hipotézise (Ramón y Cajal, 1891) szerint az információ áramlás iránya az idegsejtekben a dendriteken található szinapszistól indulva a dendriteken tovább halad a sejttestbe, innen pedig

az axonon keresztül a következő szinapszis irányába. A dendritek ezzel a hipotézissel ellentétben, két irányban is hordozhatnak információt, ugyanis az axon iniciálisan kialakult akciós potenciál (AP) a szómán keresztül a dendritekbe propagál, visszaterjedő akciós potenciálokat (*backpropagating action potential*, bAP) kialakítva. A bAP dendritekbe való aktív terjedését az itt található feszültségfüggő Na^+ -csatornák (*voltage-gated sodium channel*, VGSC) teszik lehetővé (Stuart és Sakmann, 1994). A piramissejtek szomato-dendritikus régiójában lényegesen kevesebb VGSC helyezkedik el, mint az axonon, illetve a dendrit nyúlványokon való eloszlása sem egyenletes. A leágazó dendrit szakaszokon kisebb a Na^+ -csatornák denzitása, mint az elsődleges dendritikus ágon, illetve a sejttesttől mért távolsággal is összefüggést mutat a VGSC-k mennyisége, disztális irányban haladva csökken a csatornák mennyisége a dendrit arborizáción (Lorincz és Nusser, 2010). A bAP a dendriten terjedve az itt található feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat (*voltage-gated calcium channel*, VGCC) nyitva Ca^{2+} -ionok bejutását okozza az intracelluláris térbe (Jaffe és mtsai., 1992). A terjedő feszültségváltozás emellett a membránban jelenlévő N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) receptorok pórusában található Mg^{2+} -ion eltávolítását is elősegíti, ennek hatására az NMDA receptorok Ca^{2+} -konduktanciáját növeli, ezzel a dendritikus jelfeldolgozást és a sejt gerjeszthetőségét befolyásolva (Fan és mtsai., 2005; Bloodgood és Sabatini, 2009). Ha a bAP-hoz egy preszinaptikus sejt által kiváltott serkentő posztszinaptikus potenciál (EPSP) kapcsolódik, amely során a felszabaduló glutamát neurotranszmitter a dendriten található NMDA receptorokhoz kötődik, azokat nyitva olyan szignáltranszdukciós utakat indít, amely a szinapszis megerősödését idézheti elő (Fuenzalida és mtsai., 2010). Tehát az AP-k aktív visszaterjedése fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás modulációjában. Az AP időzítés függő plaszticitásban (*spike timing dependent plasticity*, STDP) ahhoz, hogy a pre- és egy posztszinaptikus sejt közötti szinaptikus kapcsolat erőssége megváltozzon a sejtpárnak együtt kell aktiválódnia, annak függvényében, hogy a poszt- és a preszinaptikus sejtek egymáshoz képest milyen időablakban tüzelnek a szinaptikus kapcsolat erősödhet vagy gyengülhet (Testa-Silva és mtsai., 2010; olde Scheper és mtsai., 2018).

Az elmúlt évtizedekben egyre szélesebb körben elterjedtek a különféle optikai módszerek az idegsejtek aktivitásának mérésére, ezeknek a technikáknak az alapja főként az intracelluláris Na^+ - illetve Ca^{2+} -tranziensek, amelyek a neuronok aktivitása során a feszültségfüggő ioncsatornákon keresztül jutnak a sejt belsejébe. Ezek az intracelluláris ion tranziensek

közvetetten mérhetőek a sejtbe juttatott fluoreszcens indikátorok által kibocsájtott fény intenzitásának változása által (Canepari és Ross, 2024). Az AP visszaterjedésének következtében a dendritek intracelluláris terébe jutó Ca^{2+} -ionok lehetővé teszik a bAP-k detektálását, olyan dendritikus régiókban is, amelyek direkt elektrofiziológiai mérésekre (patch-clamp) alkalmatlanok vagy nehezen kivitelezhetőek. Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy a bAP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek nagysága a dendritekben a sejttesttől való távolsággal változik. A fluoreszcens szignálok amplitúdó eloszlása a dendritfán, a Ca^{2+} -tranziensek térbeli profilja az egyes idegsejt típusok esetében különbözhet. Egyes interneuron típusok esetében a tranziensek nagysága disztális irányban folyamatosan csökken, míg más sejtípusok esetében nem-lineáris eloszlás jellemző (Goldberg és mtsai., 2003; Waters és mtsai., 2003; Cho és mtsai., 2010). Rágcsáló piramis sejtek apikális illetve bazális dendritikus kompartmentjei is különbséget mutatnak a Ca^{2+} -szignálok térbeli profilját illetően (Cho és mtsai., 2006).

A bAP által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedésben a VGCC-knek van a legnagyobb szerepe. A VGCC-k négy alegységből (α_1 , β , $\alpha_2\delta$ és γ) épülnek fel, mindegyik alegység befolyásolja a csatorna tulajdonságait, de elsősorban az α_1 alegység változatos formái határozzák meg az ioncsatornát. Hat altípusát ismerjük, ezek az L, N, P, Q, R, és T, melyek farmakológiai és elektrofiziológiai tulajdonságaik eltérőek (Ertel és mtsai., 2000). Rágcsálókban végzett kísérletekből tudjuk, hogy az egyes csatorna típusok különböző mértékben vehetnek részt a Ca^{2+} -beáramlás kialakításában. A szómától való távolság függvényében, a proximális szakaszokon főként a magas-feszültség aktivált (HVA, high-voltage-activated) VGCC-k alakítják a Ca^{2+} -influxot, míg a disztálisabb szakaszokon inkább az alacsony-feszültség aktivált csatornák (LVA, low-voltage-activated) (Markram és mtsai., 1995; Jaafari és Canepari, 2016). Rágcsáló modellekben a dendritikus információfeldolgozást már régóta vizsgálják, azonban az emberi dendritek működéséről még keveset tudunk.

2. Célkitűzés

Az emberi agy az élet során számos dinamikus változáson megy keresztül, születés után a szürke- illetve fehérállomány strukturális változásai mellett a funkcionális kapcsolatok fejlődése is folytatódik a gyermekkor során, a felnőttkor kései szakaszában pedig a kognitív funkciók, a jelfeldolgozás sebességének csökkenése jellemző. Modell állatokon végzett korábbi tanulmányok kimutatták az agykérgi piramissejtek elektrofiziológiai és morfológiai tulajdonságainak életkorral összefüggő különbségeit (Luebke és Chang, 2007; Kroon és mtsai., 2019; Moore és mtsai., 2023), azonban a humán elektrofiziológiai tulajdonságok változásai, különösen az élet korai szakaszában még nem ismertek. Doktori munkám során célul tűztük ki:

- A szupragranuláris piramissejtek esetleges korfüggő elektrofiziológiai és morfológiai különbségeinek feltárását az emberi agykéregben.

A visszaterjedő akciós potenciálok fontos szerepet játszanak a szinaptikus plaszticitásban, a dendritikus excitabilitásban és a kompartment-specifikus intracelluláris Ca^{2+} -dinamikában. A kortikális piramissejtek bAP által kialakított Ca^{2+} -tranzienseinek térbeli eloszlását rágsálókban már leírták, azonban a jelterjedés az emberi dendritekben potenciálisan faj- és dendritikus régióspecifikus tulajdonságokat mutat. Ezért PhD munkám során célul tűztük ki:

- A humán L2/3 piramissejteken a visszaterjedő akciós potenciál által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó-eloszlásának vizsgálatát az apikális dendrit mentén.

3. Közreműködések

Az emberi agyszövet műtéti eltávolítását Dr. Barzó Pál végezte.

Az elektrofiziológia kísérleteket laborunk jelenlegi és korábbi munkatársaival együtt végeztem, az elektrofiziológiai elvezetésekéből származó adatokat Tóth Martin segítségével értékeltem ki.

A két-foton Ca^{2+} -képalkotási és farmakológiai kísérleteket egyedül, azok kiértékelését Tóth Martin által készített script segítségével végeztem.

A hisztológiai munkát Kocsis Ágnes Katalin, Mezei Leona és Tóth Éva végezték. A sejtek 3 dimenziós rekonstrukcióit én végeztem Kelemen Otilia és Lehóczki Bettina segítségével, a sejtek morfológiai analízisét egyedül végeztem.

Az adatok ábrázolását egyedül végeztem.

4. Anyagok és módszerek

Túlélő agyszelet preparátumok készítése

A kísérletünket túlélő humán neokortikális agyszeleteken, a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük. Olyan emberi agykérgi szövetdarabokat használtunk fel, amelyeket mélyebben fekvő patológias elváltozásokhoz való (daganatok, hydrocephalus, apoplexia, ciszták és arteriovenosus malformációk) hozzáférése érdekében kellett műtéti úton eltávolítani a betegekből. Az érzéstelenítést intravénás midazolammal és fentanillal (0,03 mg/kg, illetve 1-2 µg/kg) indukálták. Intravénásan propofol bólusadagot (1-2 mg/kg) adtak be. A betegek 0,5 mg/kg rokuroniumot kaptak az endotracheális intubáció megkönnyítése érdekében. A légcsövet intubálták, és a beteget 1:2 arányban O₂-N₂O keverékkel lélegeztették. Az anesztéziát 1,2-1,5 térfogatú sevofluránnal tartották fenn. A műtéti eljárás során az agykéreg különböző régióiból (parietális, temporális, frontális és occipitális) származó szövet blokkokat jéghideg, magas szacharóz tartalmú, az agyszeletek metszése során használttal megegyező összetételű oldatba merítettük. Az agykérgi mintákból 320 µm vastag agyszeleteket készítettünk vibráló pengés mikrotómmal (Microm HM 650 V), jéghideg 95% oxigénnel és 5% széndioxiddal telített oldatban, melynek összetétele mM-ban kifejezve: 75 szacharóz, 84 NaCl, 2,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0,5 CaCl₂, 4 MgSO₄, 25 D(+)-glükóz. A szeleteket ugyanebben az oldatban inkubáltuk 30 percig 36°C-on, majd fokozatosan alacsony Ca²⁺-koncentrációjú folyadékra cseréltük, ennek összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄, 10 D(+)-glükóz, oxigénnel és széndioxiddal telítve. Az inkubációt követően a szeleteket ebben az oldatban tartottuk 17 °C-on a kísérletek megkezdéséig.

In vitro elektrofiziológiai elvezetések

A szomatikus whole-cell patch-clamp felvételeket ~36 °C-on végeztük mesterséges agygerincvelő folyadékban, amely mM-ben kifejezve a következőt tartalmazta: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 1. 5 MgSO₄, 10 D(+)-glükóz. Az elvezetéseket 2/3-as régei kortikális piramissejtekből végeztük, amelyeket infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópiával vizualizáltunk. A mikropipettákat (3-5 MΩ) intracelluláris oldattal

töltöttük fel, ami (mM-ban) 126 kálium-glükonátot, 4 KCl-t, 4 ATP-Mg-ot, 0,3 GTP-Na₂-t, 10 HEPES-t, 10 foszfokreatint és 8 biocitint tartalmazott (pH 7,20; 300 mOsm). A teljes-sejt konfiguráció kialakítása után az idegsejtekbe -100 pA-tól kezdődően növekvő 800 ms-os áramlépcsőket injektáltunk a küszöb alatti és küszöb feletti feszültségválaszok tulajdonságainak méréséhez. Az apikális dendritbe visszaterjedő akciós potenciálok által indukált Ca²⁺-tranziensek vizsgálata során az idegsejtek sejttestjébe injektált rövid (5 ms) áramimpulzusokkal váltottunk ki 1 illetve 3 akciós potenciált.

Két-foton Ca²⁺-képalkotás

A visszaterjedő akciós potenciál által kiváltott Ca²⁺-jelek jellemzéséhez végzett kísérletekhez használt intracelluláris oldat továbbá Alexa 594 hidrazid (15 µM) fluorescens festéket, illetve Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1, 100µM) magas affinitású Ca²⁺-szenzort is tartalmazott. A whole-cell konfiguráció kialakítását követően 15-20 percig hagytuk, hogy az idegsejt nyúlványaiba diffundáljon az intracelluláris oldat, ez után kezdtük meg a két-foton képalkotást. A fluorofórokat 800 nm hullámhosszú femtoszekundum hosszúságú Ti:zafír lézer impulzusokkal gerjesztve (Mai Tai Deep See; Spectra-physics, USA) a piramis sejtek dendrit arborizációját láthatóvá tettük és a kialakult Ca²⁺-tranziensek által kiváltott fény intenzitásváltozásait rögzítettük (100 Hz).

A Ca²⁺-jelek analízisét egyedi MATLAB (The Math Works, Inc.) kódokkal végeztük, a Ca²⁺-tranziensek amplitúdóját az egyes dendritikus régiókon mért 5 Ca²⁺-tranziens amplitúdójának átlagaként számoltuk. A Ca²⁺-tranzienseket a fluoreszcencia relatív változásaként számoltuk: $\Delta F/F_0 = (F - F_0) / F_0$, ahol F_0 a stimulus előtti alap fluoreszcencia, F és F_0 esetén is kivontuk a háttér fluoreszcenciát. Az elvezetések után a vizsgált sejtekről Z-stack felvételeket készítettünk, majd a felvételeken a nyúlványokat követve lemértük a vizsgált dendrit szakaszok sejttesttől való távolságát (ImageJ, Simple Neurite Tracer plugin).

Farmakológiai kísérletek során valamennyi ioncsatorna-blokkoló szert az elvezető oldatban feloldva extracellulárisan alkalmaztunk. Kísérleteink során a következő farmakonokat használtuk: SNX-482 (300 nM), NNC 55-0396 dihidroklorid (100 µM), nifedipine (20 µM), ω -conotoxin (1 µM) és CdCl₂ (200 µM).

Elektrofiziológiai adatok analízise

Az elektrofiziológiai jellemzőket 800 ms hosszúságú, -100 pA-tól 20 pA-val növekvő áram lépcsőkkel kiváltott feszültségválaszokból mértük. Az elektrofiziológiai adatokat Fitmaster szoftverrel (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) és egyedi MATLAB (The Math Works, Inc.) kódokkal elemeztük. A passzív membrántulajdonságok kiszámításához olyan sejteket használtunk, amelyek soros ellenállása (R_s): $25,3 \pm 11,4 \text{ M}\Omega$ ($n = 457$). Az akciós potenciálok jellemzőinek elemzéséhez magasabb minőségi követelményeket állítottunk fel, és kizártuk a $30 \text{ M}\Omega$ -nál nagyobb R_s értékkel rendelkező sejteket. Ezáltal az adathalmaz $n = 331$ piramissejtre csökkent, amelyek R_s értéke $19,2 \pm 6,6 \text{ M}\Omega$ volt. Az életkorral összefüggő biofizikai változások analízise során az 1. Táblázatban összefoglalt elektrofiziológiai jellemzőket vizsgáltuk.

Nyugalmi membránpotenciál	A neuron nyugalmi membránpotenciálját közvetlenül a teljes sejt konfiguráció elérése után, áram injektálás nélkül mértük (ha az elvezetés során tartó áramot használtunk, akkor a nyugalmi membránpotenciált az injektált áram nagyságával kompenzáltuk).
Bemenő ellenállás	A bemenő ellenállás kiszámításához az összes hiperpolarizáló áram által előállított feszültséglépés átlagát használtuk. $R = V/I$ képlet alapján.
Időállandó (tau)	Az összes hiperpolarizáló áramlépcső által kiváltott feszültségválaszon 0-63%-ig mért időállandó átlaga.
Sag arány	A -100 pA áramlépcsőre adott a feszültségválasz (stimulus elején) mért minimum értékének és a steady-state állapotnak (amely az áramlépcső végén 200ms átlaga ként mért feszültség érték) aránya.
Reobázikus áram	Az első akciós potenciált kiváltó minimális áramlépcső értéke.
AP félszélesség	Az akciós potenciál szélessége fél amplitúdónál.
AP felfutási sebesség	A dV/dt maximális értékeinek átlaga az akciós potenciál kezdete és az akciós potenciál csúcs között a sejt minden egyes kiváltott AP-jából
AP amplitúdó	Az összes akciós potenciál átlagos amplitúdója az AP küszöbötől a csúcsig.
F-I meredekség	Az AP tüzelési frekvencia és az ingerintenzitás függvényében kapott adatokra illesztett egyenes meredeksége.
Első AP latencia	Az stimulus kezdetétől az első AP-ig tartó időtartam a reobázikus áramlépcső alatt.
Adaptáció	Az egymást követő AP-k közötti időtartam átlagos adaptációja.
Rebound	-100 pA hiperpolarizáló áram lépcső után kialakuló depolarizáció mértéke a steady-state állapozhoz képest.
Rebound - Sag arány	A rebound és a sag amplitúdó aránya.
Átlagos AP szám	Kiváltott AP-k átlagos száma átfutásonként.
AP küszöbpotenciál	Az összes feszültségérték átlaga az AP küszöbnél.
AP felfutási idő	AP küszöbpotenciáltól az AP csúcsig eltelt idő.
AHP amplitúdó	AP-kat követő hiperpolarizáló amplitúdóinak átlagos értéke.
AHP hossz	AHP minimum (0%) és az AHP 90%-ának időtartama.
Feszültségérték az AP dV/dt maximumánál	A sejtben kialakult összes AP átlagos feszültségértéke az AP dV/dt maximumánál.
Sebességérték az AP dV/dt minimumánál	A sejtben kialakult összes AP átlagos sebességértéke az AP dV/dt minimumánál.
Feszültségérték az AP dV/dt minimumánál	A sejtben kialakult összes AP átlagos feszültségértéke az AP dV/dt minimumánál.
AP csúcs	Az AP-k maximális feszültségértékeinek átlaga.
ISI (<i>interspike interval</i>)	Az egymást követő AP-k közötti átlagos időintervallum legalább 3 AP-t tartalmazó depolarizáló áramlépcső alatt.
AP amplitúdó akkomodáció	Az első és az utolsó AP amplitúdójának különbsége egy átfutáson belül.
AP félszélesség akkomodáció	Az első és az utolsó AP félszélességének különbsége egy átfutáson belül.
AP küszöb akkomodáció	Az első és az utolsó AP küszöb potenciáljának különbsége egy átfutáson belül.
Átlagos ISI	Az egymást követő AP-k közötti idő intervallumok átlagértéke egy átfutás során.
AP amplitúdó adaptáció	Az AP amplitúdó átlagos változása az egymást követő AP-k között.
AP félszélesség adaptáció	Az AP félszélesség átlagos változása az egymást követő AP-k között.
AP küszöbpotenciál adaptáció	Az AP küszöbpotenciál átlagos változása az egymást követő AP-k között.
AHP terület	Az AHP integrálja a minimális értéktől 90%-ig, trapéz módszerrel számítva.
ADP amplitúdó	Az AHP minimuma és a következő AP küszöbértéke közötti átlagos különbség.

1. táblázat. Vizsgált elektrofiziológiai tulajdonságok

Hisztológia

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően az agyszeleteket előkészítettük a biocitinnel jelölt sejtek későbbi morfológiai vizsgálatához. A szeleteket 4% paraformaldehidet, 15% pikrinsavat és 1,25% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M foszfátpuffer oldatban (PB, pH = 7,4) legalább 12 órán keresztül 4°C-on fixáltuk. A fixálót 0,1 M PB-ben történő többszöri mosás során eltávolítottuk a szeletekről, majd 0,1 M PB-ben oldott 10%-os, majd 20%-os szacharóz oldatba helyeztük krioprotekció céljából, így megóvva a membránszerkezetet a későbbi fagyasztás során. A szeleteket rövid ideig folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 10%-os zselatinba ágyaztuk és hideg foszfátpufferben újra metszettük 70 µm vastagságú metszetekre (Leica VT 1000S mikrotóm). A metszeteket egy éjszakán át 4°C-on Tris-pufferben (TBS, pH = 7,4) oldott konjugált avidin-biotin-tormaperoxidázt (ABC; 1:100; Vector Labs) tartalmazó oldatban inkubáltuk. Az enzimreakció 0,05% 3'-diaminobenzidin tetrahidrokloridot (DAB) és 0,01% H₂O₂ oxidálószer alkalmazásával vált láthatóvá. A metszeteket 1%-os OsO₄-val 0,1 M PB-ben utó fixáltuk. Többszöri desztillált vízzel történő mosást követően a metszeteket 1%-os uranil-acetáttal kezeltük, majd felszálló alkoholsorral dehidratáltuk. A metszeteket egy éjszakán át epoxigyantával (Durcupan, Sigma-Aldrich) infiltráltuk, végül tárgylemezre helyezve 48 órán át 56°C-on polimerizáltattuk.

Háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció

Miután az elektrofiziológiailag rögzített sejteket DAB festéssel láthatóvá tettük, fénymikroszkóp alatt (100x objektív) 3D rekonstrukciókat készítettünk (Neurolucida, MBF Bioscience, Williston, VT, USA). A rekonstrukciók elemzését NeuroExplorer software (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) segítségével végeztük. A dendritek terminális szegmenseinek hosszát a dendritek terminális csúcsa és a terminális csúcs előtti utolsó elágazási pont között mértük, csak olyan terminális szakaszokat vizsgáltunk, amelyek esetében kizárható, hogy dendrit végződését az agyszeletek metszése okozta volna. A dendritikus szegmenseken a dendrittűskék sűrűségét két elágazás közötti tűske/µm értéként adtuk meg. A szegmenseken lévő tűske-típusok százalékos arányát az adott tűsketípus százalékos arányaként számoltuk ki az egyes szegmenseken lévő összes dendrittűske-típusból.

Statisztika

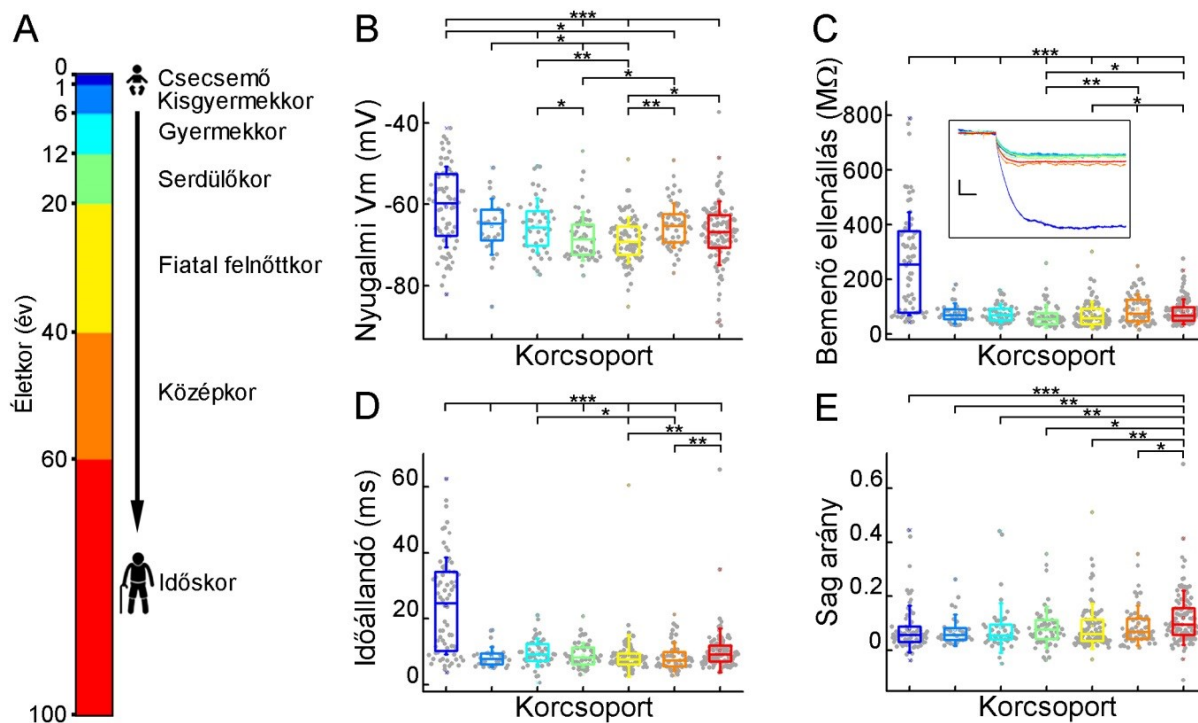
Az adatok átlag $\pm$ standard deviációként vannak bemutatva. Az adatsorok normalitását Lilliefors teszttel vizsgáltuk, a statisztikai analízis során normális eloszlású adatsor esetén ANOVA tesztet használtunk, Bonferroni poszt-hoc teszttel, nem normális eloszlás esetén Kruskal-Wallis tesztet poszt-hoc Dunn teszttel. Páros összehasonlításhoz kétmintás t-tesztet vagy Mann-Whitney tesztet használtunk. A különbséget akkor fogadtuk el szignifikánsként, ha $P < 0,05$. A dobozdiagramokon bemutatott adatok esetében a dobozok a 25, 50. (medián) és a 75. percentilist jelölik, az átlagot négyzet, a szórást a bajuszok jelölik.

5. Eredmények

Életkorfüggő különbségek a küszöb alatti membrántulajdonságokban

Az agyban az élet során számos dinamikus folyamat megy végbe a korai fejlődéstől kezdődően az időskorra jellemző kognitív leépüléséig. Kísérleteinkben emberi sekentő idegsejtek biofizikai tulajdonságait vizsgáltuk whole-cell patch-clamp elvezetések során csecsemőkortól időskorig. A sebészeti úton eltávolított emberi neokortikális mintáink főként a frontális és temporális lebenyekből származtak, többnyire daganatos vagy hydrocephalusos betegekből, de kisebb arányban parietális és occipitális mintákat is tartalmaz az adatsorunk. Az elektrofiziológiai elvezetéseket 99 páciens 457 agykérgi 2/3-as réteg (L2/3) piramissejtjén végeztük el. Annak megerősítésére, hogy a vizsgált piramissejtek az L2/3-ból származnak, megmértük a sejttest és az L1 (agykérgi 1. réteg) határ közötti távolságot (Berg és mtsai., 2021), a sikeresen előhívott (36%) idegsejtek esetében, a távolság átlagosan 129,69 μm volt az L1 határától. Az elvezetett idegsejteket hét korcsoportba soroltuk (Kang és mtsai., 2011; Bethlehem és mtsai., 2022): csecsemő: < 1 év, kisgyermekkor: 1-6 év, gyermekkor: 7-12 év, serdülőkor: 13-19 év, fiatal felnőttkor: 20-39 év, középkor: 40-59 év, időskor: ≥ 60 év (2. ábra A). Kiértékeljük a piramissejtek negatív, illetve pozitív áraminjekciókra adott feszültségválaszait, ezekből különböző küszöbalatti és küszöbfeletti membránpotenciál tulajdonságokat hasonlítottunk össze a korcsoportok között. Életkorfüggő különbségeket találtunk a nyugalmi membránpotenciál (2. ábra B, $P = 3,53 \times 10^{-8}$, Kruskal-Wallis teszt), a bemenő ellenállás (2. ábra C, $P = 1,29 \times 10^{-16}$, Kruskal-Wallis teszt), az időállandó (2. ábra D, $P = 1,31 \times 10^{-15}$, Kruskal-Wallis teszt), és a sag arányában (2. ábra E, $P = 5,2 \times 10^{-4}$, Kruskal-Wallis teszt). A nyugalmi membránpotenciál szignifikánsan pozitívabb volt az első életévben, mint a többi korcsoportban. A felnőttkor előtt a nyugalmi membránpotenciál értékeiben csökkenés figyelhető meg a korcsoportok között, míg a fiatal felnőttkort követően enyhe növekedés látható (csecsemő: $n = 72$, $-60,64 \pm 9,86$ mV; kisgyermekkor: $n = 28$, $-65,44 \pm 6,82$ mV; gyermekkor: $n = 45$, $-65,17 \pm 6,68$ mV; serdülő kor: $n = 54$, $-67,86 \pm 5,94$ mV; fiatal felnőttkor: $n = 89$, $-68,69 \pm 5,54$ mV; középkor: $n = 56$, $-65,14 \pm 5,5$ mV; időskor: $n = 113$, $-67,05 \pm 7,86$ mV) (2. ábra B). A bemenő ellenállást, az időállandót és a sag arányát a sejtek negatív (-100 pA-tól kezdődően) áramlépcsők által kiváltott membránpotenciál változásából mértük. A bemenő ellenállás szignifikánsan csökken a

gyermekkor során (csecsemő: $n = 72$, $257,25 \pm 188,06 \text{ M}\Omega$; kisgyermekkor: $n = 28$, $75,27 \pm 37,5 \text{ M}\Omega$; gyermekkor: $n = 45$, $74,61 \pm 34,29 \text{ M}\Omega$; serdülőkor: $n = 54$, $64,79 \pm 41,82 \text{ M}\Omega$; fiatal felnőttkor: $n = 89$, $70,85 \pm 46,9 \text{ M}\Omega$; középkor: $n = 56$, $90,14 \pm 54,37 \text{ M}\Omega$; időskor: $n = 113$, $81,14 \pm 46,36 \text{ M}\Omega$), a legnagyobb mértékű csökkenés az első életév után volt megfigyelhető ($P = 1,88 \times 10^{-6}$, Kruskal-Wallis teszt poszt-hoc Dunn-teszttel) (2. ábra C). A membrán időálló szintén szignifikánsan csökkent az idősebb csoportokban a csecsemő csoporthoz képest, az első életév után az időálló átlagértékei kis mértékben változtak az idősebb korban (csecsemő: $n = 72$, $23,88 \pm 14,7 \text{ ms}$; kisgyermekkor: $n = 28$, $8,49 \pm 3,08 \text{ ms}$; gyermekkor: $n = 45$, $9,73 \pm 4,24 \text{ ms}$; serdülőkor: $n = 54$, $8,99 \pm 3,71 \text{ ms}$; fiatal felnőttkor: $n = 89$, $8,76 \pm 6,33 \text{ ms}$; középkor: $n = 56$, $8,53 \pm 4,24 \text{ ms}$; időskor: $n = 113$, $10,39 \pm 6,63 \text{ ms}$) (2. ábra D). Negatív áramlépcső (-100 pA) által kiváltott feszültségváltozás maximális kitérése és a steady-state membránpotenciál aránya (sag-arány) szignifikánsan magasabb időskorban, mint a korábbi korcsoportokban (csecsemő: $n = 72$, $0,079 \pm 0,087$; kisgyermekkor: $n = 28$, $0,075 \pm 0,058$; gyermekkor: $n = 45$, $0,082 \pm 0,092$; serdülőkor: $n = 54$, $0,086 \pm 0,076$; fiatal felnőttkor: $n = 89$, $0,09 \pm 0,084$; középkor: $n = 56$, $0,092 \pm 0,073$; időskor: $n = 113$, $0,12 \pm 0,1$) (2. ábra E).



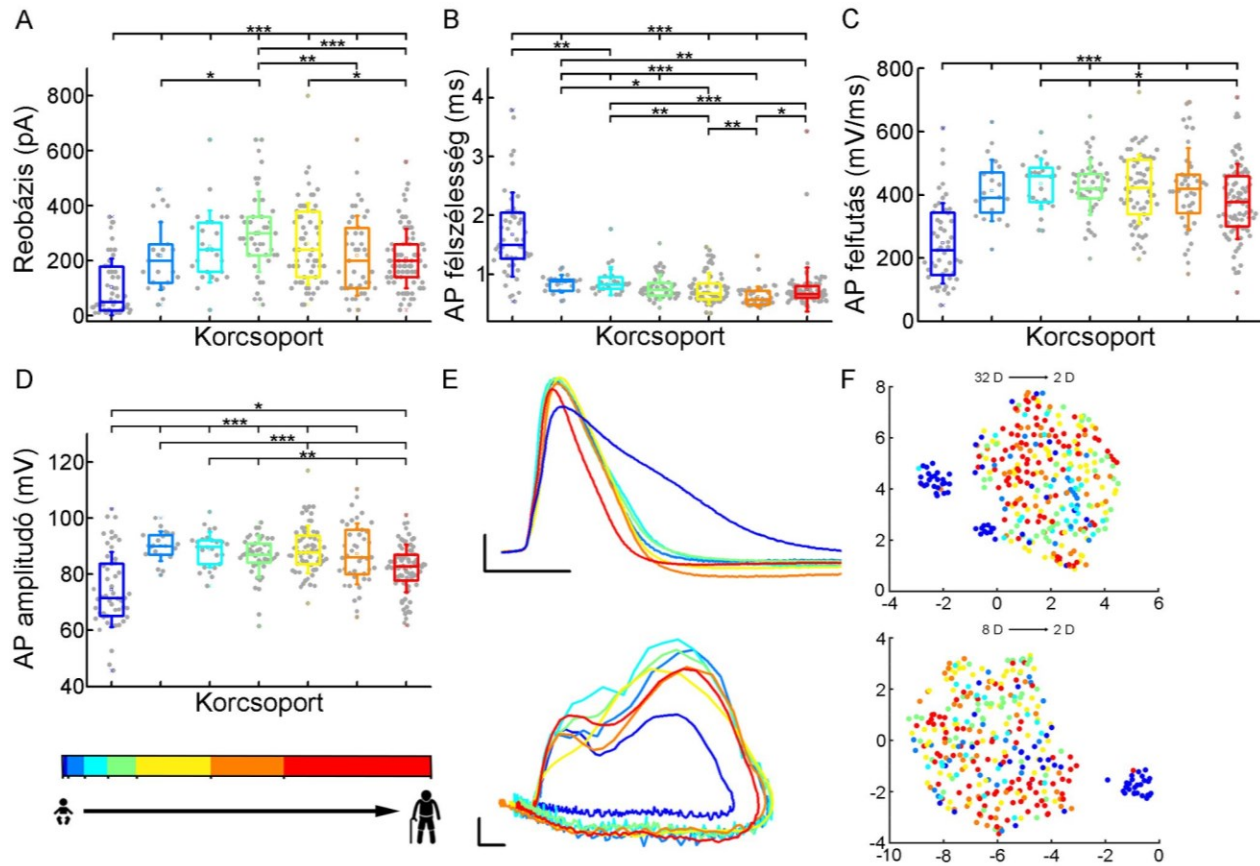
2. ábra: Az idegsejtek küszöb alatti tulajdonságainak életszakaszok közötti különbségei

A: A vizsgált korcsoportok illusztrációja. **B-E:** A dobozdiagramok a nyugalmi membránpotenciál (B), a bemenő ellenállás (C), az időállandó (D) és a sag arányának (E) különbségeit mutatják be a korcsoportok között. (B) A beszúrt ábrán egy -100 pA nagyságú áramlépcsőre adott reprezentatív feszültségválaszok láthatók az egyes csoportokból. Skála: 5 mV; 20 ms. A csillagok a szignifikancia szintjét jelzik (Kruskal-Wallis teszt poszt-hoc Dunn-teszttel, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Korcsoportok közötti különbségek az akciós potenciál kinetikájában

Az akciós potenciálok kiváltásához 20 pA-val növekvő pozitív áramlépcsőket injektáltunk a sejtekbe, és különböző aktív membrántulajdonságokat vizsgáltunk, 331 megfelelő elektrofiziológiai minőségű (lásd Anyagok és Módszerek című részt) elvezetésből. A csecsemő csoport különbözik leginkább a többi korcsoporttól a vizsgált paraméterekben (reobázis: $P = 8,71 \times 10^{-12}$, AP félszélesség: $P = 9,57 \times 10^{-25}$, AP felfutási sebesség: $P = 1,63 \times 10^{-12}$, AP amplitúdó: $P = 2,24 \times 10^{-11}$, Kruskal-Wallis teszt), azonban más tendenciák is megfigyelhetők az életkor előrehaladtával. A kortikális piramis sejtek nyugalmi membránpotenciálja felnőttkorig egyre hiperpolarizáltabbá majd a felnőttkor során kissé depolarizáltabbá válik, ezt a változást követi az AP-t kiváltani képes legkisebb áram lépcső értéke, a reobázis áram is, ami a korai

életszakaszban szignifikánsan alacsonyabb, mint serdülőkorban (csecsemő: $n = 51$, $104,51 \pm 103,18$ pA, kisgyermekkor: $n = 21$, $218,1 \pm 123,27$ pA, gyermekkor: $n = 25$, $252,8 \pm 131,17$ pA, serdülőkor: $n = 45$, $306,22 \pm 147,21$ pA, fiatal felnőttkor: $n = 63$, $262,9 \pm 148,06$ pA, középkor: $n = 43$, $219,07 \pm 145,52$ pA, időskor: $n = 83$, $207,71 \pm 107,83$ pA; csecsemőkor vs. serdülőkor $P = 4,15 \times 10^{-13}$, Kruskal-Wallis teszt poszt-hoc Dunn-teszttel). A gyermekkor során a reobázis növekedett, és a serdülőkorban érte el a maximális értékeit, majd a felnőttkor előrehaladtával szignifikánsan alacsonyabb értékekre csökkent (serdülőkor vs. időskor, $P = 5,23 \times 10^{-4}$, Kruskal-Wallis teszt poszt-hoc Dunn-teszttel, 3. ábra A). Az akciós potenciál (AP) félszélesség csökkenő tendenciát mutat az életkor függvényében (3. ábra B), jelentős különbségekkel a gyermek és felnőttkor között (csecsemő: $n = 51$, $1,68 \pm 0,71$ ms; kisgyermekkor: $n = 21$, $0,84 \pm 0,15$ ms; gyermekkor: $n = 25$, $0,88 \pm 0,24$ ms; serdülőkor: $n = 45$, $0,78 \pm 0,22$ ms; fiatal felnőttkor: $n = 63$, $0,76 \pm 0,27$ ms; középkor: $n = 43$, $0,62 \pm 0,17$ ms; időskor: $n = 83$, $0,74 \pm 0,38$ ms). Az akciós potenciálok felfutási sebessége szignifikánsan lassabb a csecsemő piramis sejtek esetében, mint bármely más életkorban (csecsemő: $n = 51$, $247,43 \pm 127,27$ mV/ms; kisgyermekkor: $n = 21$, $413,68 \pm 97,11$ mV/ms; gyermekkor: $n = 25$, $434,75 \pm 78,32$ mV/ms; serdülőkor: $n = 45$, $424,69 \pm 87,58$; fiatal felnőttkor: $n = 63$, $418,49 \pm 110,33$ mV/ms; középkor: $n = 43$, $419,15 \pm 129,29$ mV/ms; időskor: $n = 83$, $379,22 \pm 118,45$ mV/ms) (3. ábra C). A kiváltott AP-k amplitúdója szintén életkorfüggő különbségeket mutatott; az első életévben az AP-k amplitúdója szignifikánsan alacsonyabb, mint a többi korcsoportban. Felnőttkorban a korral szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető (csecsemő: $n = 51$, $74,62 \pm 13,4$ mV; kisgyermekkor: $n = 21$, $90 \pm 5,23$ mV; gyermekkor: $n = 25$, $88,82 \pm 6,35$ mV; serdülőkor: $n = 45$, $86,31 \pm 7,36$ mV; fiatal felnőttkor: $n = 63$, $88,81 \pm 8,52$ mV; középkor: $n = 43$, $87,28 \pm 10,77$ mV; időskor: $n = 83$, $82,02 \pm 8,49$ mV) (3. ábra D). A vizsgált elektrofiziológiai paraméterek alapján a csecsemőkorból származó piramis sejtek jelentősen elkülönültek a további korcsoportoktól, ez látható a dimenzió-redukciós módszerrel készült UMAP-projekción (3. ábra F).

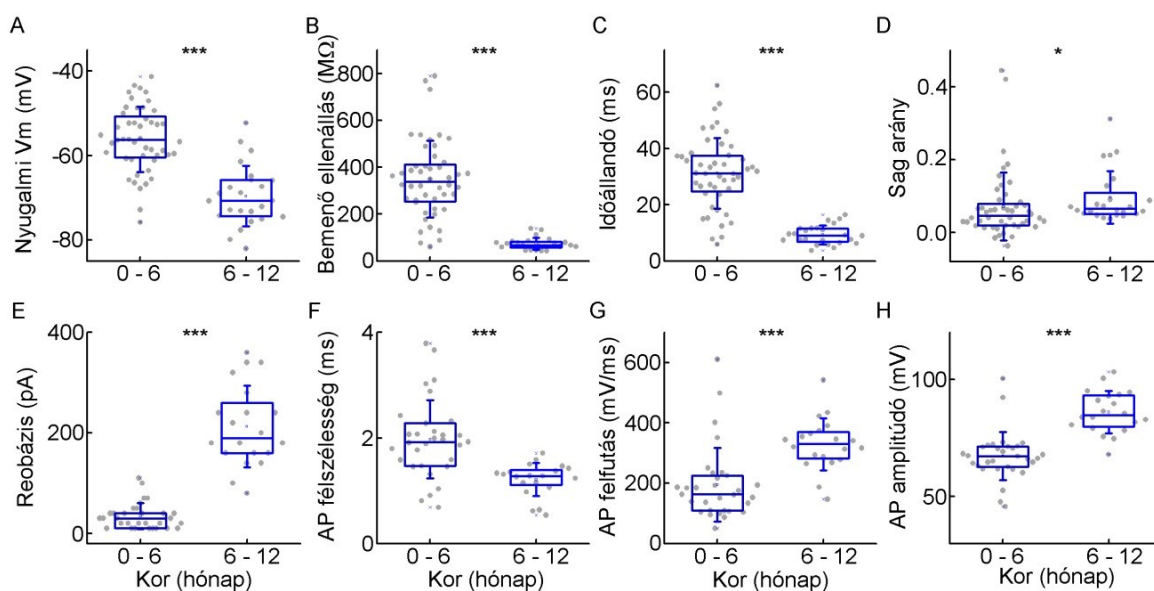


3. ábra: Életkorral kapcsolatos különbségek az akciós potenciál kinetikájában

A-D: A reobázis (A), az akciós potenciál félszélessége (B), az akciós potenciál felfutási ideje (C) és az akciós potenciál amplitúdója (D) közötti különbségeket bemutató dobozdiagramok az egyes korcsoportok között. A csillagok a statisztikai különbség szignifikancia szintjét jelzik (Kruskal-Wallis teszt, poszt hoc Dunn teszttel * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). **E:** Az akcióspotenciálok kezdetéhez igazított reprezentatív AP-k az egyes korcsoportokból (skála: x tengely: 1 ms, y tengely: 20 mV) (fent) és a reprezentatív AP-k fázisplotjai (skála: x tengely: 10 mV, y tengely: 100 mV/ms) (lent). **F:** 32 (1. táblázat) (fent) és az eddig bemutatott 8 (nyugalmi Vm, bemenő ellenállás, tau, sag arány, reobázis, AP félszélesség, AP felfutás és AP amplitúdó) (lent) elektrofiziológiai tulajdonság UMAP ábrázolása 331 agykérgi L2/3 piramisesejt adatpontjaival, a megfelelő korcsoportok szerint színeelve.

Az előzőekben bemutatott (2. és 3. ábra) elektrofiziológiai jellemzők esetében a csecsemő korcsoportban jelentős szórás figyelhető meg, ennek a varianciának a hátterében a korai élet során végbemenő gyors fejlődés állhat. A csecsemőkor első, illetve második felében szignifikáns különbségek figyelhetőek meg, amelyek az életkor előrehaladtával bekövetkező változások tendenciáját követik mind a küszöbalatti és küszöbfeletti biofizikai jellemzők

esetében is (4. ábra). A nyugalmi membránpotenciál a fél évesnél idősebb páciensek esetén szignifikánsan hiperpolarizáltabb ($P = 7,05 \times 10^{-10}$, két mintás t-teszt) (4. ábra A). A bemenő ellenállás (4. ábra B) és az időállandó (4. ábra C) az első életév során szignifikánsan alacsonyabb (bemenő ellenállás: $P = 9,8 \times 10^{-12}$, időállandó: $P = 4,22 \times 10^{-12}$, két mintás t-teszt). A sag aránya a csecsemőkor második felére szignifikánsan megemelkedik (4. ábra D) ($P = 0,015$, Mann-Whitney teszt). Az első életév második felében az AP-k kiváltásához szignifikánsan magasabb áraminjekció szükséges ($P = 3,07 \times 10^{-9}$, Mann-Whitney teszt) (4. ábra E). Az akciós potenciálok kinetikája is jelentősen megváltozik a csecsemőkor alatt, az AP-k gyorsabbá válnak, a félszélességük csökken ($P = 2,1 \times 10^{-5}$, Mann-Whitney teszt) (4. ábra F), a felfutási sebességük ($P = 2,49 \times 10^{-5}$, Mann-Whitney teszt) (4. ábra G) és az amplitúdójuk megnő ($P = 2,73 \times 10^{-7}$, Mann-Whitney teszt) (4. ábra H).

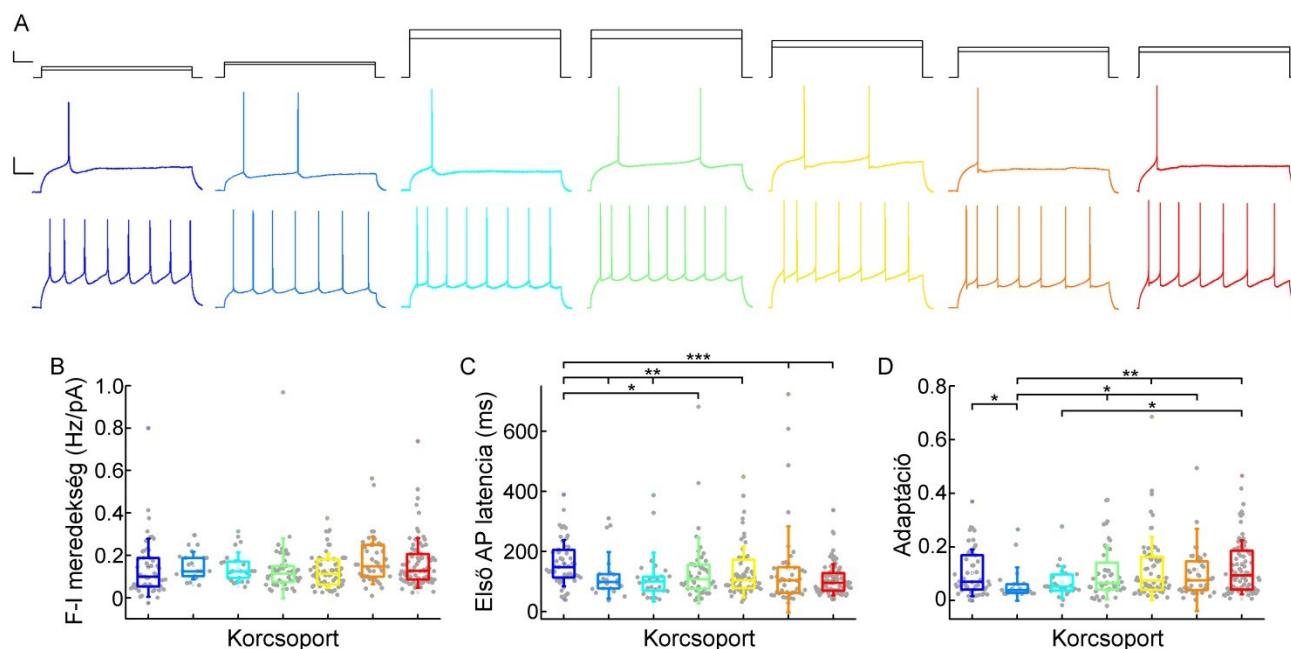


4. ábra: Elektrofiziológiai különbségek az első életévben

A-D: A passzív tulajdonságok, nyugalmi membránpotenciál (A), bemenő ellenállás (B), tau (C) és sag arány (D) különbségeit bemutató dobozdiagramok a csecsemő korcsoporton belül (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, kétmintás t-próba (A, B, C) vagy Mann-Whitney teszt (D)). **E-H:** Különbségek az akciós potenciál kinetikájában, a reobázisban (E), az AP félszélességében (F), az AP felfutási sebességben (G) és az AP amplitúdóban (H) az első életév első és második feléből származó sejtek között. A csillagok szignifikanciát jeleznek (Mann-Whitney teszt, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

A tüzelési mintázat korfüggő különbségei

Az egyes akciós potenciálok jellemzői mellett megvizsgáltuk az AP-k tüzelési mintázatát a különböző korcsoportokba tartozó idegsejtekben, amelyeket hosszan tartó pozitív áramlépcsők injektálása alatt kialakuló AP-k sorozatai alapján mértünk meg (5. ábra A). A vizsgált neuronok ($n = 331$) szabályos tüzelésű, mérsékelt adaptációjú piramissejtek. A sejtek tüzelési frekvenciája és az áraminjekció nagysága közötti összefüggés meredeksége (F-I meredekség) nem mutatott szignifikáns különbséget az egyes korcsoportok között ($P = 0,055$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $n = 51$, $0,14 \pm 0,14$ Hz/pA; kisgyermekkor: $n = 21$, $0,15 \pm 0,066$ Hz/pA; gyermekkor: $n = 25$, $0,14 \pm 0,07$ Hz/pA; serdülőkor: $n = 45$, $0,14 \pm 0,14$ Hz/pA; fiatal felnőttkor: $n = 63$, $0,13 \pm 0,08$ Hz/pA; középkor: $n = 43$, $0,18 \pm 0,11$ Hz/pA; időskor: $n = 83$, $0,16 \pm 0,12$ Hz/pA) (5. ábra B). Életkorral összefüggő különbséget figyelhettünk meg az első AP latenciájában, amely a reobázikus áramlépcső során az első AP kialakulásáig eltelt idő (csecsemő: $n = 51$, $161,26 \pm 76,81$ ms; kisgyermekkor: $n = 21$, $121,36 \pm 76,88$ ms; gyermekkor: $n = 25$, $115,29 \pm 81,27$ ms; serdülőkor: $n = 45$, $136,69 \pm 109,78$; fiatal felnőttkor: $n = 63$, $132,42 \pm 84,68$; középkor: $n = 43$, $140,61 \pm 143,43$; időskor: $n = 83$, $106,39 \pm 52,31$ ms). Az első AP latenciája szignifikánsan magasabb a csecsemőkor során, mint az összes többi korcsoportban ($P = 7,67 \times 10^{-4}$, Kruskal-Wallis teszt), ez a különbség a legidősebb korcsoporttal összevetve a legkifejezettebb ($P = 8,41 \times 10^{-6}$, Kruskal-Wallis teszt post-hoc Dunn-teszttel) (5. ábra C). Az azonos áramlépcsőre kialakult AP-k frekvenciájának adaptációja szintén különbséget mutatott ($P = 0,032$, Kruskal-Wallis teszt) a 13 évesnél fiatalabb és annál idősebb betegek csoportjai között. A legalacsonyabb adaptációs értékeket kisgyermekkorban találtuk (csecsemő: $n = 51$, $0,1 \pm 0,087$; kisgyermekkor: $n = 21$, $0,061 \pm 0,062$; gyermekkor: $n = 25$, $0,068 \pm 0,06$; serdülőkor: $n = 44$, $0,105 \pm 0,1$; fiatal felnőttkor: $n = 63$, $0,119 \pm 0,118$; középkor: $n = 43$, $0,114 \pm 0,153$; időskor: $n = 83$, $0,12 \pm 0,1$) (5. ábra D).

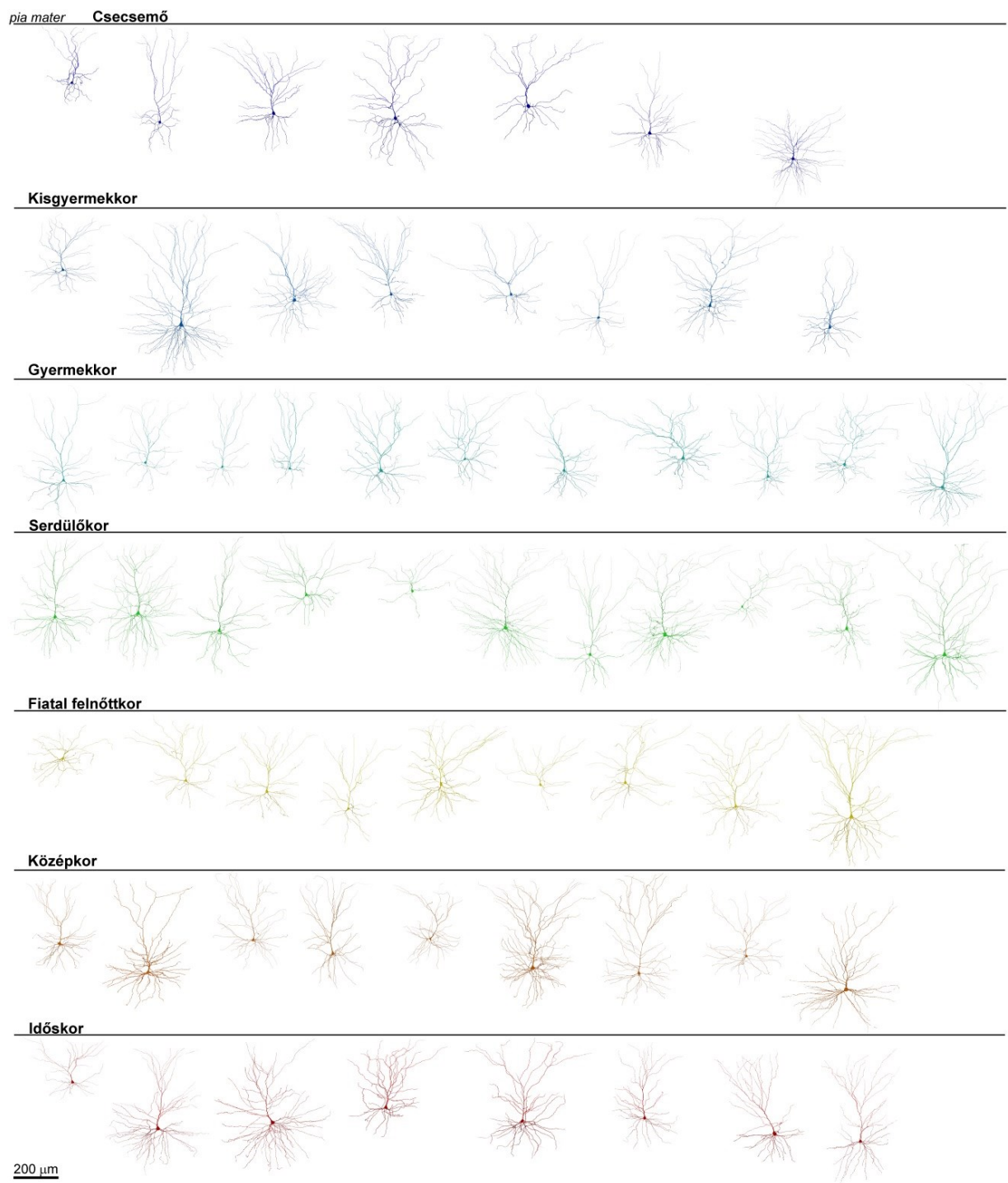


5. ábra: Az AP tüzelési mintázatának életkor függése

A: Reprezentatív membránpotenciál-válaszok egy 800 ms hosszú reobázikus (középen), és egy annál magasabb áraminjekciókra (alul). A korcsoportoknak megfelelően színezve (balról jobbra: csecsemő, kisgyermekkor, gyermekkor, serdülőkor, fiatal felnőttkor, középkor, időskor). Skála fent: 1ms, 100 pA, lent: 1 ms, 20 mV. **B-D:** Dobozdiagramokkal ábrázolva a korcsoportok közötti változásokat az F-I meredekségben (B), az első AP latenciában (C) és az AP-k adaptációjában (D). A csillagok a statisztikai szignifikanciát jelzik (Kruskal-Wallis teszt, poszt hoc Dunn teszttel * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Az emberi agykérgi szupragranuláris piramissejtjeinek morfológiai jellemzői az élet különböző szakaszaiban

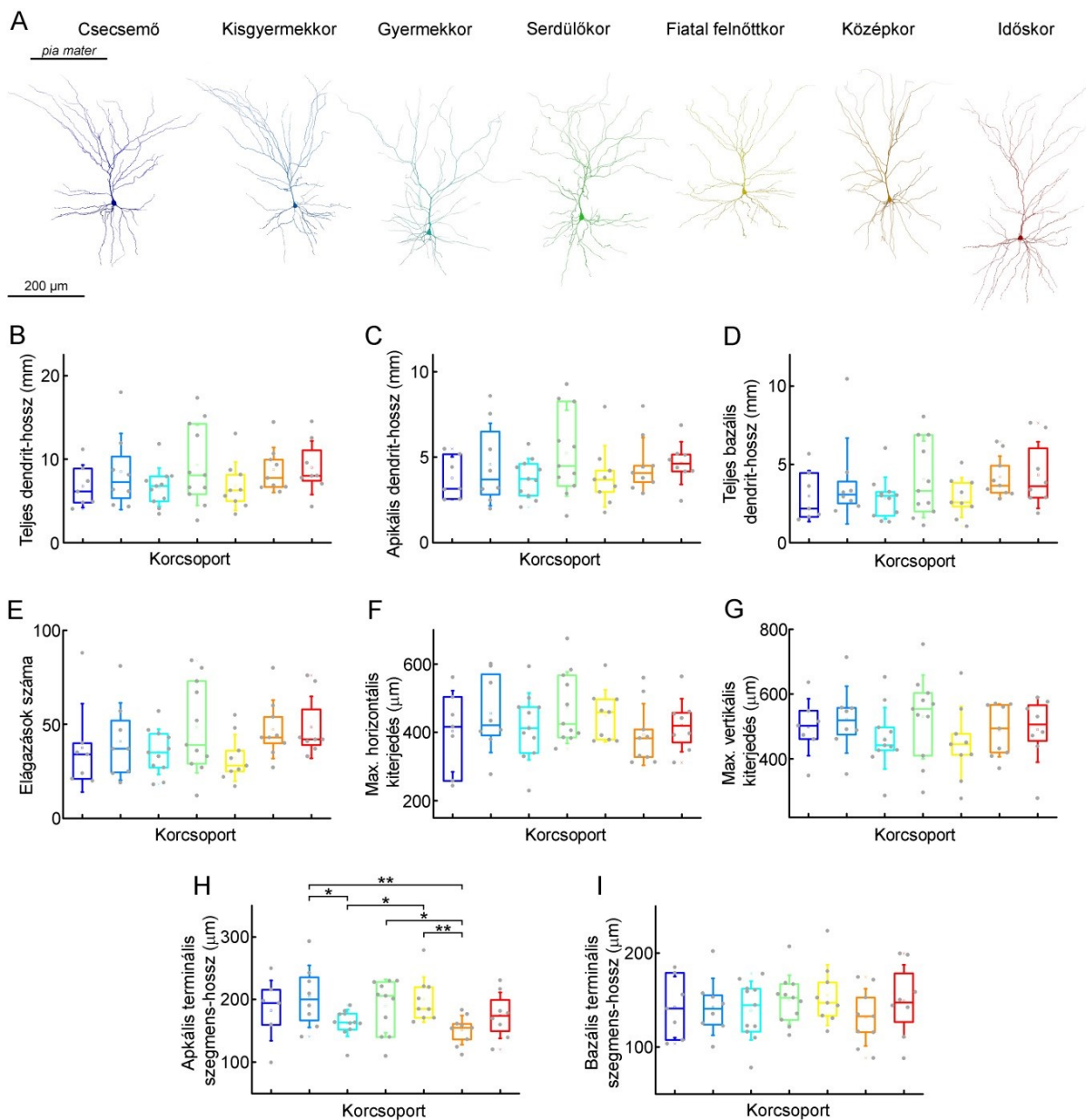
A korcsoportok közötti esetleges morfológiai különbségek vizsgálatához az elektrofiziológiai elvezetések során biocitinnel töltöttük fel a vizsgált piramissejteket, amelyeket ezt kövően fénymikroszkóp alatt is láthatóvá tudtunk tenni. Csak olyan neuronokat használtunk fel az analízis során, amelyek megközelítőleg teljes dendrit-arborizációval rendelkeztek. 63 piramissejt teljes dendritfájának 3D rekonstrukcióját készítettük el 0 és 73 éves kor közötti páciensekből származó mintákból (csecsemő $n = 7$, kisgyermekkor $n = 8$, gyermekkor $n = 11$, serdülőkor $n = 11$, fiatal felnőttkor $n = 9$, középkor $n = 9$, időskor $n = 8$) (6.ábra).



6. ábra: A vizsgált humán L2/3 piramis sejtek 3D rekonstrukciói

A vizsgáltainkban felhasznált 63 szupragranuláris piramis sejtről készült rekonstrukciók a különböző korcsoportokból csecsemő ($n = 7$), kisgyermekkor ($n = 8$), gyermekkor ($n = 11$), serdülőkor ($n = 11$), fiatal felnőttkor ($n = 9$), középkorú ($n = 9$) és időskori ($n = 8$) betegekből. A piramis sejtek színezése megegyezik a korcsoportok színekódjaival.

Nem találtunk szignifikáns változást a teljes dendrit hosszúságban ($P = 0,37$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $6,74 \pm 2,56$ mm; kisgyermekkor: $8,5 \pm 4,56$ mm; gyermekkor: $6,62 \pm 2,29$ mm; serdülőkor: $9,27 \pm 4,82$ mm; fiatal felnőttkor: $6,76 \pm 2,9$ mm; középkor: $8,7 \pm 2,7$ mm; időskor: $8,96 \pm 3,22$ mm) (7. ábra B), az apikális dendrit-hosszban ($P = 0,6$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $3,77 \pm 1,24$ mm; kisgyermekkor: $4,57 \pm 2,42$ mm; gyermekkor: $3,78 \pm 1,14$ mm; serdülőkor: $5,24 \pm 2,51$ mm; fiatal felnőttkor: $3,88 \pm 1,8$ mm; középkor: $4,52 \pm 1,63$ mm; időskor: $4,65 \pm 1,25$ mm) (7. ábra C), vagy a bazális dendrit hosszúságában ($P = 0,28$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $2,97 \pm 1,63$ mm; kisgyermekkor: $3,93 \pm 2,74$ mm; gyermekkor: $2,84 \pm 1,33$ mm; serdülőkor: $4,04 \pm 2,44$ mm; fiatal felnőttkor: $2,88 \pm 1,27$ mm; középkor: $4,18 \pm 1,35$ mm; időskor: $4,31 \pm 2,13$ mm) (7. ábra D) a különböző életkorok között. A dendritikus komplexitás felméréséhez megvizsgáltuk a dendritikus elágazások teljes számát, és nem találtunk kor-függő változásokat ($P = 0,18$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $37,43 \pm 23,58$; kisgyermekkor: $40,88 \pm 20,54$; gyermekkor: $35,36 \pm 12,07$; serdülőkor: $48,36 \pm 24,23$; fiatal felnőttkor: $32,11 \pm 12,38$; középkor: $47,33 \pm 15,57$; időskor: $48,38 \pm 16,47$) (7. ábra E). A rekonstruált idegsejtek korcsoportok közötti dendrit arborizáció nagyságában sem találtunk szignifikáns különbségeket, ha a maximális horizontális ($P = 0,64$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $403,33 \pm 118,55$ μ m; kisgyermekkor: $455,24 \pm 114,42$ μ m; gyermekkor: $417,2 \pm 98,1$ μ m; serdülőkor: $472,2 \pm 104,51$ μ m; fiatal felnőttkor: $448,3 \pm 75,94$ μ m; középkor: $393,7 \pm 90,29$ μ m; időskor: $420,93 \pm 77,49$ μ m) (7. ábra F) vagy a vertikális ($P = 0,51$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemőkor: $498,12 \pm 87,85$ μ m; kisgyermekkor: $521,2 \pm 102,88$ μ m; gyermekkor: $463,83 \pm 94,63$; serdülőkor: $529,58 \pm 129,28$ μ m; fiatal felnőttkor: $447,41 \pm 114,17$ μ m; középkor: $488,02 \pm 81,02$ μ m; időskor: $490,45 \pm 100,53$ μ m) (7. ábra G) kiterjedését hasonlítottuk össze. Szignifikáns különbségeket találtunk az apikális dendritek terminális szegmenseinek átlagos hosszában ($P = 0,033$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemő: $182,42 \pm 48,17$ μ m; kisgyermekkor: $204,83 \pm 49,62$ μ m; gyermekkor: $162,47 \pm 21,5$; serdülőkor: $189,59 \pm 42,54$ μ m; fiatal felnőttkor: $199,68 \pm 36,2$ μ m; középkor: $151,23 \pm 23,3$ μ m; időskor: $174,62 \pm 36,76$ μ m) (7. ábra H), viszont a bazális dendritfa esetén nem ($P = 0,85$, Kruskal-Wallis teszt; csecsemőkor: $142,54 \pm 32,43$ μ m; kisgyermekkor: $142,69 \pm 30,31$ μ m; gyermekkor: $138,7 \pm 31,22$ μ m; serdülőkor: $150,32 \pm 26,09$ μ m; fiatal felnőttkor: $155,29 \pm 32,15$ μ m; középkor: $131,6 \pm 30,44$ μ m; időskor: $148,96 \pm 38,42$ μ m) (7. ábra I) a korcsoportok összehasonlítása során.



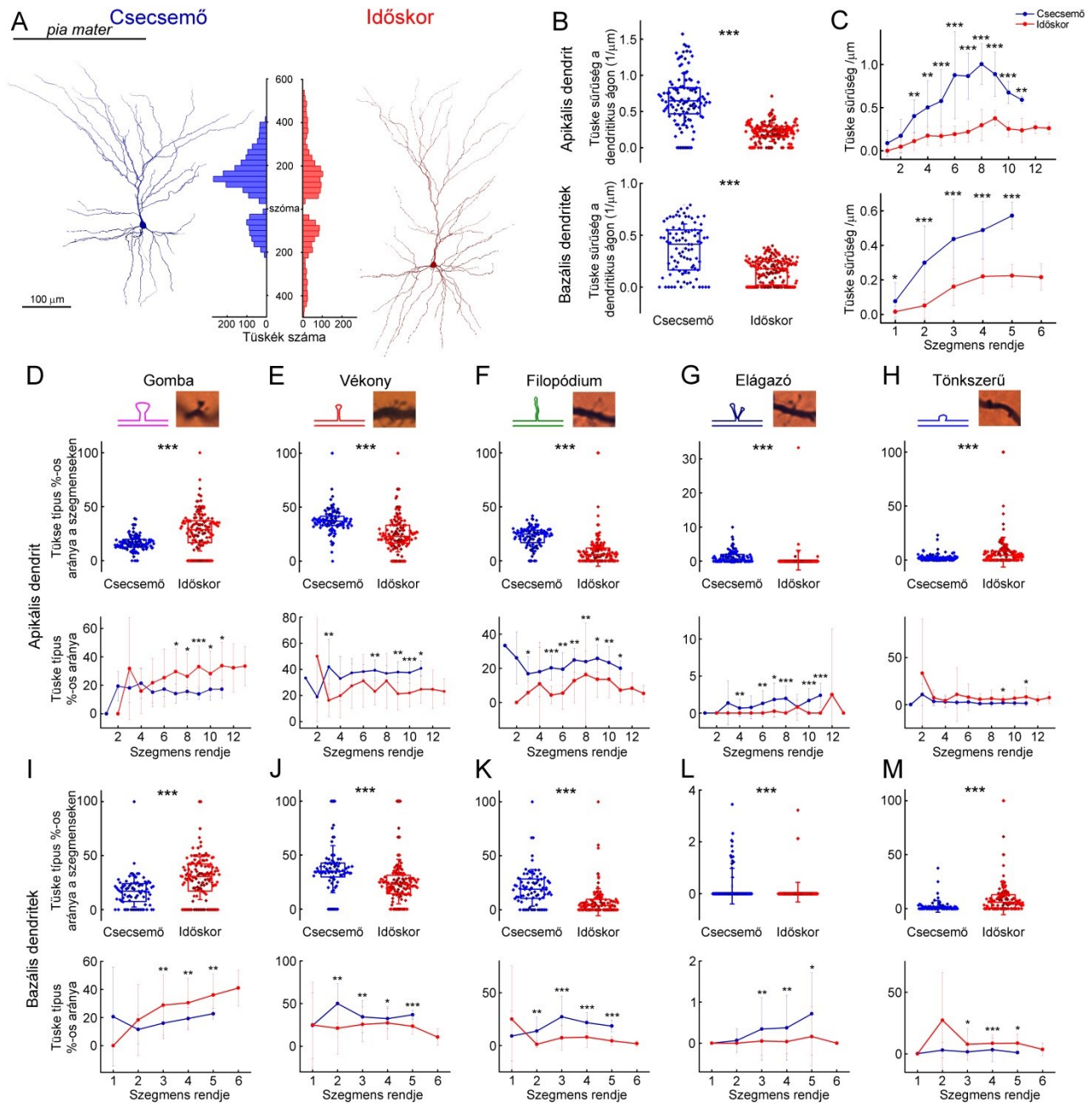
7. ábra: A humán L2/3 piramiseltjeinek morfológiai jellemzői az élet különböző szakaszaiban

A: Reprezentatív rekonstrukciók a vizsgált szupragranuláris piramiseltjeiről a különböző korcsoportokból (balról jobbra) csecsemő ($n = 7$), kisgyermekkor ($n = 8$), gyermekkor ($n = 11$), serdülőkor ($n = 11$), fiatal felnőttkor ($n = 9$), középkorú ($n = 9$) és időskori ($n = 8$) betegekből.

B-I: A dobozdiagramok az összes rekonstruált sejt összesített adatait mutatják (6. ábra) a teljes dendrit hossz (B), az apikális dendrit hosszúság (C), a teljes bazális dendritikus hosszúság (D), az apikális és bazális dendriteken lévő elágazások teljes száma (E), a dendritek maximális horizontális (F) és maximális vertikális (G) kiterjedése, az apikális (H) és bazális (I) terminális dendritikus szegmensek átlagos hossza. A csillagok a statisztikai szignifikanciát jelzik (Kruskal-Wallis teszt, poszt hoc Dunn teszttel * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

A dendritikus tüskék eloszlásának elemzéséhez minden egyes dendrittüskét azonosítottunk és megjelöltünk hat 3D-ben teljesen rekonstruált sejten. A vizsgálataink során egy csecsemőből (83 napos, $n = 3$ piramissejt) és három időskorú ($64,3 \pm 2,08$ éves, $n = 3$ piramissejt) betegekből származó piramissejtek dendrittüske sűrűségét hasonlítottuk össze. Azt találtuk, hogy nagyobb volt a tüske-denzitás a teljes dendritarborizáción ($P = 7,57 \times 10^{-40}$, Mann-Whitney-teszt), illetve mind az apikális ($P = 2,02 \times 10^{-31}$, Mann-Whitney teszt), mind a bazális ($P = 3,8 \times 10^{-12}$, Mann-Whitney teszt) dendritek tüske-sűrűsége magasabb volt a csecsemő mintából származó piramissejteken, mint az időskori piramissejteken (8. ábra B). Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az egyes dendrittüske típusok eloszlásának életkor függését a tüskéket morfológiai jellemzőik alapján különböző fenotípusokba soroltuk: gomba alakú, vékony, filopodium, elágazó és tönkszerű tüskére (8. ábra D-H). A nagy tüskefejjel rendelkező tüskéket gomba alakúnak, a kis fejjel rendelkező tüskéket vékonynak, a hosszú nyúlványokat pedig filopodiális tüskéként osztályoztuk. Azokat, amelyeknek nem volt nyelük, a tönkszerű kategóriába soroltuk, azokat a tüskéket, amelyek két fejjel rendelkeztek, amik ugyanabból a pontból eredtek, elágazó tüskéként kategorizáltuk (8. ábra D-H) (Luebke 2015). A dendrittüskék típusainak elemzésbe csak olyan dendritikus tüskéket vontunk be, amelyek teljes egészében láthatóak voltak, ha a típusa nem volt megállapítható, akkor csak a teljes tüske denzitás számításához használtuk fel az adott tüskéket. A tüske típusok megoszlása eltérő a két korcsoport között. A gomba típusúak nagyobb arányban vannak jelen időskorban mind az apikális ágakon ($P = 4,4 \times 10^{-9}$, Mann-Whitney-teszt), mind a bazális nyúlványok esetében ($P = 9,04 \times 10^{-8}$, Mann-Whitney teszt) (8. ábra D, I). Ezzel szemben a vékony, illetve filopódium típusú tüskék szignifikánsan nagyobb számban vannak jelen a 83 napos idegsejtek apikális (8. ábra E-F) (vékony tüskék: $P = 7,64 \times 10^{-14}$; filopodiális: $P = 1,11 \times 10^{-39}$, Mann-Whitney teszt) és bazális (vékony tüskék: $P = 2,46 \times 10^{-8}$; filopódium: $P = 2,14 \times 10^{-12}$, Mann-Whitney teszt) (8. ábra J-K) dendritikus szakaszain. A csecsemőből származó sejt szegmentumain szignifikánsan magasabb az elágazó tüskék aránya (apikális dendrit: $P = 1,63 \times 10^{-11}$; bazális dendrit: $P = 8,9 \times 10^{-5}$, Mann-Whitney teszt) (8. ábra G, I), amelyek szerény számban vannak jelen mindkét sejt esetében. Az idősebb piramissejteken gyakrabban fordultak elő tönkszerű tüskék, akár az apikális ($P = 7,19 \times 10^{-5}$, Mann-Whitney-teszt), akár a bazális ($P = 6,97 \times 10^{-9}$, Mann-Whitney teszt) nyúlványokon (8. ábra H, M). A dendrit ágakon a tüskék száma a szegmensek rendjével nőtt,

függetlenül a morfológiai típusától, és minden altípus esetében találtunk szignifikáns különbségeket a két korcsoport dendritikus szegmensei között (8. ábra D-H).



8. ábra: Dendrittűskék számának összehasonlítása a csecsemő és az időskori korcsoportok piramisjelei között

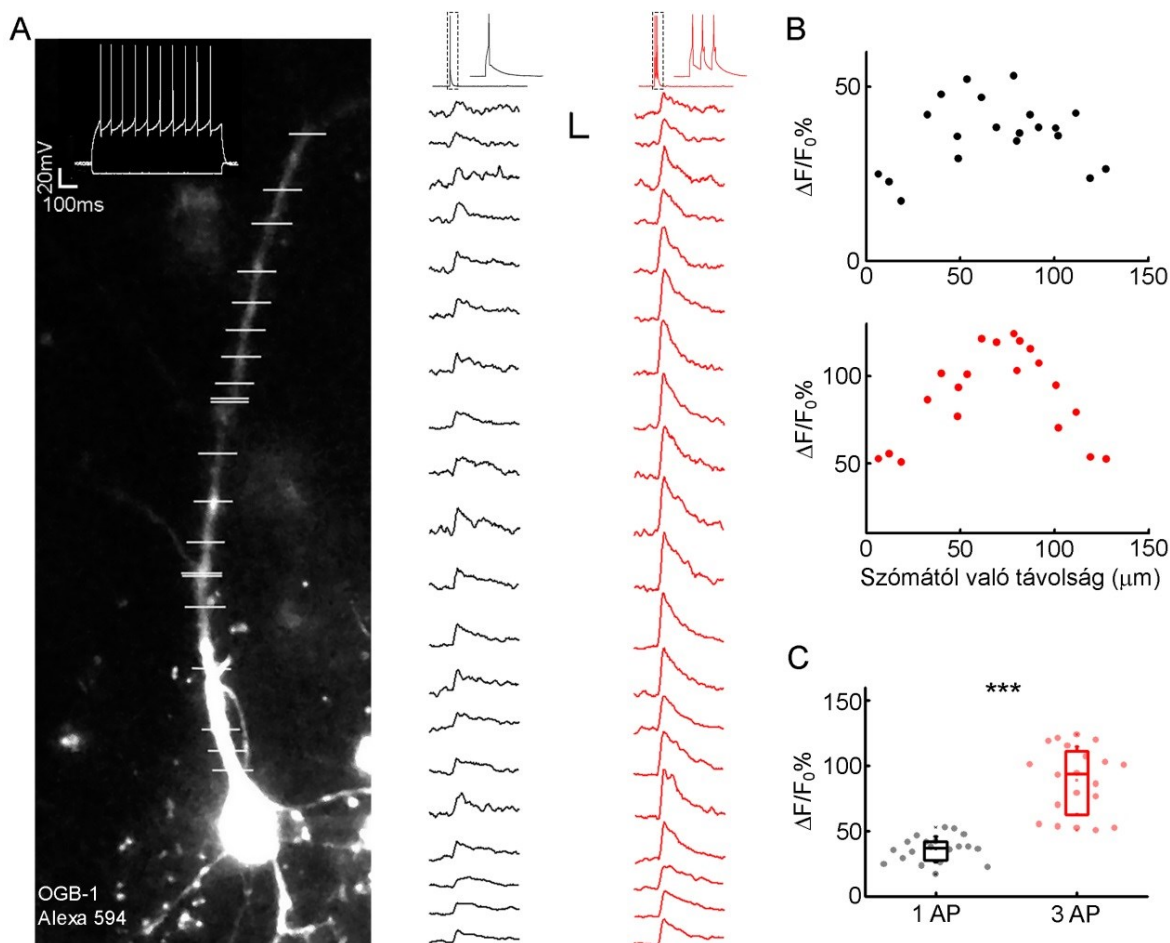
A: Emberi L2/3 piramisjelek anatómiai 3D rekonstrukciója csecsemő (balra) és időskori (jobbra) korcsoportból. A hisztogram (középen) a dendritikus tűskék eloszlását mutatja a számától való távolságuk szerint a két sejt apikális és bazális dendritjein. **B:** Dobozdiagramok az

apikális (fent) és bazális (lent) dendritek tüskesűrűségének különbségeit mutatják be $n = 3$ csecsemő (kék) és $n = 3$ időskori (piros) L2/3 piramissejtek között. **C:** A dendritikus tüskék sűrűségének átlagos eloszlását bemutató grafikonok a dendritikus szegmens rendjének függvényében, késsel a csecsemő és pirossal időskori csoport apikális (fent) és bazális (lent) dendritjein. **D-H:** Az ábrák a gomba (D), vékony (E), filopódium (F), elágazó (G) és tönkszerű (H) dendrittüske típusok eloszlását mutatják csecsemő (kék) és idős (piros) piramissejtek apikális dendritjein. Fent, a vizsgált tüske-típusok sematikus ábrázolása és reprezentatív képei láthatók. Középen a tüske-típusok korfüggő eloszlása, alul pedig a tüskék eloszlása a dendritikus szegmens rendjének függvényében. A csillagok szignifikanciát jeleznek (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ Mann-Whitney teszt). **I-M:** Ugyanaz, mint D-H, de a bazális dendriteken.

Szomatikus akciós potenciál által indukált Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó-eloszlása az apikális dendrit mentén

A szomatikusan kiváltott akciós potenciálok a dendritikus ágakon keresztül visszafelé terjedve szinte a teljes dendrit hossz mentén feszültség-kapuzott Ca^{2+} csatornákat aktiválnak. A visszaterjedő AP-k fontos szerepet játszanak a szinaptikus plaszticitásban, a dendritiek ingerlékenységének modulálásában, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelésével az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak helyreállításában, valamint elősegítik a neuronok *burst* típusú tüzelését (Lemon és Turner, 2000). A bAP-k által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek térbeli profilját L2/3 piramissejteken rágsálókban már jellemezték (Waters és mtsai., 2003), de a humán neokortikális piramissejtek dendritikus jelfeldolgozása kevésbé ismert. A szomatikus AP által indukált Ca^{2+} -jelek eloszlásának vizsgálatához kísérleteinkben emberi agykérgi L2/3-as piramissejtek apikális dendritjeit vizsgáltuk akut agyszeletekben, egyidejű szomatikus egészsejtes patch-clamp stimulációt és két-foton Ca^{2+} -képalkotást (100 Hz) végezve. Az idegsejteket Oregon Green BAPTA - 1 (OGB-1, 100 μM) nagy affinitású Ca^{2+} -szenzorral és Alexa Fluor 594 (15 μM) fluorofórral töltöttük fel a patch-clamp mikropipettán keresztül, amellyel a sejt nyúlványait tettük láthatóvá (9. ábra A). A Ca^{2+} -tranziensek térbeli profiljának jellemzéséhez az apikális dendriten haladva több ponton mértük a Ca^{2+} -jelek amplitúdóját, miközben egy vagy három bAP-t idéztünk elő rövid áramimpulzusok (5 ms) szómába injektálásával (9. ábra A). Minden dendritikus régió esetén szignifikánsan magasabbak voltak a három bAP által előidézett Ca^{2+} -tranziensek, mint az egyetlen bAP által indukáltak. Átlagosan

kétszer nagyobb volt a Ca^{2+} -jelek amplitúdója 3 AP esetén, mint az 1 AP által kiváltott tranziensek során (1 AP: $36,42 \pm 9,93\%$; 3 AP: $88,96 \pm 2,6\%$; $P = 9,57 \times 10^{-5}$, Wilcoxon signed ranks teszt) (9. ábra C). A kialakult szignálok amplitúdó-eloszlása a sejttesttől való távolság függvényében azonban nem változott, függetlenül a kiváltott AP-k számától. A bAP indukált tranziensek a sejttest közelében kis amplitúdójúak, azonban a szómától távolodva a Ca^{2+} -szignálok nagysága nő, a szómától 50-100 μm közötti távolságban éri el a maximum értékeit majd az apikális dendriten tovább haladva disztális irányban a tranziensek amplitúdója csökkenni kezd (9. ábra B). Az általunk bemutatott amplitúdó eloszlás hasonló a rágesáló L2/3 piramissejtekre (Waters és mtsai., 2003) illetve a kortikális szabályosan tüzelő interneuronokra jellemző Ca^{2+} -jel térbeli profiljához (Cho és mtsai., 2010).



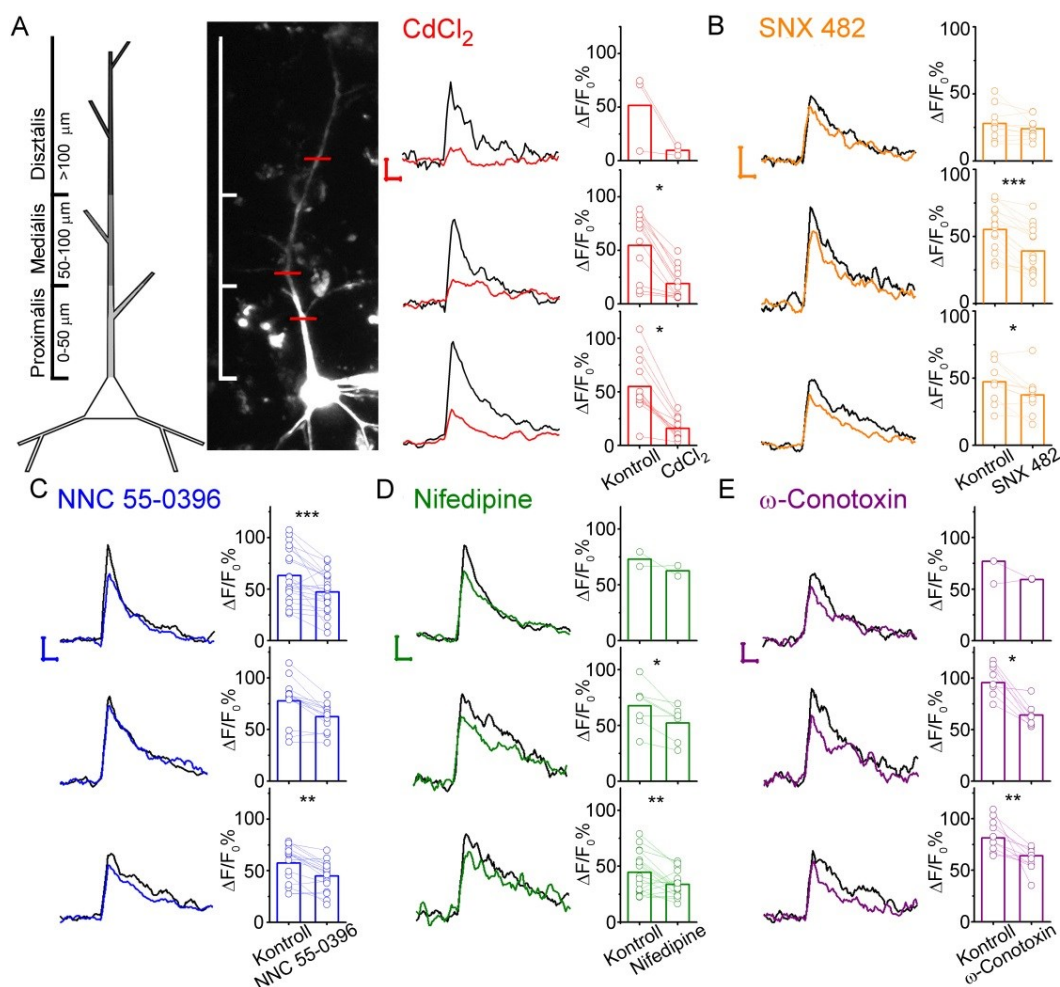
9. ábra: Szomatikus akciós potenciál által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó-eloszlása az apikális dendrit mentén

A: Két-foton kép egy emberi neokortikális L2/3 piramis sejtről, amely OGB-1 és Alexa 594 fluorofórokkal van feltöltve. Reprezentatív Ca^{2+} -tranziensek az apikális dendrit mentén, a vízszintes vonalakkal jelzett régiókról, amelyeket 1 AP (fekete) vagy 3 AP (100 Hz, piros) idézett elő (skála: x tengely: 200 ms, y tengely: 50 mV / 50%). **B:** A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának térbeli profilja a sejtesttől való dendritikus távolság függvényében, amelyet egy bAP (fent, fekete) vagy három bAP (lent, piros) idézett elő. **C:** Az egy vagy három AP által kiváltott Ca^{2+} -jelek amplitúdójának összehasonlítása (Wilcoxon signed ranks test *** P < 0,001).

Ca^{2+} -csatorna altípusok hozzájárulása a Ca^{2+} -jelek amplitúdójához az apikális dendritben

A különböző Ca^{2+} -csatorna altípusok Ca^{2+} -jelekhez való hozzájárulásának vizsgálata érdekében a nem specifikus $CdCl_2$ VGCC blokkoló mellett szelektív csatorna antagonisták alkalmazásával vizsgáltuk az N-, L-, T- és R-típusú VGCC-eket. Mindegyik feszültség-aktiválta

Ca²⁺-csatorna antagonistá szignifikánsan csökkentette (CdCl₂: $P = 1,83 \times 10^{-6}$; SNX 482: $P = 1,49 \times 10^{-6}$, Wilcoxon signed ranks teszt; NNC 55-0396 $P = 2,88 \times 10^{-9}$, páros mintás t-test; Nifedipine: $P = 5,52 \times 10^{-4}$, Wilcoxon signed ranks teszt; ω -Conotoxin: $P = 9,41 \times 10^{-6}$, Wilcoxon signed ranks teszt) a kialakult Ca²⁺-tranziensek amplitúdóját a kontrollhoz képest az azonos dendritikus régiókon. Továbbá megvizsgáltuk a csatorna típusok régió-specifikus hozzájárulását a Ca²⁺-jelek amplitúdójához az apikális dendrit proximális (szómától 0 - 50 μ m távolságban), mediális (szómától 50-100 μ m-re) és disztális (szómától 100 μ m-nél távolabb) szakaszain (10. ábra). A VGCC CdCl₂-dal (200 μ M) való gátlása esetén a Ca²⁺-jelek szignifikáns csökkenését tapasztaltuk az apikális dendritek proximális ($P = 1,66 \times 10^{-3}$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $54,95 \pm 25,72\%$, CdCl₂: $15,88 \pm 9,51\%$) és mediális szakaszain ($P = 1,66 \times 10^{-3}$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $54,56 \pm 31,3\%$, CdCl₂: $19,02 \pm 14,43\%$) (10. ábra A). Az R-típusú VGCC-k blokkolása az elvezető oldatban alkalmazott SNX 482-vel (300 nM, $n = 3$) a Ca²⁺-jelek szignifikáns csökkenését okozta a proximális ($P = 0,014$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $47,22 \pm 14,56\%$, SNX 482: $37,44 \pm 14,05\%$) és mediális ($P = 2,8 \times 10^{-6}$, páros mintás t-próba, kontroll: $55,14 \pm 17,59\%$, SNX 482: $39,16 \pm 17,37\%$) szegmensek esetén, de a disztális régiókban nem ($P = 0,15$, Wilcoxon signed ranks test, kontroll: $27,87 \pm 12,44\%$, SNX 482: $24,02 \pm 8,03\%$) (10. ábra B). A T-típusú Ca²⁺-csatorna blokkoló NNC 55-0396 (100 μ M, $n = 4$) alkalmazása a tranziensek szignifikáns csökkenését eredményezte minden dendritikus régióban (proximális: $P = 1,78 \times 10^{-3}$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $57,43 \pm 17,38\%$, NNC 55-0396: $44,94 \pm 14,46\%$; mediális: $P = 3 \times 10^{-3}$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $77,74 \pm 22,27\%$, NNC 55-0396: $62,28 \pm 13\%$; disztális: $P = 8,79 \times 10^{-4}$, páros mintás t-próba, kontroll: $63,13 \pm 25,84\%$, NNC 55-0396: $47,21 \pm 19,83\%$) (10. ábra C). Az L-típusú VGCC antagonistá Nifedipine (20 μ M, $n = 5$) a sejttesttől 100 μ m-nél közelebbi dendrit szakaszokon csökkentette a Ca²⁺-tranziesek amplitúdóját (proximális: $P = 5,8 \times 10^{-3}$, páros mintás t-próba, kontroll: $44,57 \pm 18,28\%$, nifedipine: $33,72 \pm 10,7\%$; mediális: $P = 0,023$, Wilcoxon signed ranks test, kontroll: $67,62 \pm 20,08\%$, nifedipine: $52,25 \pm 15,32\%$) (10. ábra D). Az N-típusú VGCC-k szelektív blokkolásához ω -Conotoxint (1 μ M, $n = 2$) adtunk az elvezető oldathoz, ebben az esetben is az apikális dendrit proximális ($P = 0,008$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $83,89 \pm 15,54\%$, ω -Conotoxin: $60,27 \pm 11,04\%$) és mediális ($P = 0,014$, Wilcoxon signed ranks teszt, kontroll: $98,56 \pm 15,02\%$, ω -Conotoxin: $62,96 \pm 11,4\%$) részén tapasztaltunk csökkenést a fluoreszcens szignálban (10. ábra E).

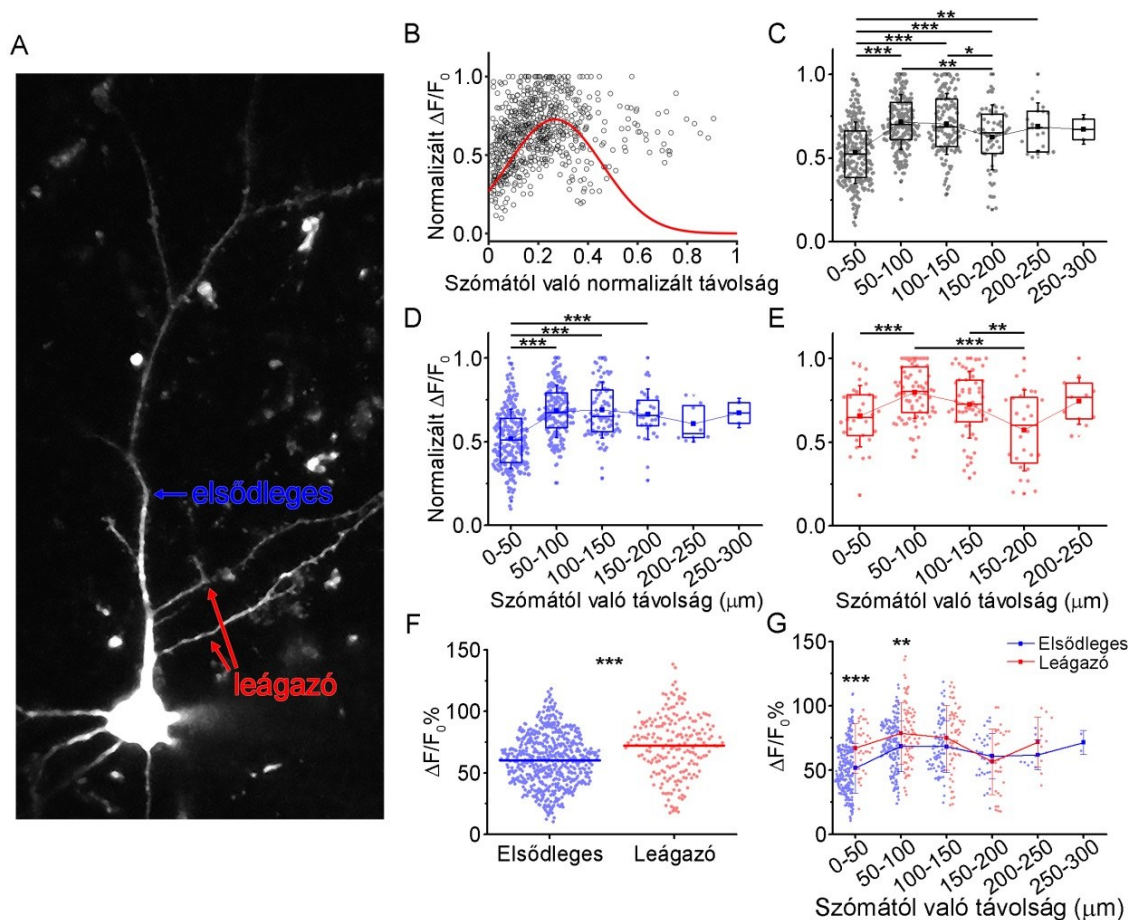


10. ábra: Specifikus VGCC blokkolók hatása a kiváltott Ca^{2+} -jelekre különböző dendritikus régiókban

A: Egy sematikus és egy két-fotonos kép egy emberi L2/3 piramissejtről, a proximális, mediális és disztális dendrit régiókat ábrázolva. Középen reprezentatív Ca^{2+} -szignálok a piros horizontális vonallal jelölt dendritikus régiókról (fekete: kontroll, piros: CdCl_2 bemosása után rögzített jelek). Jobb oldalon az oszlopdiagramok az CdCl_2 blokkoló hatását mutatják be fentről lefelé a disztális, mediális és proximális apikális dendrit szakaszokon. **B-E:** Hasonlóan az (A) ábrához a bal oldalon reprezentatív Ca^{2+} -tranziensek, a jobb oldalon SNX 482 (B), NNC 55-0396 (C), nifedipine (D) és ω -Conotoxin (E) hatása a tranziensek amplitúdójára (fentről lefelé) a disztális, mediális és proximális dendrit szakaszokon (skála: x tengely: 100ms, y tengely: 20%) (Wilcoxon signed ranks teszt: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóinak térbeli profilja az elsődleges és a leágazó apikális dendriteken

Kísérleteinkben még a sejttesttől 270 μm távolságban is képesek voltunk egyetlen bAP által kiváltott Ca^{2+} -jelet detektálni. A vizsgált $n = 36$ humán agykérgi L2/3 piramissejt (*pyramidal*-től való távolság: $397,76 \pm 92,87 \mu\text{m}$) alapján nem-lineáris térbeli eloszlást figyelhetünk meg a bAP-indukált tranziensek nagyságában, amelyek a sejttest közelében kis amplitúdójúak, a szómától távolodva a Ca^{2+} -jelek amplitúdója növekszik, majd a maximum érték elérése után ismét csökkenő amplitúdójú jelek tapasztalhatóak (11. ábra B) ($P = 2,09 \times 10^{-27}$, Kruskal-Wallis poszt-hoc Dunn-tesztel) (11. ábra C). A piramissejtek elsődleges, vagyis a szómát elhagyó vastag dendrit és a vékonyabb elágazásokat alkotó leágazó dendriteken mérhető Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóinak térbeli eloszlása hasonló. A leágazó dendriteken mért Ca^{2+} tranziensek térbeli eloszlása ($P = 6,89 \times 10^{-5}$, Kruskal-Wallis poszt-hoc Dunn-tesztel) (11. ábra E) az elsődleges apikális dendritekre jellemző nem-lineáris - proximálisan növekvő majd disztálisan csökkenő amplitúdójú szignálok - ($P = 4,22 \times 10^{-21}$, Kruskal-Wallis poszt-hoc Dunn-tesztel) (11. ábra D) térbeli eloszlást követi. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a bAP által kiváltott Ca^{2+} fluoreszcencia maximális értéke döntő többségben a leágazó dendriteken volt mérhető. Összehasonlítva a két dendrit típust azt találtuk, hogy a leágazódásokon mért tranziensek átlagos amplitúdója szignifikánsan magasabb volt, az elsődleges dendriteken mértekhez képest ($P = 3,97 \times 10^{-10}$, Mann-Whitney teszt) (elsődleges: $60,36 \pm 20,98\%$; leágazódó: $72,4 \pm 24,58\%$) (11. ábra F). Amikor a Ca^{2+} -szignálok amplitúdóját a sejttesttől mért távolság függvényében vizsgáltuk a két dendrit típus között, szignifikáns különbségeket találtunk a proximális ($P = 1,1 \times 10^{-4}$, Mann-Whitney teszt, elsődleges: $51,52 \pm 19,56\%$; leágazó: $66,92 \pm 19,19\%$) és mediális ($P = 1,56 \times 10^{-3}$, kétmintás t-próba, elsődleges: $68,46 \pm 19,54\%$; leágazó: $78,51 \pm 23,88\%$) dendritszegmenseken (11. ábra G), azonban a disztális dendrit szakaszokon nem találtunk eltérést a bAP által indukált fluoreszcencia intenzitás amplitúdókban.



11. ábra: A tranziensek amplitúdó-eloszlása a szómától való távolság függvényében az elsődleges és a leágazó dendriteken

A: Egy reprezentatív emberi L2/3 piramissejt két-foton képe, kék nyíl az elsődleges, piros nyilak leágazódó apikális dendriteket jelölik. **B:** Az elsődleges és magasabb rendű dendritek populációs adatainak ($n = 36$ sejt) normalizált térbeli profilja. A távolságot minden egyes neuronban a szóma és a *pia mater* közötti távolságra normalizáltuk, a Ca^{2+} -tranzienst amplitúdókat az egyes piramissejtekben a $\Delta F/F_0$ amplitúdó maximális értékéhez normalizáltuk. **C:** Dobozdiagram a vizsgált piramissejt Ca^{2+} -jelekeinek térbeli eloszlását mutatja be az apikális dendriteken (Kruskal-Wallis teszt poszt-hoc Dunn-teszttel, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). **D-E:** Dobozdiagram a Ca^{2+} -tranzienstok térbeli profiljáról az elsődleges (D) és a leágazó (E) dendriteken (Kruskal-Wallis teszt poszt-hoc Dunn-teszttel, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). **F:** Ca^{2+} -szignálok különbsége a leágazó és az elsődleges apikális dendritek között (Mann-Whitney teszt *** $P < 0,001$). A vízszintes vonal a pontokkal jelölt egyedi Ca^{2+} -tranzienstok átlagát jelzi. **G:** A tranziensek amplitúdói közötti különbségek az elsődleges és a leágazó dendritek között a dendrit mentén. A kék (elsődleges) és piros (leágazó) négyzetek a $\Delta F/F_0$ amplitúdó átlagát, a függőleges vonalak a szórást, a pontok pedig az egyedi tranzienseket jelölik (Mann-Whitney vagy kétmintás t-próba: *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$).

6. Diszkusszió

Az elektrofiziológiai tulajdonságok életkorral összefüggő változásai

Az idegrendszer az élettartam során számos plasztikus változáson megy keresztül. Ezek a változások a fejlődés korai szakaszától kezdve az időskorral járó fokozatos degeneratív folyamatokig tartanak. Bár az ismereteink a korral összefüggő pontos, sejt szintű módosulásokról továbbra is bizonytalanok, az ismert, hogy a korai fejlődés során megfigyelhető morfológiai változások mennek végbe. Az idegrendszer érésével a dendritikus ágak (Kasper és mtsai., 1994; McAllister, 2000) és a sejtest mérete növekszik (Zhang, 2004). Emellett a tanulás és a tapasztalat hatására a dendritikus elágazások száma (Holloway, 1966; Greenough és Volkmar, 1973) és a dendritikus tüskék mérete is megnő (Globus és mtsai., 1973). Széleskörű vizsgálatok bizonyították, hogy a szinaptikus plaszticitás új dendrittüskék kialakulását illetve a meglévő tüskék megnagyobbodását indukálja (Kastellakis és mtsai., 2023). Ezek a változások befolyásolhatják a neuronok intrinzik biofizikai tulajdonságait, ahogy azt idegsejtek modelljein végzett vizsgálatokon is bemutatták, a dendritfa geometriai tulajdonságai befolyásolják a sejt elektromos és tüzelési tulajdonságait (Mainen és Sejnowski, 1996; Vetter és mtsai., 2001; van Elburg és van Ooyen, 2010; Eyal és mtsai., 2014). Továbbá a sejtek morfológiai változása mellett az ioncsatornák érése és a sejtmembránban elhelyezkedő csatornák sűrűségének növekedése is szerepet játszik az idegsejtek elektromos tulajdonságainak befolyásolásában (Huguenard és mtsai., 1988; Connors, 1994). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy a sejtek morfológiája és az elektrofiziológiai tulajdonságai között szoros kapcsolat van.

A neuronok intrinzik elektrofiziológiai tulajdonságait több tényező határozza meg: a citoplazma és a membrán ellenállása, a membrán kapacitása, valamint a sejtest és a dendritek morfológiája. Az általunk vizsgált alapvető passzív elektrofiziológiai paraméterek, úgymint a nyugalmi membránpotenciál, a bemenő ellenállás és a membrán időállandója drámai változást mutatnak az első évben. Ez a változás összhangban van a rágsálómodellekből származó neokortikális piramissejteken (McCormick és Prince, 1987; Kasper és mtsai., 1994; Zhu, 2000; Picken Bahrey és Moody, 2003; Zhang, 2004; Kroon és mtsai., 2019) és xenotranszplantált emberi agykérgi neuronokon (Linaro és mtsai., 2019) végzett korábbi vizsgálatokban talált eredményekkel. A nyugalmi membránpotenciál -60 mV-ról -68 mV-ra történő eltolódását találtuk az élettartam első felében (< 40 év), ami az ioncsatornák összetételének életkorfüggő

megváltozásával magyarázható (Picken Bahrey és Moody, 2003). A bemenő ellenállás és az időállandó ugrásszerű csökkenése az első és a második korcsoport között, a csecsemőkori agyban bekövetkező drasztikus változásokat jelzi, amelyet egy lassabb csökkenés követ felnőttkorig. A piramissejtek érésével a sejtest mérete és térfogata növekszik (Zhu, 2000; Petanjek és mtsai., 2019), ami korrelál a bemenő ellenállással, tehát a kisebb membránfelület nagyobb bemenő ellenállással jár (Luhmann és mtsai., 2000). A sejtfelszín növekedése mellett bizonyos szivárgó K^+ -csatornák, például a két pórus doménnel rendelkező káliumcsatorna (KCNK) családba tartozó ioncsatornák expressziójának növekedése is befolyásolhatja a bemenő ellenállást a sejt fejlődése során (Goldstein és mtsai., 2001; Aller és Wisden, 2008). Hasonló okok vezethetnek a membrán időállandójának csökkenéséhez. A membrán időállandó a specifikus bemenő ellenállás és a specifikus membránkapacitás szorzata. Állandó membránkapacitást feltételezve ($\sim 1 \text{ pF/cm}^2$, Beaulieu-Laroche és mtsai., 2018; Oláh és mtsai., 2024), a csökkenés valószínűleg szintén a specifikus membránellenállás változásának köszönhető. A korai fejlődés során a membrán passzív paramétereiben bekövetkező változások eredményeül javul az AP időzítés pontossága és az időbeli válaszkészség az agykérgi mikrohálózatban (Doischer és mtsai., 2008; Oswald és Reyes, 2011). Az idősebb (>40 év) emberi mintáinkban, amelyeket az öregedő agyhoz társítunk, azonban a piramissejtek intrinzik tulajdonságainak változása a korábbi tendenciákkal ellentétesek. A bemenő ellenállás és az időállandó nő, ami összefüggésbe hozható a KCNK expressziójának csökkenésével az öregedő agyban (Erraji-Benchekroun és mtsai., 2005). Ezeknek a membrán paramétereknek az értéke általában növekszik az idősödő rézuszmagmokon végzett vizsgálatokban is (Moore és mtsai., 2023), kivéve a nyugalmi membránpotenciált, amely nem különbözik a fiatal agykérgi L2/3 (Chang, 2005) vagy L5 piramissejtek (Luebke és Chang, 2007) membránpotenciáljától. A mi mintáinkban azonban a nyugalmi membránpotenciál néhány millivoltos növekedését találtuk a középkorú és időskori csoportok között, viszont ez az eltérés abból adódhat, hogy vizsgálatainkban szereplő korcsoportok nem azonosak az említett tanulmányokéval.

A nyugalmi membránpotenciál és a bemenő ellenállás változásai az életkor előrehaladtával az átlagos reobázikus áram emelkedő, majd csökkenő tendenciáját eredményezik, amelynek értéke a serdülő csoportban háromszor nagyobb, mint a legfiatalabb csoportban, és másfélszer nagyobb, mint időskorban. A fiatalkor során növekvő reobázissal kapcsolatos eredményeink összhangban vannak a rágsálók agykérgi L3 és 5 piramissejtjein

végzett korábbi tanulmányokkal (Kroon és mtsai., 2019; Perez-García és mtsai., 2021; Popescu és mtsai., 2021), valamint a rézuszmajomból származó agykérgi neuronok öregedésével kapcsolatos eredményekkel (Moore és mtsai., 2023).

A hiperpolarizáló áramlépcsőre kialakuló sag arányát vizsgálva az életkor függvényében, folyamatos növekedést találtunk csecsemőkortól egészen idős korig. A membrán hiperpolarizációja során fellépő feszültségcsökkenés a hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid kapuzott (HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated*) áram, más néven h-áram aktiválódásának eredménye. Eredményeinkhez hasonlóan a sag arányának életkorfüggő növekedését figyelték meg emberi agykérgi piramissejtekben (Kalmbach és mtsai., 2018; Guet-McCreight és mtsai., 2023), ami összhangban van Wang és munkatársai (Wang és mtsai., 2007, 2011) tanulmányaival, amelyek a HCN-áram gátlását a memória javulásával hozták összefüggésbe idős majmok esetében.

A neuronok elektromos kimenetét a neuron molekuláinak és ioncsatornáinak összetétele határozza meg, amelyek kifejeződése és eloszlása a korai fejlődésben és az öregedő agyban változik a legdinamikusabban. Ez a dinamika az adatsorunkban lényegében egy fordított U alakú görbét eredményezett az idegsejtek aktív elektromos tulajdonságaiban az életkor függvényében: emelkedés az első évben, egy viszonylag stabil középső fázis, majd az élet korai fázisához hasonló értékekhez való visszatérés az idősebb korosztályokban. Ezen változások eredete elsősorban a nátrium- és káliumcsatornák eloszlásában bekövetkező változásokra vezethető vissza. A fejlődés során a feszültségfüggő Na^+ -csatornák száma nő a rácsálókban (Huguenard és mtsai., 1988; Picken Bahrey és Moody, 2003) és az emberben (Erraji-Benchekroun és mtsai., 2005), ami az eredményeinkhez hasonlóan felgyorsíthatja az akciós potenciál kinetikáját (AP-felfutás) és növelheti az akciós potenciál amplitúdóját (McCormick és Prince, 1987; Zhang, 2004; Etherington és Williams, 2011; Kroon és mtsai., 2019; Perez-García és mtsai., 2021). Az öregedés során azonban a csatornák expressziója megváltozik, ami az ionáramok eltérő konduktanciájához vezethet. Az agy öregedése során az AP amplitúdója és az AP lassulása a mi adatainkhoz hasonlóan bizonyult rézuszmajmokban is (Luebke és Chang, 2007), amit a feszültségfüggő Na^+ -csatornák csökkent expressziója okozhat (Erraji-Benchekroun és mtsai., 2005).

Az F-I meredekség összehasonlítása során megvizsgáltuk a piramissejtek tüzelési mintázatát a különböző életkorokban, viszont nem találtunk különbséget az idegsejtek tüzelési

mintázatában a korcsoportok között. Rágcsálók fejlődése során az F-I meredekség csökkenése látható, azonban csak a születés utáni első két hétben (McCormick és Prince, 1987; Zhang, 2004), amely időablakot a mi adataink nem reprezentálják. Egy áramlépcső hatására kialakuló első AP latenciáját az időállandó és specifikus ioncsatornák, mint például a tranziens (A-típusú) K^+ -áram és a tranziens Ca^{2+} -áram (T-típusú) befolyásolják (Molineux és mtsai., 2005). Ugyanezek az ioncsatornák vesznek részt a stimuláló áramlépcső kezdetén előforduló *burst* tüzelésben is. Meg kell jegyeznünk, hogy a mi mintánkban a piramissejteknek mindösszesen ~10%-a mutatott *burst* jellegű tüzelést a stimuláció kezdetén, ugyanakkor ismert, hogy a *burst* tüzelés az agykéreg 3. rétegtől kezdődően a mélyebb rétegek sejtjei esetében gyakoribb (Berg és mtsai., 2021). Rágcsálókön végzett vizsgálatokban a szenzomotoros területek éretlen piramissejtjeiben A-típusú K^+ -áram volt megfigyelhető (McCormick és Prince, 1987), illetve a T-típusú Ca^{2+} -áram denzitása is változatlan marad a látókéreg fejlődése során (Horibe és mtsai., 2014). Kimutatták, hogy a T-típusú Ca^{2+} -csatorna család (CACNG3) expressziója csökken az öregedés során (Erraji-Benchekroun és mtsai., 2005).

A dendritikus arborizáció tulajdonságai és a dendrittüskék eloszlása az életkor függvényében

Korai postmortem vizsgálatokban már tanulmányozták az emberi piramissejtek életkor függvényében bekövetkező morfológiai változásait. Ezekben a vizsgálatokban Golgi-festési módszereket alkalmazva azt találták, hogy a csecsemőkori szupragranuláris piramissejtek dendritfája a felnőtt sejtekhez hasonlóan fejlett (Mrzljak és mtsai., 1991). A humán prefrontális kéregben a születés után a 3. rétegbeli piramissejtek dendrit arborizációja körülbelül a születést követő 3. hónap után éri el a szerkezetileg érett formáját (Petanjek és mtsai., 2008). Ezt követően feltételezhető, hogy a dendritikus hossz kisebb mértékű növekedése körülbelül 7,5-12 hónapos kor között éri el végleges formáját (Koenderink és Uylings, 1995; Petanjek és mtsai., 2008). Vizsgálatunkban az apikális és bazális dendrit hossz és a dendritfa komplexitásának változatlan mintázatát figyeltük meg az élettartam során. Még a korai posztnatális csoportok között (csecsemőkori és kisgyermekkor) sem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a dendritikus fa méretében. Ez több tényező hatásával magyarázható, például az egyes páciensek közötti egyedi különbséggel, vagy a piramissejtek altípus-specifikus dendritmorfológiájával (Berg és mtsai., 2021), illetve a különböző agyi régiókból származó neuronok eltérő fejlődési rátájával (Elston és

Fujita, 2014) vagy az agykérgi rétegekben különböző mélységben elfoglalt helyükkel (Petanjek és mtsai., 2008).

A neuronok a szinaptogenezisnek egy hónapokig vagy évekig tartó, szinapszisokat túltermelő szakaszán mennek keresztül az emberi kéregben (Huttenlocher, 1979; Huttenlocher és mtsai., 1982; Mrzljak és mtsai., 1991; Petanjek és mtsai., 2011), amelyet a dendritikus tüskék/szinapszisok egy részének eliminációja az úgynevezett “*pruning*” követ, amely a megfigyelések szerint több mint egy évtizedig tart az agykéregben (Jacobs és mtsai., 1997; Petanjek és mtsai., 2011; Benavides-Piccione és mtsai., 2013; Coskren és mtsai., 2015; Mavroudis és mtsai., 2015). Csecsemő és idős korcsoportokból származó piramissejteket összehasonlítva eredményeink szintén azt mutatják, hogy a dendrittüskék teljes száma az életkor előrehaladtával csökken. A fiatal és idős piramissejtek tüske típusainak eloszlását vizsgálva az idős piramissejtek dendritjein nagyobb számban találtunk nagy fejjel rendelkező (gomba típusú) dendritikus tüskéket. A tüskefej mérete a posztzinaptikus sűrűség méretét, a glutamátreceptorok számát és a szinapszis erősségét jelzi (Nusser és mtsai., 1998; Matsuzaki és mtsai., 2001; Bourne és Harris, 2008) tehát a nagyobb fejjel rendelkező tüskéket fejletnek tekinthetjük. A fejlődő idegrendszerben azonban a filopodiális, vékony, fej nélküli dendritikus tüskék a legjellemzőbbek. A filopodiális tüskék sűrűsége jóval nagyobb volt a csecsemő piramissejtek dendritjein, viszont az idősebb sejtekben még mindig találhatók filopodiális tüskék, amelyek a tüskék korai fejlődési szakaszában lévő még receptorokat kevésbé tartalmazó „néma” nyúlványai (Vardalaki és mtsai., 2022). A tüske típusok arányainak változása fiatal és idős kor között ismert, és összefüggésbe hozható az öregedés során a kognitív funkciók változásának alapjaival (Jacobs és mtsai., 1997; Dumitriu és mtsai., 2010; Luebke és mtsai., 2015).

Az emberi agytevékenység és a kognitív képességek komplexitása a fejlődéssel növekszik, az öregedéssel pedig csökken, ami egy fordított U-alakú görbét eredményez az élettartam során (Craik és Bialystok, 2006). A kognitív funkciók számos életkorral kapcsolatos tényezőtől függenek, mint például a szinaptikus plaszticitás révén kialakuló kapcsolatok sűrűsége és specifitása, vagy a mielinizáció és a fehérállomány érésének mértéke, és a neurotranszmitterek, hormonok, iontranszporterek és receptorok életkorfüggő modulációja is megfigyelhető (Luna és mtsai., 2015). Összefoglalva vizsgálatainkat, bemutattunk, hogy a piramissejtek a fejlődés során kevésbé gerjeszthetővé és időben precízebbé válnak azáltal, hogy megváltoznak a belső funkcionális tulajdonságaik, és az öregedés során ezek a változások

némileg ellentétes irányban történnek, így az intrinzik paraméterek szimmetrikusan változnak. Ezen kívül néhány aszimmetrikus változás is megfigyelhető fejlődés, vagy öregedés során, mint például a nyugalmi membránpotenciál, amely legnagyobb mértékben fiatal korban változik, továbbá a sag aránya, amely idős korban módosul leginkább. A sejtek intrinzik tulajdonságainak ezen változásai az élet korai és kései szakaszaiban is hozzájárulnak a neuron mikrohálozatban betöltött funkcióihoz és végső soron a kognitív képességek életkorfüggő változásaihoz.

Szomatikus akciós potenciál által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek térbeli eloszlása

Az agykérgi piramissejtek térfogatának nagy részét a dendritek teszik ki, a szinapszisaik többsége is a dendritikus régióban jön létre, ahonnan a beérkező információt a sejttest, illetve az axon irányába vezetik, ahol kialakul a sejt válasza a beérkező inger nagyságának függvényében. Azonban a dendritek a szinapszisokon keresztül érkező információt passzív és aktív tulajdonságai révén befolyásolják a posztzinaptikus jelek integrációját így alakítva a sejt kimentét (Fishek és Häusser, 2020). A dendritek aktív jellemzői révén a posztzinaptikus jelek integrációja mellett az axon iniciális szegmentumon kialakuló akciós potenciálokat is képesek membránjukban elhelyezkedő feszültségfüggő ion csatornái révén aktív visszaterjedő akciós potenciálként a szinaptikus hely irányába vezetni, ezzel is befolyásolva a dendritikus jelfeldolgozást, illetve a szinapszis erősséget modulálni az intracelluláris Ca^{2+} -szint megemelésével (Landau és mtsai., 2022).

Eredményeink azt mutatták, hogy egyetlen akciós potenciál is képes Ca^{2+} -beáramlást kiváltani a humán piramissejtek apikális dendritjeiben, amelyek akár 270 μm -re is eljutnak a szómától. A kiváltott Ca^{2+} -jelek térbeli profilja az apikális dendrit hosszán nem lineáris jellegzetességet mutat: a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója a szómától való távolsággal nő, a szómától 50-100 μm -re lévő dendritikus régióban éri el a maximális értékét, majd a disztális régiók felé csökken, ez összhangban van a rágcslókban leírt eredményekkel (Svoboda és mtsai., 1997; Waters és mtsai., 2003). A Ca^{2+} -tranziensek térbeli profiljának, illetve a tranziensek amplitúdó csökkenésének hátterében a szomatikus akcióspotenciálok attenuációja állhat a disztális dendritek irányában. A bAP disztális irányban való propagációja alatt az AP formája megváltozik, a bAP attenuációja során az amplitúdója csökken illetve a szélessége nő, emiatt a bAP a dendriten haladva nem azonos mértékben képes aktiválni az ott elhelyezkedő feszültségkapuzott ioncsatornákat (Waters és mtsai., 2003; Brunner és Szabadics, 2016). A sejttesthez

közeli szakaszokon főként a HVA VGCC-k vehetnek rész, viszont disztálisan haladva az bAP amplitúdójának csökkenésével, a kisebb feszültségváltozás hatására inkább a LVA VGCC-k alakíthatják ki a Ca^{2+} -jeleket (Christie és mtsai., 1995; Svoboda és mtsai., 1999). A piramis sejtekre érkező serkentő illetve gátló szinapszisok aránya is különbözhet a dendrit különböző régióin. GABA-blokkolás hatására a disztálisan mért Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója megnőtt (Larkum és mtsai., 2007), humán piramis sejtekben pedig a GABAerg csipkebogyó sejt szinaptikus kapcsolata szegment-specifikusan képes a bAP által kiváltott Ca^{2+} -szignálok amplitúdóját csökkenteni (Boldog és mtsai., 2018). A dendritikus régióra érkező bementek eloszlása hatással lehet a bAP indukálta Ca^{2+} -tranziensek térbeli profiljára. Eredményeink miszerint nagyobb számú szomatikus AP nagyobb Ca^{2+} -tranzienseket volt képes kiváltani, azonban a térbeli profilját nem változtatta meg a nagyobb stimuláció, szintén összeegyeztethető korábbi rácsálókön végzett kísérletekkel, a nagyobb feszültségváltozás több feszültségfüggő ioncsatornát aktiválhat, ami a Ca^{2+} -influx megnövekedését eredményezheti (Svoboda és mtsai., 1997, 1999).

A jellegzetes nem-lineáris térbeli profil az elsődleges illetve leágazó dendritikus szegmensek esetén is megfigyelhető, azonban a két dendrit típuson mért Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója eltérő nagyságú, amely a szómához közelebbi dendrit szakaszokon a legjelentősebb. A sejtesttől való távolságtól függetlenül is egyes dendritikus ágakban mért bAP által kiváltott Ca^{2+} -beáramlás mértéke különbözhet. Az eltérés adódhat az ioncsatornák lokális expressziós különbségeiből, például az A-típusú K^{+} -csatornák nagyobb denzitásban vannak jelen a leágazó dendritek membránjában, mint az elsődleges dendriteken (Frick és mtsai., 2003), illetve a VGCC-k mennyisége is eltérő lehet az egyes dendritikus ágak között (Landau és mtsai., 2022). Továbbá a dendritfa szerkezetétől is függ a Ca^{2+} -szignál nagysága, a komplex, több elágazást magukba foglaló dendritikus ágak kisebb bemeneti ellenállással rendelkeznek ez pedig a bAP illetve az általa kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját is csökkenti (Landau és mtsai., 2022). A bAP térbeli diverzitása az idegsejtek nyúlványain nagyban hozzájárulhat a szinapszisok plaszticitásának változatosságához egyetlen sejtben belül is.

A bAP terjedésével, a dendriteken végighaladó depolarizáció által aktivált VGCC-ken beáramló Ca^{2+} -ionok alakítják ki legnagyobb részben a szenzorok fluoreszcencia-változásán keresztül közvetetten megfigyelt intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedését. Azonban a Ca^{2+} -csatornák széleskörű gátlása után is képesek voltunk kis amplitúdójú Ca^{2+} -jeleket detektálni, ez

alapján arra következtethetünk, hogy a depolarizáció hatására a dendritek intracelluláris terébe jutó Ca^{2+} -ionok forrása nem kizárólag a VGCC-ken keresztül valósulhat meg. Azt már korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy az AP-k dendritekbe való aktív visszaterjedéséhez szükség van Na^+ -csatornákra (Waters és mtsai., 2003; Waters és Helmchen, 2004). Na^+ -csatornák hiányában ugyanis a szomatikusan injektált feszültségparancs a dendriten, mint egy passzív kábelon haladva gyorsan attenuálódik (Stuart és Sakmann, 1994), így a sejttesttől távolabbi dendritrégiókon található VGCC-k nem nyílnak ki, ezáltal a disztális szakaszokon nem alakul ki Ca^{2+} -influx. Továbbá patkány kérgi piramissejtek axonjaiban már kimutatták, hogy a Ca^{2+} -beáramlása az intracelluláris térbe nem csak Ca^{2+} -csatornákon, hanem TTX-érzékeny VGSC-ken keresztül is végbemegy (Hanemaaijer és mtsai., 2020). A striátum interneuronjaiban a bAP által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket kialakításához a sejtmembránban elhelyezkedő VGCC-k mellett a sejt intracelluláris raktáraiból felszabaduló Ca^{2+} is hozzájárul (Plotkin és mtsai., 2013). A membrán potenciál depolarizálódásának következtében (bAP) az NMDA receptorokon keresztül is történhet Ca^{2+} -beáramlás, abban az esetben ha a depolarizáció elegendően nagy a receptor Mg^+ blokkjának eltávolításához (Bloodgood és Sabatini, 2009).

A bAP indukált Ca^{2+} -szignálok kialakítása különböző ioncsatornák összehangolása révén zajlik, azonban ezeknek a résztvevő csatornák pontos hozzájárulása még nem teljes ismert (Blömer és mtsai., 2024). Eredményeink is azt tükrözik, hogy a tranziensek kialakítása főként a dendritikus VGCC-ken keresztül valósul meg. A Ca^{2+} -csatornák altípusai azonban változó mértékben járulhatnak hozzá a Ca^{2+} -beáramlásának szabályozásában (Blömer és mtsai., 2024). A sejttesthez közel HVA, távoli szakaszokon inkább LVA típusú Ca^{2+} -csatornák vesznek részt, azonban a két típus egymással együttműködve alakítja ki a Ca^{2+} -jeleket (Jaafari és Canepari, 2016). Kísérleteink alapján azt találtuk, hogy az R-, L-, és N-típusú Ca^{2+} -csatornák a proximális ($<50\text{ }\mu\text{m}$) és mediális ($50\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$) dendritikus szakaszokon befolyásolják szignifikánsan a kialakuló szignálokat, viszont a T-típusú ioncsatornák a dendrit teljes vizsgált szakaszán jelentősen hozzájárult a tranziensekhez. A cerebellum Golgi-sejtjeiben (Rudolph és mtsai., 2015) illetve a hippocampusz piramissetjeiben (Jaafari és Canepari, 2016) is kimutatták az egyes VGCC altípusainak hozzájárulását a régió specifikus bAP által indukált Ca^{2+} -beáramláshoz.

A szomatikusan kialakult akciós potenciálok dendritekbe való terjedését az ott elhelyezkedő feszültség-aktiválta ioncsatornák segítik elő (Stuart és Sakmann, 1994), amelyek számos funkció ellátásában játszanak szerepet, úgymint az idegsejtek *burst* típusú tüzelésének

kialakítása, a szinapszisok plaszticitásának befolyásolása amelyet a bAP-k által előidézett intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedés szabályoz, amelynek mértéke a különböző dendritikus ágakon illetve a sejttesttől mért távolsággal összefüggésben eltérő lehet, ezzel is potenciálisan hozzájárulva a szinaptikus plaszticitás változatosságához (Landau és mtsai., 2022). Kísérleteink során bemutattuk, hogy az emberi agykérgi L2/3 piramissejtek dendritjeibe visszaterjedő szomatikus AP által előidézett Ca^{2+} -tranziensek térbeli profilja, illetve a különböző ioncsatornák változó mértékű hozzájárulása a Ca^{2+} -beáramlásához összeegyeztethető korábbi modell állatokon végzett tanulmányok eredményeivel. A bAP által kialakított intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedés mértékének régió specifikus különbségei is potenciálisan hozzájárulhatnak a szinaptikus plaszticitás diverzitásához.

7. Összefoglalás

Életkorral összefüggő morfológiai és elektrofiziológiai különbségek emberi agykérgi piramissejteken

Az élettartam során a kognitív képességeink folyamatosan változnak, ennek alapja az egyedi idegsejtek illetve a mikrohálózatokban való kapcsoltságuk változása az különböző életszakaszok folyamán. Az idegrendszer fejlődése az intrauterin életsorán kezdődik és felnőttkorig egy elhúzódó és összetett érési programon megy keresztül, majd fokozatos öregedés veszi kezdetét (Bethlehem és mtsai., 2022). A korai fejlődés és az öregedés során bekövetkező elektrofiziológiai és morfológiai változásokat, amelyeken az idegsejtek keresztülmennek már valamelyest ismerjük, viszont főként állatkísérletek eredményeként. A modell állatok életkora pedig nehezen, vagy egyáltalán nem összeegyeztethető az emberi életkorral. Az emberi mintákon végzhető kísérletek korlátozottan elérhetőek, így az életkorral összefüggő változásokról még keveset tudunk. Kísérleteink során emberi agykérgi szupragranuláris piramissejteken végeztünk elektrofiziológiai elvezetéseket, illetve morfológiai vizsgálatokat, szinte az egész élettartamot lefedve.

Elektrofiziológiai elvezetéseink során bemutattuk, hogy az emberi agykérgi piramissejtek esetén az életkor függvényében mind a passzív, küszöb alatti mind az aktív, küszöb feletti elektrofiziológiai tulajdonságokban megfigyelhetőek különbségek az élettartam során. Az általunk vizsgált passzív intrinzik tulajdonságok, mint a nyugalmi membránpotenciál, a bemenő ellenállás és az időállandó esetén is a legjelentősebb változás a csecsemő és kisgyermekkor között látható, ezután szintén megfigyelhetőek különbségek a következő korcsoportok között azonban jóval kisebb mértékben. Az akcióspotenciál kinetikáját leíró paraméterek, mint a reobázis áram, AP-felfutás sebessége, és az AP amplitúdó esetén is az említett passzív paraméterekhez hasonló változásokat figyeltünk meg a korcsoportok között. Születés után az első életév során tapasztalhatóak a legdrasztikusabb változások, a csecsemőkor első, illetve a második feléve között jelentős különbségeket mutattunk be mind az aktív, mind a passzív intrinzik elektromos tulajdonságok esetében. A fejlődés során végbemenő változások fiatal felnőttkorig folytatódnak, majd a felnőttkor alatt ez a tendencia megváltozik és a fejlődéssel ellentétes irányúvá válik, majd időskorban a csecsemőkor második feléhez hasonló értékekhez tér vissza, ezzel egy U alakú tendencia figyelhető meg az élet során az általunk vizsgált küszöb

alatti, illetve AP tulajdonságaiban. A h-áram által kialakított sag aránya, továbbá az AP félszélessége azonban az életkor előrehaladtával egy folytonos, a sag esetében növekvő, az AP szélessége pedig csökkenő trendet követ. Adataink alapján a piramissejtek tüzelési mintázata viszont megőrződik az élet során.

A piramissejtek morfológiai elemzése során nem találtunk jelentős különbséget a vizsgált hét korcsoport dendrit arborizációjának kiterjedése, vagy annak komplexitása között. Ez a humán piramissejtek változatos morfológiájából is adódhat, illetve abból hogy a szupragranuláris piramissejtek viszonylag korán elérik érett formájukat. A serkentő szinapszisok alapjául szolgáló dendritikus tüskék nagyobb számban voltak jelen az általunk vizsgált csecsemő korcsoportba tartozó piramissejteken, időskori sejtekkel összehasonlítva. Vizsgálataink során nem pusztán a tüskék teljes mennyiségének visszaesését találtuk az életkorral összefüggésben, hanem tüskék altípus-specifikus eltérését is. A csecsemőkorú sejtek esetében nagyobb számban találtunk éretlen, vékony és filopódiális tüskéket, míg az idősödő sejtek esetében ezek kisebb számban voltak jelen, viszont az érettnak tekinthető gomba típusú dendrittüskék jóval nagyobb számban fordultak elő.

Eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy az életkor előrehaladását az elektrofiziológiai tulajdonságok folyamatos változása kíséri, amely során a legdrasztikusabb változások az első életévben illetve az öregedés során következnek be. A dendritikus fa morfológiája aránylag változatlan az általunk vizsgált korcsoportok között, ugyanakkor a dendritikus tüskék száma az életkorral csökken, valamint a tüskék altípus-specifikus eltolódását figyeltük meg a legfiatalabb és a legidősebb korú csoport sejtei között.

A visszaterjedő akciós potenciálok által kiváltott kalcium-tranziensek térbeli profilja humán agykérgi piramissejt dendritekben

Az idegsejtekben az axon iniciális szegmentumon kialakult akciós potenciál aktív visszaterjedése a dendritikus nyúlványokba az intracelluláris térbe fluoreszcens szenzorokkal közvetetten mérhető Ca^{2+} -beáramlást vált ki. A bAP-k hatására a Ca^{2+} -ionok koncentrációnövekedése nagyban hozzájárul a szinaptikus kapcsolatok erősségének modulációjához, főként az AP időzítés-függő plaszticitáson keresztül. A dendritek intracelluláris terébe áramló Ca^{2+} -ionok által okozott fluoreszcens fényintenzitás-változásának amplitúdója nem

azonos a teljes dendrit fa minden pontján, hanem a szómától mért távolság függvényében változhat, amely egy térbeli profillal jellemezhető. Ez a térbeli profil a nyúlványokon a sejttesttől távolodva sejt típusonként is eltérhet. A piramissejtek apikális dendritfáján végighaladó bAP által indukált Ca^{2+} -jelek térbeli eloszlását főként csak rágcsló modellekből ismerjük, viszont az emberi piramissejtek változatosabbak, dendritjeik komplexebbek, azok ioncsatorna-összetétele és regeneratív eseményei is különbségeket mutatnak a rágcsló modellekéhez képest.

Munkánk során a visszaterjedő akciós potenciálok által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket vizsgáltuk emberi agykérgi L2/3 piramissejtek apikális dendritjeiben, egy nagy affinitású Ca^{2+} -szenzor segítségével. Kísérleteinkben egyetlen szomatikusan kiváltott bAP hatására is képesek voltunk a kialakuló fluoreszcencia-változásokat detektálni még a disztális dendrit szakaszokon is. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója, a szómától távolodva a proximális dendritszakaszon emelkedik, a maximumát a sejttesttől $\sim 50\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$ -re éri el, majd disztális irányban tovább haladva a szignálok amplitúdója csökken, míg a távoli dendrit szakaszokon már nem detektálhatóak. Ez a nem lineáris térbeli profil erősebb stimuláció hatására is megmaradt, a tranziensek amplitúdójának közel 2,5-szeresére emelkedése mellett, 3 AP kiváltása során. A szómától mért távolsággal való összefüggés mellett azt találtuk, hogy a szómát elhagyó elsődleges dendriteken a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója jelentősen kisebb volt, mint a leágazó dendritikus szakaszokon.

Farmakológiai kísérleteinkben bemutattuk, hogy a feszültség-aktiválta Ca^{2+} -csatornák széleskörű blokkolása mellett is kialakulhat detektálható Ca^{2+} -influx az apikális dendriten. Tehát arra következtethetünk, hogy legnagyobb mértékben a VGCC-k járulnak hozzá az intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedéséhez, azonban nem kizárólag. Az N-, T-, R-, és L- típusú VGCC-ket tesztelve arra jutottunk, hogy az egyes VGCC-típusok különböző mértékben vesznek részt a Ca^{2+} -tranziensek kialakításában, ezen felül az egyes altípusok régió specifikusan a dendriten való távolsággal összefüggően is különböző mértékben járulnak hozzá a Ca^{2+} -beáramláshoz.

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a visszaterjedő akciós potenciál által kialakított Ca^{2+} -ion beáramlása a piramissejtek apikális dendritje mentén nem azonos, hanem egy nem-lineáris térbeli profilt követ. A sejtet elhagyó elsődleges dendriteken mért tranziensek amplitúdója különbséget mutat a leágazó dendritekhez képest, amely főként a sejttesthez közeli szakaszokon figyelhető meg, ahol az elsődleges dendritek átmérője jóval nagyobb, mint a leágazó dendriteké. A Ca^{2+} -influxot nem kizárólag a feszültség-aktiválta Ca^{2+} -csatornák alakítják

ki, továbbá az egyes VGCC típusok hozzájárulása régió-specifikus eltéréseket mutat. A visszaterjedő akciós potenciál ezen jellemzői hozzájárulhatnak a dendritikus jelfeldolgozás, illetve a szinaptikus plaszticitás régióspecifikus komplexitásához és változatosságához.

8. Summary

Age-related differences in morphophysiological properties of human cortical pyramidal cells

Over the lifespan, our cognitive abilities are constantly changing, driven by changes in the intrinsic characteristics of single neurons or the connectivity of individual neurons and their microcircuits over the course of different life stages. Neuronal cells begin to develop during intrauterine life and go through a protracted and intricate maturation phase until adulthood, followed by a gradual ageing process (Bethlehem et al., 2022). A certain extent of knowledge already exists on the electrical and morphological changes that neurons undergo during early development and aging, primarily as a result of studies conducted on animals. It is either impossible or very difficult to match the ages of model animals and humans. Human experiments are limited, so little is known about changes associated with aging so far. Therefore, my dissertation aimed to explore possible age-dependent electrophysiological and morphological differences in supragranular pyramidal cells. In our experiments, we have performed electrophysiological recordings and morphological analysis on human cortical supragranular pyramidal cells, covering almost the entire lifespan.

Our electrophysiological recordings demonstrate that during the course of the lifespan, differences in the passive, sub-threshold, and active, suprathreshold electrophysiological characteristics of human cortical pyramidal cells can be observed. The most significant difference occurs between infancy and early childhood for the passive intrinsic properties that we examined, such as resting membrane potential, input resistance, and time constant. After the early development, differences also appear between subsequent age groups, but to a much lesser extent. We found comparable differences across age groups for the parameters characterizing the kinetics of the action potential, such as rheobase current, AP up-stroke, and AP amplitude, as well as for the passive parameters previously described. The first year of life after birth showed the most dramatic alterations, with significant differences in both active and passive intrinsic electrical properties between the first and second halves of infancy. The sub-threshold and AP properties examined over the course of life show a U-shaped trend as a result of the steep developmental changes that continue steadily into young adulthood, then change during adulthood and become reversed, returning to values similar to those in the second half of infancy.

in late adulthood. On the other hand, the sag-ratio percentage and the AP half-width exhibit a consistent tendency that increases with age for sag and decreases for AP width. Moreover, our findings indicate that pyramidal cell firing patterns are conserved throughout life.

In the morphological analysis of pyramidal cells, we found no substantial differences in the extent or complexity of dendrite arborization across the seven age groups, which may be due to the relatively early maturation and the diverse morphology of human supragranular pyramidal cells. The dendritic spines underlying the stimulatory synapses were more abundant in infant pyramidal cells we studied compared to late adult cells. In our studies, we found not only a decrease in the overall abundance of spines with age, but also a subtype-specific variation of dendritic spines. In the infant cells, we found a higher number of immature, thin and filopodial spines, whereas in the elderly cells these were less prevalent, but the mushroom-type dendritic spines, which can be considered as mature, were much more abundant.

Our results therefore suggest that the progression of age is accompanied by a continuous change in electrophysiological properties, with the most drastic changes occurring in the first year of life and during the processes contrary to the development of neuronal ageing. The morphology of the dendritic tree is relatively stable between the age groups we studied, although the density of dendritic spines decreases with age and a subtype-specific shift of spines was detected between cells of the youngest and oldest age groups.

Spatial profile of calcium-transients evoked by backpropagating action potential in human cortical pyramidal dendrites

In neuronal cells, action potentials generated on the axon initial segment are able to actively propagate back to the dendritic arbors as backpropagating action potentials (bAP), producing calcium influx into the dendritic intracellular space, which can be detected by using fluorescent sensors. The elevated level of Ca^{2+} ion-concentration caused by bAPs plays an important role in modulating the strength of synaptic connections through spike-timing-dependent plasticity. Depending on the distance from the soma, the amplitude of the increase in fluorescence intensity generated by Ca^{2+} -influx into the dendrites varies at different points along the dendritic tree. The kinetics of the amplitude alterations across dendrites depending on the distance from the soma could vary between distinct cell types. The spatial distribution of bAP-

induced Ca^{2+} -signals along the apical dendritic tree of pyramidal cells is primarily known from rodent models, but human pyramidal cells are more diverse, have more complex dendritic arborization, their ion channel composition and regenerative events are different from those of rodent models. Thus, in my thesis, we sought to examine the amplitude distribution of Ca^{2+} -transients induced by the back-propagating action potential along the apical dendrite of human cortical L2/3 pyramidal cells.

We studied Ca^{2+} -transients induced by back-propagating action potentials in apical dendrites of human L2/3 cortical pyramidal cells using a high-affinity Ca^{2+} -sensor. In our experiments, we were able to detect the resulting fluorescence changes in distal dendritic sections in response to a single bAP. We found that the amplitude of Ca^{2+} -transients increases in the proximal dendrite segments, reaches the maximum at $\sim 50\text{-}100\ \mu\text{m}$ from the cell body, and then decreases in the distal direction until they are no longer detectable in the distant dendrite region. This non-linear spatial profile was maintained at higher stimulation levels, with a nearly 2.5-fold increase in the amplitude of transients induced by 3 action potentials. In addition to the correlation with distance from the soma, we found that the amplitude of Ca^{2+} -transients in primary dendrites was significantly lower than in oblique dendrites.

In our pharmacological experiments, we have shown that even with the extensive blockade of voltage-gated Ca^{2+} -channels, low amplitude fluorescent signals were detected on the proximal dendrites, which allows us to conclude that the voltage-gated Ca^{2+} -channels are the primary but not exclusive contributors to the increase in intracellular Ca^{2+} -levels. We found that N-, T-, R-, and L-type voltage-gated Ca^{2+} -channels are involved to various extents in Ca^{2+} -transient generation furthermore each subtype contributes to Ca^{2+} -influx in differing degrees in a region-specific manner, depending on the dendritic distance.

Our results indicate that the Ca^{2+} -ion influx induced by the backpropagating action potential along the apical dendrite of pyramidal cells does not follow a uniform but a non-linear spatial profile. The amplitude of the transients measured on the primary dendrites show differences compared to the oblique dendrites. The Ca^{2+} -influx is not exclusively formed by voltage-gated Ca^{2+} -channels, and the contribution of each Ca^{2+} -channel subtype shows region-specific differences. These characteristics of the backpropagating action potentials may help to explain the region-specific complexity and variety of dendritic signal processing and synaptic plasticity.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Tamás Gábornak, hogy lehetőséget biztosított számomra kutatócsoportjában. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Molnár Gábornak témavezetői hozzáállásáért, az évek során nyújtott segítségéért, illetve, hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Köszönettel tartozom a kutatócsoport korábbi és jelenlegi munkatársainak, akik részt vettek a disszertációm alapjául szolgáló kísérletek kivitelezésében: Dr. Oláh Gáspár, Dr. Ozsvár Attila, Dr. Rózsa Márton, Mihut Norbert, Lákovics Rajmund, Dr. Horváth-Furdan Szabina, Dr. Piszár Ildikó, Dr. Komlósi Gergely, Lovas Sándor, Sandle Joanna, Dr. Péterfi Zoltán, külön köszönettel tartozom Dr. Tóth Martinnak a doktori munkám során nyújtott segítségéért. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Barzó Pálnak, hogy biztosította az emberi agyszövet mintákat. Köszönöm Dr. Kocsis Ágnes Katalinnak és Tóth Évának a hisztológiai munkájuk, illetve Lehóczki Bettinának az anatómiai rekonstrukciók elkészítésében való segítségét. Ezen felül a labor további jelenlegi és korábbi munkatársának és az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék dolgozóinak köszönöm a barátságos légkört.

Szeretném megköszönni szüleimnek a nélkülözhetetlen támogatásukat tanulmányaim során, testvéreimnek és férjemnek, hogy mellettem álltak és segítették a munkámat.

10. Irodalomjegyzék

- Aller MI, Wisden W (2008) Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151:1154–1172.
- Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, Filho WJ, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513:532–541 s
- Beaulieu-Laroche L, Toloza EHS, van der Goes MS, Lafourcade M, Barnagian D, Williams ZM, Eskandar EN, Frosch MP, Cash SS, Harnett MT (2018) Enhanced Dendritic Compartmentalization in Human Cortical Neurons. *Cell* 175:643–651.e14
- Beck D, de Lange AM, Maximov II, Richard G, Andreassen OA, Nordvik JE, Westlye LT (2021) White matter microstructure across the adult lifespan: A mixed longitudinal and cross-sectional study using advanced diffusion models and brain-age prediction. *Neuroimage* 224:117441
- Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, Robles V, Yuste R, DeFelipe J (2013) Age-Based Comparison of Human Dendritic Spine Structure Using Complete Three-Dimensional Reconstructions. *Cereb Cortex* 23:1798–1810
- Berg J, Sorensen SA, Ting JT, Miller JA, Chartrand T, Buchin A, Bakken TE, Budzillo A, Dee N, Ding SL, Gouwens NW, Hodge RD, Kalmbach B, Lee C, Lee BR, Alfiler L, Baker K, Barkan E, Beller A, Berry K, Bertagnolli D, Bickley K, Bomben J, Braun T, Brouner K, Casper T, Chong P, Crichton K, Dalley R, de Frates R, Desta T, Lee SD, D'Orazi F, Dotson N, Egdorf T, Enstrom R, Farrell C, Feng D, Fong O, Furdan S, Galakhova AA, Gamlin C, Gary A, Glandon A, Goldy J, Gorham M, Goriounova NA, Gratiy S, Graybuck L, Gu H, Hadley K, Hansen N, Heistek TS, Henry AM, Heyer DB, Hill D, Hill C, Hupp M, Jarsky T, Kebede S, Keene L, Kim L, Kim MH, Kroll M, Latimer C, Levi BP, Link KE, Mallory M, Mann R, Marshall D, Maxwell M, McGraw M, McMillen D, Melief E, Mertens EJ, Mezei L, Mihut N, Mok S, Molnar G, Mukora A, Ng L, Ngo K, Nicovich PR, Nyhus J, Olah G, Oldre A, Omstead V, Ozsvar A, Park D, Peng H, Pham T, Pom CA, Potekhina L, Rajanbabu R, Ransford S, Reid D, Rimorin C, Ruiz A, Sandman D, Sulc J, Sunkin SM, Szafer A, Szemenyei V, Thomsen ER, Tieu M, Torkelson A, Trinh J, Tung H, Wakeman W, Waleboer F, Ward K, Wilbers R, Williams G, Yao Z, Yoon JG, Anastassiou C, Arkhipov A, Barzo P, Bernard A, Cobbs C, de Witt Hamer PC, Ellenbogen RG, Esposito L, Ferreira M, Gwinn RP, Hawrylycz MJ, Hof PR, Idema S, Jones AR, Keene CD, Ko AL, Murphy GJ, Ng L, Ojemann JG, Patel AP, Phillips JW, Silbergeld DL, Smith K, Tasic B, Yuste R, Segev I, de Kock CPJ, Mansvelder HD, Tamas G, Zeng H, Koch C, Lein ES. (2021) Human neocortical expansion involves glutamatergic neuron diversification. *Nature* 598:151–158
- Bethlehem RAI, Seidlitz J, White SR, Vogel JW, Anderson KM, Adamson C, Adler S, Alexopoulos GS, Anagnostou E, Areces-Gonzalez A, Astle DE, Auyeung B, Ayub M, Bae J, Ball G, Baron-Cohen S, Beare R, Bedford SA, Benegal V, Beyer F, Blangero J, Blesa Cábez M, Boardman JP, Borzage M, Bosch-Bayard JF, Bourke N, Calhoun VD,

Chakravarty MM, Chen C, Chertavian C, Chetelat G, Chong YS, Cole JH, Corvin A, Costantino M, Courchesne E, Crivello F, Cropley VL, Crosbie J, Crossley N, Delarue M, Delorme R, Desrivieres S, Devenyi GA, Di Biase MA, Dolan R, Donald KA, Donohoe G, Dunlop K, Edwards AD, Elison JT, Ellis CT, Elman JA, Eyer L, Fair DA, Feczko E, Fletcher PC, Fonagy P, Franz CE, Galan-Garcia L, Gholipour A, Giedd J, Gilmore JH, Glahn DC, Goodyer IM, Grant PE, Groenewold NA, Gunning FM, Gur RE, Gur RC, Hammill CF, Hansson O, Hedden T, Heinz A, Henson RN, Heuer K, Hoare J, Holla B, Holmes AJ, Holt R, Huang H, Im K, Ipser J, Jack CR Jr, Jackowski AP, Jia T, Johnson KA, Jones PB, Jones DT, Kahn RS, Karlsson H, Karlsson L, Kawashima R, Kelley EA, Kern S, Kim KW, Kitzbichler MG, Kremen WS, Lalonde F, Landeau B, Lee S, Lerch J, Lewis JD, Li J, Liao W, Liston C, Lombardo MV, Lv J, Lynch C, Mallard TT, Marcelis M, Markello RD, Mathias SR, Mazoyer B, McGuire P, Meaney MJ, Mechelli A, Medic N, Misic B, Morgan SE, Mothersill D, Nigg J, Ong MQW, Ortinau C, Ossenkoppele R, Ouyang M, Palaniyappan L, Paly L, Pan PM, Pantelis C, Park MM, Paus T, Pausova Z, Paz-Linares D, Pichet Binette A, Pierce K, Qian X, Qiu J, Qiu A, Raznahan A, Rittman T, Rodrigue A, Rollins CK, Romero-Garcia R, Ronan L, Rosenberg MD, Rowitch DH, Salum GA, Satterthwaite TD, Schaare HL, Schachar RJ, Schultz AP, Schumann G, Schöll M, Sharp D, Shinohara RT, Skoog I, Smyser CD, Sperling RA, Stein DJ, Stolicyn A, Suckling J, Sullivan G, Taki Y, Thyreau B, Toro R, Traut N, Tsvetanov KA, Turk-Browne NB, Tuulari JJ, Tzourio C, Vachon-Presseau É, Valdes-Sosa MJ, Valdes-Sosa PA, Valk SL, van Amelsvoort T, Vandekar SN, Vasung L, Victoria LW, Villeneuve S, Villringer A, Vértes PE, Wagstyl K, Wang YS, Warfield SK, Warrior V, Westman E, Westwater ML, Whalley HC, Witte AV, Yang N, Yeo B, Yun H, Zalesky A, Zar HJ, Zettergren A, Zhou JH, Ziauddeen H, Zugman A, Zuo XN; 3R-BRAIN; AIBL; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Alzheimer's Disease Repository Without Borders Investigators; CALM Team; Cam-CAN; CCNP; COBRE; cVEDA; ENIGMA Developmental Brain Age Working Group; Developing Human Connectome Project; FinnBrain; Harvard Aging Brain Study; IMAGEN; KNE96; Mayo Clinic Study of Aging; NSPN; POND; PREVENT-AD Research Group; VETSA; Bullmore ET, Alexander-Bloch AF. (2022) Brain charts for the human lifespan. *Nature* 604:525–533

Blömer LA, Giacalone E, Abbas F, Filipis L, Tegolo D, Migliore M, Canepari M (2024) Kinetics and functional consequences of BK channels activation by N-type Ca^{2+} channels in the dendrite of mouse neocortical layer-5 pyramidal neurons. *Front Cell Neurosci* 18

Bloodgood BL, Sabatini BL (2009) NMDA Receptor-Mediated Calcium Transients in Dendritic Spines. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684880>.

Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aeversmann BD, Baka J, Bordé S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Faragó N, Kocsis ÁK, Kovács B, Maltzer Z, McCorrison JM, Miller JA, Molnár G, Oláh G, Ozsvár A, Rózsa M, Shehata SI, Smith KA, Sunkin SM, Tran DN, Venepally P, Wall A, Puskás LG, Barzó P, Steemers FJ, Schork NJ, Scheuermann RH, Lasken RS, Lein ES, Tamás G. (2018) Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat Neurosci* 21:1185–1195

Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47–67.

- Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues.
- Brunner J, Szabadics J (2016) Analogue modulation of back-propagating action potentials enables dendritic hybrid signalling. *Nat Commun* 7:13033
- Canepari M, Ross WN (2024) Spatial and temporal aspects of neuronal calcium and sodium signals measured with low-affinity fluorescent indicators. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 476:39–48
- Chang Y-M (2005) Increased Action Potential Firing Rates of Layer 2/3 Pyramidal Cells in the Prefrontal Cortex are Significantly Related to Cognitive Performance in Aged Monkeys. *Cereb Cortex* 15:409–418
- Cho K-H, Jang JH, Jang H-J, Kim M-J, Yoon SH, Fukuda T, Tennigkeit F, Singer W, Rhie D-J (2010) Subtype-Specific Dendritic Ca²⁺ Dynamics of Inhibitory Interneurons in the Rat Visual Cortex. *J Neurophysiol* 104:840–853
- Cho K-H, Kim M-J, Yoon SH, Hahn SJ, Jo Y-H, Kim M-S, Rhie D-J (2006) Spatial profile of back-propagating action potential-evoked Ca²⁺ transients in basal dendrites. *Neuroreport* 17:131–134
- Christie BR, Eliot LS, Ito K, Miyakawa H, Johnston D (1995) Different Ca²⁺ channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca²⁺ influx. *J Neurophysiol* 73:2553–2557
- Connors BW (1994) Intrinsic neuronal physiology and the functions, dysfunctions and development of neocortex. *Prog Brain Res* 102:195–203.
- Coskren PJ, Luebke JI, Kabaso D, Wearne SL, Yadav A, Rumbell T, Hof PR, Weaver CM (2015) Functional consequences of age-related morphologic changes to pyramidal neurons of the rhesus monkey prefrontal cortex. *J Comput Neurosci* 38:263–283
- Craik FIM, Bialystok E (2006) Cognition through the lifespan: Mechanisms of change. *Trends Cogn Sci* 10:131–138.
- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563–607
- Doischer D, Aurel Hosp J, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, Vida I, Bartos M (2008) Postnatal Differentiation of Basket Cells from Slow to Fast Signaling Devices. *J Neurosci* 28:12956–12968
- Dumitriu D, Hao J, Hara Y, Kaufmann J, Janssen WGM, Lou W, Rapp PR, Morrison JH (2010) Selective Changes in Thin Spine Density and Morphology in Monkey Prefrontal Cortex Correlate with Aging-Related Cognitive Impairment. *J Neurosci* 30:7507–7515
- Elston GN, Fujita I (2014) Pyramidal cell development: Postnatal spinogenesis, dendritic growth,

- axon growth, and electrophysiology. *Front Neuroanat* 8:1–20.
- Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, Galfalvy H, Pavlidis P, Smyrniotopoulos P, Mann JJ, Sibille E (2005) Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol Psychiatry* 57:549–558
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25:533–535
- Etherington SJ, Williams SR (2011) Postnatal Development of Intrinsic and Synaptic Properties Transforms Signaling in the Layer 5 Excitatory Neural Network of the Visual Cortex. *J Neurosci* 31:9526–9537
- Eyal G, Mansvelder HD, de Kock CPJ, Segev I (2014) Dendrites Impact the Encoding Capabilities of the Axon. *J Neurosci* 34:8063–8071.
- Fan Y, Fricker D, Brager DH, Chen X, Lu H-C, Chitwood RA, Johnston D (2005) Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I_h . *Nat Neurosci* 8:1542–1551
- Fişek M, Häusser M (2020) Are Human Dendrites Different? *Trends Cogn Sci* 24:411–412
- Frick A, Magee J, Koester HJ, Migliore M, Johnston D (2003) Normalization of Ca^{2+} signals by small oblique dendrites of CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 23:3243–3250.
- Fuenzalida M, De Sevilla DF, Couve A, Buño W (2010) Role of AMPA and NMDA receptors and back-propagating action potentials in spike timing-dependent plasticity. *J Neurophysiol* 103:47–54.
- Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC (1973) Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol* 82:175–181
- Goldberg JH, Tamas G, Yuste R (2003) Ca^{2+} imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: I_a -type K^+ channels control action potential backpropagation. *J Physiol* 551:49–65.
- Goldstein SAN, Bockenhauer D, O’Kelly I, Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2:175–184
- Greenough WT, Volkmar FR (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol* 40:491–504
- Guet-McCreight A, Chameh HM, Mahallati S, Wishart M, Tripathy SJ, Valiante TA, Hay E (2023) Age-dependent increased sag amplitude in human pyramidal neurons dampens baseline cortical activity. *Cereb Cortex* 33:4360–4373
- Hanemaaijer NAK, Popovic MA, Wilders X, Grasman S, Arocas OP, Kole MHP (2020) Ca^{2+}

- entry through nav channels generates submillisecond axonal Ca^{2+} signaling. *Elife* 9:1–75.
- Holloway RL (1966) Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in rat visual cortex. *Brain Res* 2:393–396
- Horibe S, Tarusawa E, Komatsu Y, Yoshimura Y (2014) Ni^{2+} -sensitive T-type Ca^{2+} channel currents are regulated in parallel with synaptic and visual response plasticity in visual cortex. *Neurosci Res* 87:33–39
- Huguenard JR, Hamill OP, Prince DA (1988) Developmental changes in Na^{+} conductances in rat neocortical neurons: appearance of a slowly inactivating component. *J Neurophysiol* 59:778–795
- Huttenlocher PR (1979) Synaptic density in human frontal cortex — Developmental changes and effects of aging. *Brain Res* 163:195–205
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 387:167–178.
- Huttenlocher PR, de Courten C, Garey LJ, Van der Loos H (1982) Synaptogenesis in human visual cortex — evidence for synapse elimination during normal development. *Neurosci Lett* 33:247–252
- Jaafari N, Canepari M (2016) Functional coupling of diverse voltage-gated Ca^{2+} channels underlies high fidelity of fast dendritic Ca^{2+} signals during burst firing. *J Physiol* 594:967–983
- Jacobs B, Driscoll L, Schall M (1997) Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative golgi study. *J Comp Neurol* 386:661–680.
- Jaffe DB, Johnston D, Lasser-Ross N, Lisman JE, Miyakawa H, Ross WN (1992) The spread of Na^{+} spikes determines the pattern of dendritic Ca^{2+} entry into hippocampal neurons. *Nature* 357:244–246
- Kalmbach BE és mtsai. (2018) h-Channels Contribute to Divergent Intrinsic Membrane Properties of Supragranular Pyramidal Neurons in Human versus Mouse Cerebral Cortex. *Neuron* 100:1194-1208.e5
- Kang HJ és mtsai. (2011) Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478:483–489
- Kasper EM, Larkman AU, Lübke J, Blakemore C (1994) Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. II. Development of electrophysiological properties. *J Comp Neurol* 339:475–494
- Kastellakis G, Tasciotti S, Pandi I, Poirazi P (2023) The dendritic engram. *Front Behav Neurosci* 17:1–15

- Kelly AMC, Di Martino A, Uddin LQ, Shehzad Z, Gee DG, Reiss PT, Margulies DS, Castellanos FX, Milham MP (2009) Development of anterior cingulate functional connectivity from late childhood to early adulthood. *Cereb Cortex* 19:640–657.
- Koenderink MJT, Uylings HBM (1995) Postnatal maturation of layer V pyramidal neurons in the human prefrontal cortex. A quantitative Golgi analysis. *Brain Res* 678:233–243
- Kroon T, van Hugte E, van Linge L, Mansvelder HD, Meredith RM (2019) Early postnatal development of pyramidal neurons across layers of the mouse medial prefrontal cortex. *Sci Rep* 9:5037
- Kuzawa CW, Chugani HT, Grossman LI, Lipovich L, Muzik O, Hof PR, Wildman DE, Sherwood CC, Leonard WR, Lange N (2014) Metabolic costs and evolutionary implications of human brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13010–13015.
- Landau AT, Park P, Wong-Campos JD, Tian H, Cohen AE, Sabatini BL (2022) Dendritic branch structure compartmentalizes voltage-dependent calcium influx in cortical layer 2/3 pyramidal cells. *Elife* 11:1–23.
- Larkum ME, Waters J, Sakmann B, Helmchen F (2007) Dendritic Spikes in Apical Dendrites of Neocortical Layer 2/3 Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 27:8999–9008
- Lemon N, Turner RW (2000) Conditional Spike Backpropagation Generates Burst Discharge in a Sensory Neuron. *J Neurophysiol* 84:1519–1530
- Linaro D, Vermaercke B, Iwata R, Ramaswamy A, Libé-Philippot B, Boubakar L, Davis BA, Wierda K, Davie K, Poovathingal S, Penttilä P-A, Bilheu A, De Bruyne L, Gall D, Conzelmann K-K, Bonin V, Vanderhaeghen P (2019) Xenotransplanted Human Cortical Neurons Reveal Species-Specific Development and Functional Integration into Mouse Visual Circuits. *Neuron* 104:972-986.e6
- Lorincz A, Nusser Z (2010) Molecular Identity of Dendritic Voltage-Gated Sodium Channels. *Science* (80-) 328:906–909
- Luebke JI, Chang Y-M (2007) Effects of aging on the electrophysiological properties of layer 5 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* 150:556–562
- Luebke JI, Medalla M, Amatrudo JM, Weaver CM, Crimins JL, Hunt B, Hof PR, Peters A (2015) Age-Related Changes to Layer 3 Pyramidal Cells in the Rhesus Monkey Visual Cortex. *Cereb Cortex* 25:1454–1468
- Luhmann HJ, Reiprich RA, Hanganu I, Kilb W (2000) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex: Intrinsic membrane properties, sodium and calcium currents. *J Neurosci Res* 62:574–584.
- Luna B, Marek S, Larsen B, Tervo-Clemmens B, Chahal R (2015) An Integrative Model of the Maturation of Cognitive Control. *Annu Rev Neurosci* 38:151–170.

- Mainen ZF, Sejnowski TJ (1996) Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382:363–366
- Markram H, Helm PJ, Sakmann B (1995) Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 485:1–20
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086–1092
- Mavroudis IA, Manani MG, Petrides F, Dados D, Ciobica A, Padurariu M, Petsoglou K, Njau SN, Costa VG, Baloyannis SJ (2015) Original article Age-related dendritic and spinal alterations of pyramidal cells of the human visual cortex. *Folia Neuropathol* 2:100–110
- McAllister AK (2000) Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex* 10:963–973.
- McCormick DA, Prince DA (1987) Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J Physiol* 393:743–762
- Molineux ML, Fernandez FR, Mehaffey WH, Turner RW (2005) A-Type and T-Type Currents Interact to Produce a Novel Spike Latency-Voltage Relationship in Cerebellar Stellate Cells. *J Neurosci* 25:10863–10873
- Molnár Z, Luhmann HJ, Kanold PO (2020) Transient cortical circuits match spontaneous and sensory-driven activity during development. *Science* (80-) 370:eabb2153
- Moore TL, Medalla M, Ibañez S, Wimmer K, Mojica CA, Killiany RJ, Moss MB, Luebke JI, Rosene DL (2023) Neuronal properties of pyramidal cells in lateral prefrontal cortex of the aging rhesus monkey brain are associated with performance deficits on spatial working memory but not executive function. *GeroScience* 45:1317–1342
- Mrzljak L, Uylings HBM, Van Eden GG, Judáš M (1991) Chapter 9 Neuronal development in human prefrontal cortex in prenatal and postnatal stages. In: *Progress in Brain Research*, pp 185–222
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JDB, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell Type and Pathway Dependence of Synaptic AMPA Receptor Number and Variability in the Hippocampus. *Neuron* 21:545–559
- Oláh G, Lákóvics R, Shapira S, Leibner J, Szűcs A, Barzó P, Molnár G, Segev I, Tamas G (2024) Accelerated signal propagation speed in human neocortical microcircuits. *Elife* 13.
- olde Scheper T V., Meredith RM, Mansvelder HD, van Pelt J, van Ooyen A (2018) Dynamic Hebbian Cross-Correlation Learning Resolves the Spike Timing Dependent Plasticity Conundrum. *Front Comput Neurosci* 11:1–18.
- Oswald A-MM, Reyes AD (2011) Development of Inhibitory Timescales in Auditory Cortex.

- Perez-García P, Pardillo-Díaz R, Geribaldi-Doldán N, Gómez-Oliva R, Domínguez-García S, Castro C, Nunez-Abades P, Carrascal L (2021) Refinement of Active and Passive Membrane Properties of Layer V Pyramidal Neurons in Rat Primary Motor Cortex During Postnatal Development. *Front Mol Neurosci* 14:1–14
- Petanjek Z, Judas M, Kostovic I, Uylings HBM (2008) Lifespan Alterations of Basal Dendritic Trees of Pyramidal Neurons in the Human Prefrontal Cortex: A Layer-Specific Pattern. *Cereb Cortex* 18:915–929
- Petanjek Z, Judaš M, Šimić G, Rašin MR, Uylings HBM, Rakic P, Kostović I (2011) Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13281–13286.
- Petanjek Z, Sedmak D, Džaja D, Hladnik A, Rašin MR, Jovanov-Milosevic N (2019) The protracted maturation of associative layer IIIC pyramidal neurons in the human prefrontal cortex during childhood: A major role in cognitive development and selective alteration in autism. *Front Psychiatry* 10:1–33.
- Peters R (2006) Ageing and the brain. *Postgrad Med J* 82:84–88.
- Picken Bahrey HL, Moody WJ (2003) Early Development of Voltage-Gated Ion Currents and Firing Properties in Neurons of the Mouse Cerebral Cortex. *J Neurophysiol* 89:1761–1773
- Plotkin JL, Shen W, Rafalovich I, Sebel LE, Day M, Savio Chan C, James Surmeier D (2013) Regulation of dendritic calcium release in striatal spiny projection neurons. *J Neurophysiol* 110:2325–2336.
- Popescu IR, Le KQ, Ducote AL, Li JE, Leland AE, Mostany R (2021) Increased intrinsic excitability and decreased synaptic inhibition in aged somatosensory cortex pyramidal neurons. *Neurobiol Aging* 98:88–98
- Rakic P (2009) Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10:724–735
- Ramón y Cajal S (1891) Sobre la existencia de bifurcaciones y colaterales en los nervios sensitivos craneales y sustancia blanca del cerebro.
- Ramón y Cajal S (1899) Comparative Study of the Sensory Areas of the Human Cortex.
- Ramón y Cajal S (1904) Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados.
- Ramón y Cajal S (1909) Histologie du système nerveux de l’homme & des vertébrés. Paris: Maloine.
- Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL (2008) Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence

Microscopy Images Sabatini B, szerk. PLoS One 3:e1997

Rudolph S, Hull C, Regehr WG (2015) Active dendrites and differential distribution of calcium channels enable functional compartmentalization of golgi cells. *J Neurosci* 35:15492–15504.

Stiles J, Jernigan TL (2010) The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev* 20:327–348

Stuart GJ, Sakmann B (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69–72

Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW (1997) In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385:161–165

Svoboda K, Helmchen F, Denk W, Tank DW (1999) Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo. *Nat Neurosci* 2:65–73

Testa-Silva G, Verhoog MB, Goriounova NA, Loebel A, Hjorth JJJ, Baayen JC, de Kock CPJ, Mansvelder HD (2010) Human synapses show a wide temporal window for spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 2:1–11.

van Blooij D, van den Boom MA, van der Aar JF, Huiskamp GM, Castegnaro G, Demuru M, Zweiphenning WJEM, van Eijnden P, Miller KJ, Leijten FSS, Hermes D (2023) Developmental trajectory of transmission speed in the human brain. *Nat Neurosci* 26:537–541

van Elburg RAJ, van Ooyen A (2010) Impact of Dendritic Size and Dendritic Topology on Burst Firing in Pyramidal Cells Graham LJ, szerk. *PLoS Comput Biol* 6:e1000781

Vardalaki D, Chung K, Harnett MT (2022) Filopodia are a structural substrate for silent synapses in adult neocortex. *Nature* 612:323–327.

Vetter P, Roth a, Häusser M (2001) Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol* 85:926–937

Wang M, Gamo NJ, Yang Y, Jin LE, Wang X-J, Laubach M, Mazer JA, Lee D, Arnsten AFT (2011) Neuronal basis of age-related working memory decline. *Nature* 476:210–213

Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer J a, McCormick D a, Arnsten AFT (2007) Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129:397–410

Waters J, Helmchen F (2004) Boosting of Action Potential Backpropagation by Neocortical Network Activity In Vivo. *J Neurosci* 24:11127–11136

Waters J, Larkum M, Sakmann B, Helmchen F (2003) Supralinear Ca²⁺ Influx into Dendritic Tufts of Layer 2/3 Neocortical Pyramidal Neurons In Vitro and In Vivo. *J Neurosci*

23:8558–8567

Winfield DA, Gatter KC, Powell TPS (1980) An electron microscopic study of the types and proportions of neurons in the cortex of the motor and visual areas of the cat and rat. *Brain* 103:245–258.

Yeatman JD, Wandell BA, Mezer AA (2014) Lifespan maturation and degeneration of human brain white matter. *Nat Commun* 5.

Yoshimura Y, Dantzker JLM, Callaway EM (2005) Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* 433:868–873.

Zhang Z (2004) Maturation of Layer V Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: Intrinsic Properties and Synaptic Function. *J Neurophysiol* 91:1171–1182

Zhu JJ (2000) Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca²⁺ action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol* 526:571–587