

### **Válasz Dr. Alpár Alán bírálatára**

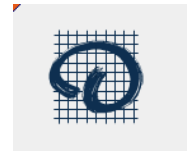
Tisztelt Professor Úr!

Nagyon köszönöm a dolgozatomra adott észrevételeit és nagyon pozitív értékelését. Az alábbiakban igyekeztem a felmerült kérdésekre válaszolni és egyben rávilágítani azokra a részletekre, amelyeket jelenleg nem, vagy nem kellő mélységben ismerünk.

*A szerző bemutatja, honnan származnak egérben a mikroglia sejtek. Honnan származnak emberben a mikroglia? Miért fordulnak elő eltérő számban mikroglia sejtek a különböző agyi területeken? Kolonizációs kérdés ez, vagy későbbi változás? Megfigyelhető-e ennek kapcsán az agyi területek különböző sérülékenysége/reaktivitása sérülésben?*

**Válasz:** A mikroglia sejtek eredetére vonatkozólag egerekben a legmegbízhatóbb adatok az ún. „sors térképezés” (fate mapping) kutatásokból származnak. Ezek során a mikroglia sejtek kialakulásához szükséges gének kifejeződésétől függő riporter fehérjék segítségével nyomon követhető az egyedfejlődés során a sejtek vándorlása, illetve követhetők a hiányukkal járó defektusok adott gének deléciója esetén. Mivel az egér és a humán mikroglia sejtek fejlődéséhez szükséges gének között nagymértékű átfedés van, immunhisztokémiai jelölés (például az Iba1 vagy a P2Y12R markerek kimutatása) illetve a modern egysejt szekvenálási módszerek segítségével vizsgálhatók a mikroglia sejtek fejlődéstanai tulajdonságai és fenotípusa humán agyszövetben is<sup>1, 2</sup>. Egerekben a mikroglia sejtek az extraembrionális szikzacskó c-Myb<sup>+</sup> erythromyeloid progenitoraiból származnak, amelyek ott az embrionális (E) 7.5 naptól kimutathatók, majd a mikroglia sejtek előalakjai az E9.5 naptól kolonizálják a fejlődő központi idegrendszert. Fejlődésükhöz számos transzkripció faktor és szignalizációs útvonal szükséges, mint a c-Myb, Pu.1, vagy a CSF1 receptor (CSF1R)<sup>3-5</sup>. Az emberi szövetekkel végzett vizsgálatok számos mikroglia marker alapján valószínűsítik, hogy a humán mikroglia előalakjai az egér sejtekhez hasonlóan a primitív hematopoiesis helyén, a szikzacskóban keletkeznek, függetlenül az embrionális májban, majd a csontvelőben zajló hematopoiesistől, és onnan a 4. - 5. gesztációs héttől kezdve, több hullámban vándorolnak be a fejlődő központi idegrendszer területére. Ismert, hogy a sejtek az idegrendszer fejlődésével párhuzamosan több elkülöníthető stádiumon mennek át, mielőtt elérik a felnőtt agyban látható fenotípust<sup>1, 2, 6-8</sup>. Humán embriók egysejt szekvenálással történő vizsgálata a közelmúltban feltárta, hogy a központi idegrendszert kolonizáló mikroglia az egér modellekhez hasonlóan zömmel a szikzacskó eredetű primitív makrofág populációk első, korai hullámából eredeztethető<sup>9</sup>.

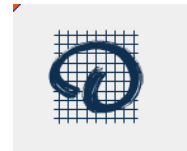
A mikroglia sejtek eltérő lokalizációját és mennyiségét a felnőtt agyban számos tényező szabályozza, ezek egy része jelenleg feltáratlan. Ismert, hogy a mikroglia sejtek esetén a mikrokörnyezet komoly hatással bír a sejtek molekuláris (transzkriptom és proteom szintű) „ujjlenyomatára”, amely a felnőtt agyszövetben is jellemző az adott agyterületre és az ott domináns idegsejtpopulációk neurokémiai



fenotípusára is<sup>10</sup>. Kutatásaink és egyéb vizsgálatok azt mutatják, hogy a mikroglia sejtek más sejtekkel kialakított kapcsolatai nagymértékben meghatározzák a mikroglia morfológiai tulajdonságait és a mikroglialis kommunikációban fontos szerepet játszó fehérjék (pl. P2Y12R) hatással vannak a mikroglia szöveti lokalizációjára és számának változásaira is. Ezért feltételezhető, hogy a mikroglia regionális eloszlását mind fejlődéstani hatások, mind a folyamatosan változó mikrokörnyezet is szabályozza, amelyre ráépülnek az életkorral és különböző neurológiai állapotokkal járó hatások is. Érdekes módon, a mikroglia eloszlása, mennyisége és transzkripció fenotípusuk nem csupán nagy változásokat mutatnak agyterületenként, de ezek meglepően konzerváltak az emlősök 200 millió éves evolúciója során, amely jelenleg nem kellően értett, konzervált regulációs mechanizmusok meglétére utal<sup>11, 12</sup>. Az elérhető adatok szerint a mikroglia regionális heterogenitása vélhetően közreműködik az adott agyterületek eltérő sérülékenységében, és kiemelten fontos lehet adott neurokémiai fenotípust mutató idegsejtek érzékenységében is különböző neurotoxikus hatásokra. Jó példa lehet erre, hogy miközben a mikroglia hiánya számos agyterületen fokozza a neuronális hiperaktivitást különböző egér modellekben, a mikroglia körülbelül 50%-os szelektív depléciója dopaminerg neuronok IL-34 termelésének szelektív gátlásával (az IL-34 a mikroglia túléléséhez szükséges CSF1R ligandja a CSF1 mellett) elégséges hiperaktivitás és rohamok kialakulásához D1 agonista, kainsav, vagy picrotoxin beadás után<sup>13-16</sup>. Elképzelhető tehát, hogy a dopaminerg idegsejtek fokozott érzékenysége neurotoxikus folyamatokra a mikroglialis protektív (vagy káros) hatások változásaival is magyarázható Parkinson-kór, illetve egyéb neurológiai betegségek esetén. Ezért is kiemelten fontos a mikroglia-idegsejt kommunikáció mélyebb megértése mind fiziológiás, mind patológiás állapotok során.

*A rendszerszintű gyulladás káros, általánosan súlyosbító hatása idegrendszeri sérülésben (így agyi infarctusban) különösen fontos, egyszersmind aggasztó megfigyelés. Mit tudunk a nosocomialis infekciók hatásáról infarctus után? Történt-e erre irányuló kísérlet, klinikai megfigyelés, molekuláris szintű vizsgálat/elemzés, hosszútávú követés (longitudinal study)?*

Válasz: A kérdés egy megoldatlan, de rendkívül fontos problémakört érint. Régóta ismert, hogy az iszkémiás és vérzéses stroke, valamint más akut agyi inzultusok, mint az traumás agysérülés vagy a szubarachnoideális vérzés nagymértékű immunszuppressziót okoznak betegekben és kísérleti állatmodellekben egyaránt<sup>17-19</sup>. A jelenség hátterében feltételezhetően komplex neuro-immun mechanizmusok állnak, beleértve a vegetatív idegrendszer aktiválódása következtében kialakuló adrenerg / noradrenerg hatásokat, a HPA tengely aktiválódás miatti kortizol (rágcsálókban kortikoszteron) felszabadulás celluláris hatásait, valamint egyéb immunológiai tényezők szerepét, mint a keringésben megjelenő DNS hatásait az inflammaszómák-mediálta proinflammatorikus interleukin-1 termelésére és az ezzel kapcsolt sejthalálra (piroptózis) immunsejtekben, illetve a B limfociták diszfunkciójának eredményeképp lecsökkent IgM termelés szisztémás hatásait<sup>20-23</sup>. Az akut stroke-ot elszenvedő betegekben ezért órákon-napokon belül kimutatható a bél traktus és a bőrfelület mikrobióta megváltozása, valamint csökkent válaszreakció különféle mikroorganizmusok elleni gyulladásos válasz kialakulásában. Ez experimentális modellekben is jól követhető. Az akut agyi sérüléseket követően kialakuló nosocomialis fertőzések - mint a kórházi környezetben szerzett fertőzések egy speciális típusa - nem csupán rendkívül gyakoriak, különösképpen a nagy kiterjedésű stroke-ot elszenvedő betegeknél, de primer elhalálási oknak is tekinthetők az akut inzultust túlélő, intenzív terápiával kezelt betegek esetén. Jelenleg több klinikai vizsgálat is van folyamatban amelyek

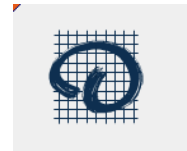


az immunosuppresszív hatások felfüggesztését célozzák, miközben a preventív antibiotikum terápia alkalmazása nem hozott egyértelmű javulást<sup>18, 19, 24-28</sup>.

Az akut agyi inzultusokat követő fertőzések mechanizmusainak megértését nagymértékben bonyolítja, hogy a stroke kialakulásának hátterében gyakran kimutatható akut gyulladásos esemény, vagy fertőzés közvetlenül az akut inzultust megelőzően. Kísérletes modellekben a stroke-ot megelőző infekciók egyértelműen rontják a kimenetelt, megnövelik az agyi lézió, a vér-agy-gát sérülés mértékét, és a neurológiai diszfunkciót, amelyek proinflammatorikus útvonalak gátlásával részben visszafordíthatók (ilyen például az interleukin 1 hatásainak gátlása)<sup>29, 30</sup>. Sajnos a klinikumban rendkívül nehéz megmondani, hogy az érintett betegek esetén fennállt-e infekció a stroke-ot megelőzően is, vagy a kialakult immunosuppresszív állapot okozta másodlagos fertőzésről van szó, amely esetben a legyengült szisztémás immunválasz elősegítette az opportunistá patogének terjedését. Klinikai vizsgálatok ugyanakkor megmutatták, hogy az inzultust megelőző fertőzések is növelik a stroke gyakoriságát és súlyosságát is, bár e hatások valós mértéke a fentiek miatt nehezen vizsgálható<sup>31, 32</sup>. Összességében elmondható, hogy a fertőzések fokozhatják a stroke kialakulási gyakoriságát és a neurológiai diszfunkció mértékét, miközben a szerzett, nosocomiális fertőzések komoly kockázati tényezőt jelentenek a betegek túlélését és gyógyulását illetően. A fertőzések és akut agyi inzultusok összefüggéseinek pontos mechanizmusait a közeljövőben fel kell tárni, amely várhatóan új diagnosztikus és terápiás lehetőségek forrása lehet.

*A CX3CR1 KO egér megteremtí a lehetőséget, hogy a microglia dysfunctiot a szerző szelektíven vizsgálja. Legtöbb esetben full KO állatban alternatív kompenzatoros folyamatok lépnek fel, melyek a funkciót, ha csökkent szinten is, betölteni képesek. Nem zavarta a kísérletet itt ez a jelenség?*

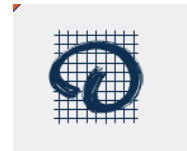
Válasz: Egyetértve a felvetéssel, a KO modellekben általában, így a mikroglialis működést célzó transzgenikus állatokban is számos kompenzációs folyamat zavarhatja a kapott kísérleti eredmények értelmezését. Saját vizsgálataink például azt mutatták, hogy az interleukin-1 receptor teljes deléciója nincs hatással a kísérletes stroke okozta agyi sérülés mértékére, miközben a kondicionális (neuronális) deléció neuroprotektív, hasonlóképpen a szisztémás IL-1 $\alpha\beta$  KO fenotípus hatásához<sup>33</sup>. A CX3CR1 KO modell az első, igazán jól használható mikroglialis fenotípus vizsgálatot lehetővé tévő egérmodell volt, és a kapott eredményeket azóta számos egyéb modellben is validálták. Ilyen például a CX3CR1 farmakológiai gátlása, a fractalkine (CX3CR1 ligand) deléciója, illetve különböző kondicionális KO modellek<sup>34-36</sup>. Előnyt jelent, hogy a CX3CR1 a perifériás monociták egy populációja mellett dominánsan a szikzacskó eredetű, hosszú életű makrofág populációkon fejeződik ki, mint a mikroglia, a májban található Kupffer sejtek egy része és a bélben található makrofágok. Ezért a CX3CR1 KO egerekben adott neurológiai kondíciók modellezése esetén jól lehet következtetni a mikroglialis hatásokra. A precíz megoldás ugyanakkor az indukálható, kondicionális KO modellektől várható. Miközben a központi idegrendszerben a mikroglia 100%-a CX3CR1 pozitív, az ún. határvonalakban található, „border associated” makrofágok (meningeális makrofágok, perivaszkuláris makrofágok, és a choroid plexus makrofágok egy része) alacsonyabb szinten, de kifejezik ezt a receptort<sup>5, 37, 38</sup>. A közelmúltban elérhetővé váltak olyan, kutatócsoportunkban is használt kondicionális egér modellek, ahol a Cre rekombinááz enzim két domainjének kifejeződése a CX3CR1-pozitív sejtekben igényli mikroglia-specifikus (Sall1) vagy határvonal makrofágok által kifejezett (Lyve1) promoterek működését is (ún. split-cre egerek)<sup>39</sup>. Ez a modell remélhetőleg képes lesz pontosabb választ adni a mikroglia specifikus hatásokra az alkalmazott experimentális modellekben.



A komplex genetikus modellekben ugyanakkor a rekombináció hatékonysága gyakran nem megfelelő. Számos olyan vizsgálatunk is van folyamatban, illetve került publikálásra, ahol a CX3CR1 tamoxifen-indukálható Cre (Cre<sup>ERT2</sup>) modelleket<sup>40, 41</sup> használtuk mikroglialis gének kiütésére. Itt a perifériás, CX3CR1-pozitív sejtpopulációk gyors turnover miatt a tamoxifen indukciót követően 2-3 héttel a perifériás monocita és makrofág populációk zöme már (újra) vad típusú, miközben a hosszú életű, önfenntartó mikroglia kifejezi az adott transzgént, vagy delécióit. Kiemelten fontos feladat, hogy új, mikroglia specifikus kondicionális KO modellek segítségével a jövőben validálni lehessen a mikroglialis hatásoknak tulajdonított eredményeket. Mivel minden genetikus- vagy farmakológias intervenció hatása komplex és specificitásuk az adott experimentális modellekben nagyon eltérő lehet, tapasztalataink szerint megbízható következtetéseket csak többféle, komplementer módszer együttes alkalmazásától lehet remélni.

*Bizonyították-e a szerzők az adott kísérletben, hogy a mikroglia-neuron kapcsolatban a Kv2.1 és Kv2.2 csatorna clusterok helyén az ADP ligand forrása a neuronális ATP, vagy itt irodalmi adatokra támaszkodnak? Lehetséges-e más ligand szerepe a folyamatban? Milyen klinikai beavatkozási lehetőséget lát a szerző ezen a ponton?*

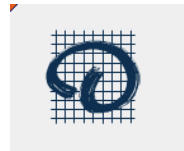
**Válasz:** *In vivo* modellekben vagy agyszeletekben egyelőre nem megoldott az ATP (ADP) felszabadulás pontos forrásának azonosítása a mikroglia-neuron szomatikus junkciók területén. Eredményeink ugyanakkor megmutatták, hogy a szomatikus eredetű ATP neuronális sejt kultúrákban is kimutatható, és igényli az L típusú kalciumcsatornák, valamint a VNUT vezikuláris nukleotid transzporter működését, miközben nagyrészt független a szinaptikus vezikulák felszabadulását szabályozó kalciumcsatornák működésétől<sup>15</sup>. Számos olyan, jelenleg közlés alatt álló kísérletet is végeztünk, amelyek az ATP felszabadulás helyét, celluláris forrásait, valamint szubcelluláris- és molekuláris szintű szabályozását vizsgálták. Ennek fontos részét képezik az új GRAB-ATP szenzorokkal<sup>42</sup> végzett vizsgálatok, amelyekkel az ATP nanomolos mennyiségének szelektív, extracelluláris kimutatása lehetséges. Ezek a kísérletek megerősítették, hogy glutamát, vagy 5-30mM kálium klorid hatására a neuronális sejtest területén indukálható az ATP felszabadulás, és ezt a mikroglia nyúlványok érzékelné is képesek. Nagymértékben növeli ugyanakkor az ATP felszabadulás szabályozásának komplexitását az új megfigyelés, hogy az asztrocita sejtek az egészséges agyban is 1-100 nanomolos ATP „hullámokat” generálnak az extracelluláris térben, amelyek adataink és más kutatócsoportok vizsgálatai szerint komoly hatással bírnak mind a neuronális, mind a mikroglialis folyamatokra. A különböző sejtekből felszabaduló extracelluláris ATP gyorsan bomlik ADP-vé és további purin metabolitokká (AMP, adenzin), és ebben az NTPDase enzimeknek kiemelt szerepe van. Ezért jelenleg számos farmakológiai vizsgálatot végzünk a neuronális ATP felszabadulás vagy degradáció molekuláris mechanizmusainak azonosítása érdekében, különös tekintettel arra, milyen hatással bír ez a mikroglia sejtek működésére. E vizsgálatok során *in vivo* egérmodelleket, akut agyszeleteket, organotipikus szeleteket és neuronális sejt kultúrákat is használunk. Folyamatban van szelektív, neuronális VNUT gátlást megvalósító konstruktorok tesztelése is, amelyek segítségével várhatóan sikerül majd a neuronális eredetű ATP szerepét is jobban megérteni a mikroglia-neuron interakciók során.



*A szerző munkáiban kitér a mikroglia vírusfertőzésben betöltött szerepére, valamint arra, hogy a COVID-19 fertőzéssel kapcsolatban is tett vizsgálatokat. Amennyiben megosztható, milyen eredményeket/perspektívát tud bemutatni ebben az irányban?*

Válasz: A COVID-19 világjárvány kezdeti stádiumában már nyilvánvaló volt, hogy a fertőzés számos neurológiai tünettől jár és ezek hátterében gyulladáshoz vezető mechanizmusok szerepe valószínűsíthető. Feltételeztük azt is, hogy a mikroglia, mint rendkívül érzékeny celluláris szenzor és mint rezidens immunsejt központi szerepet játszhat a COVID-19-el összefüggő gyulladáshoz és neuropathológiai folyamatokban. Ennek tanulmányozására kidolgoztunk olyan mintavételi eljárást, amely lehetővé teszi fagyasztott és fixált post mortem tükröbbszövetek gyűjtését számos agyterületről és perifériás szervekből is. Ez lehetőséget ad molekuláris anatómiai, fehérje- és mRNS-szintű adatok integrálására, és arra is, hogy a centrális és perifériás gyulladáshoz vezető folyamatok összefüggéseit megvizsgálhassuk. Megfigyeltük, hogy COVID-19 következtében elhunyt betegekben a mikroglia nagymértékű fenotípus változásokat mutat számos agyterületen, legnagyobb mértékben a medulla és a hipotalamus vegetatív nucleusainak területén. Ennek egyik központi eleme a mikroglialis P2Y<sub>12</sub> receptor fokális downregulációja. Feltártuk, hogy a betegenként és agyterületenként ugyancsak rendkívül heterogén mikroglialis pathológia a gyulladt, vírus-antigén pozitív erek mentén alakul ki leggyakrabban, miközben a mikroglia fagocitotikus aktivitást, és gyakran vírusantigén-pozitivitást is mutat. Nagyfelbontású mikroszkópia, egycsejt RNS szekvenálás és gyulladáshoz, valamint metabolikus markerek vizsgálata feltárta, hogy a mikroglialis diszfunkció együtt jár mind centrális, mind centrális proinflammatorikus reakcióval, amely IL-6 és IL-1 termelődését, az IL-1 termelődésében kulcsszerepet játszó ún. Nod-like receptorok expresszióját és vaszkuláris gyulladást von maga után. Ezekben a súlyosan érintett területeken a mikroglia, asztroglia és endothel sejtek metabolikus zavart mutatnak és a mikroglia-ér valamint mikroglia-asztrocita interakciókban szerepet játszó molekuláris kaskádok is nagymértékben érintettek. Ezen felül, megfigyeltük a glutamaterg szinapszisok degenerációját, valamint szinapszisok és mielin mikroglialis fagocitózisát a mikroglia diszfunkciót és vaszkuláris gyulladást mutató agyterületeken. Kutatásaink tehát az jelzik, hogy a SARS-CoV-2-indukálta centrális és szisztémás gyulladás elsősorban gliovaszkuláris elégtelenséghez vezet az agyban, amely közös eleme lehet a különféle COVID-19-el együtt járó neuropathológiai elváltozásoknak mind a betegség akut szakaszában, mind a gyakori poszt-COVID tünetek kialakulásában. Vizsgálataink funkcionális jelentőségét az adja, hogy korábbi kutatásaink kimutatták a P2Y<sub>12R</sub> kulcsszerepét az agyi vírusfertőzések elleni védelemben, az idegsejtek pathológiás aktivitásának gátlásában és az agyi keringés mikroglia-mediálta szabályozásában. Támogatja megfigyeléseinket, hogy a rendkívül heterogén neurológiai tünetek mellett a rohamok és a keringési zavarok is rendkívül gyakoriak COVID-19 betegekben<sup>13, 15, 16, 43-51</sup>. Humán TSPO-PET vizsgálatokból ismert az is, hogy a mikroglialis fenotípus változások fertőzés, gyulladás, cerebrális iszkémia vagy más akut inzultust követően hónapokig, évekig is fennállnak adott neurológiai kórképek esetén. Érdekes módon, a közelmúltban végzett TSPO-PET vizsgálatok eredményei szerint a COVID-19 betegekben az akut szimptomatikus fázt követően is sokáig kimutatható az agyi gyulladás és ez jól korrelál a depresszív szimptomák és kognitív zavarok kialakulásával<sup>50</sup>. Eredményeink jelenleg közlés alatt állnak, a cikk preprint verzióját nyilvános szerveren elérhetővé tettük (doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.546214>).

Dr. Adam Denes  
Laboratory of Neuroimmunology  
Institute of Experimental Medicine  
1083 Budapest, Szigony u. 43 Hungary

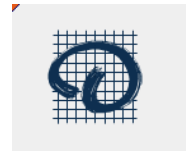


Még egyszer szeretném megköszönni Professzor Úrnak dolgozatom gondos bírálatát és támogatását az MTA doktora cím elnyerésére.

Budapest, 2023. 12. 03.

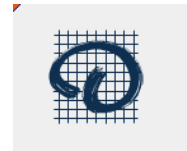
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AD' followed by a flourish.

Dr. Dénes Ádám



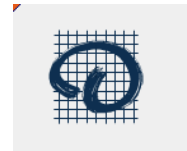
## Referenciák:

1. Menassa DA, Gomez-Nicola D. Microglial dynamics during human brain development. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1014
2. Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of anatomy*. 2010;217:436-448
3. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Larbi A, Ng LG, Chan JK, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. C-myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity*. 2015;42:665-678
4. Kierdorf K, Masuda T, Jordao MJC, Prinz M. Macrophages at CNS interfaces: Ontogeny and function in health and disease. *Nature reviews. Neuroscience*. 2019;20:547-562
5. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330:841-845
6. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505:327-334
7. Janossy G, Bofill M, Poulter LW, Rawlings E, Burford GD, Navarrete C, Ziegler A, Kelemen E. Separate ontogeny of two macrophage-like accessory cell populations in the human fetus. *J Immunol*. 1986;136:4354-4361
8. Askew K, Gomez-Nicola D. A story of birth and death: Insights into the formation and dynamics of the microglial population. *Brain, behavior, and immunity*. 2018;69:9-17
9. Bian Z, Gong Y, Huang T, Lee CZW, Bian L, Bai Z, Shi H, Zeng Y, Liu C, He J, Zhou J, Li X, Li Z, Ni Y, Ma C, Cui L, Zhang R, Chan JKY, Ng LG, Lan Y, Ginhoux F, Liu B. Deciphering human macrophage development at single-cell resolution. *Nature*. 2020;582:571-576
10. Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, McColl BW. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature neuroscience*. 2016;19:504-516
11. Dos Santos SE, Medeiros M, Porfirio J, Tavares W, Pessoa L, Grinberg L, Leite REP, Ferretti-Rebustini REL, Suemoto CK, Filho WJ, Noctor SC, Sherwood CC, Kaas JH, Manger PR, Herculano-Houzel S. Similar microglial cell densities across brain structures and mammalian species: Implications for brain tissue function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2020;40:4622-4643
12. Tan YL, Yuan Y, Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular psychiatry*. 2020;25:351-367
13. Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, Chen X, Nair A, Ikegami A, Hwang P, Chan AT, Graves SM, Uweru JO, Ledderose C, Kutlu MG, Wheeler MA, Kahan A, Ishikawa M, Wang YC, Loh YE, Jiang JX, Surmeier DJ, Robson SC, Junger WG, Sebra R, Calipari ES, Kenny PJ, Eyo UB, Colonna M, Quintana FJ, Wake H, Gradinaru V, Schaefer A. Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*. 2020;586:417-423
14. Cserep C, Posfai B, Denes A. Shaping neuronal fate: Functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions. *Neuron*. 2021;109:222-240
15. Cserep C, Posfai B, Lenart N, Fekete R, Laszlo ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnar G, Heindl S, Schwarcz AD, Ujvari K, Kornyei Z, Toth K, Szabadits E, Sperlagh B, Baranyi M, Csiba L, Hortobagyi T, Magloczky Z, Martinecz B, Szabo G, Erdelyi F, Szipocs R, Tamkun MM, Gesierich B, Duering M, Katona I, Liesz A, Tamas G, Denes A. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science*. 2020;367:528-537

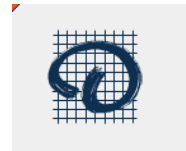


16. Merlini M, Rafalski VA, Ma K, Kim KY, Bushong EA, Rios Coronado PE, Yan Z, Mendiola AS, Sozmen EG, Ryu JK, Haberl MG, Madany M, Sampson DN, Petersen MA, Bardehle S, Tognatta R, Dean T, Jr., Acevedo RM, Cabriga B, Thomas R, Coughlin SR, Ellisman MH, Palop JJ, Akassoglou K. Microglial g(i)-dependent dynamics regulate brain network hyperexcitability. *Nature neuroscience*. 2021;24:19-23
17. Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM. Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24:708-723
18. Miller EC, Elkind MS. Infection and stroke: An update on recent progress. *Current neurology and neuroscience reports*. 2016;16:2
19. Faura J, Bustamante A, Miro-Mur F, Montaner J. Stroke-induced immunosuppression: Implications for the prevention and prediction of post-stroke infections. *Journal of neuroinflammation*. 2021;18:127
20. Roth S, Cao J, Singh V, Tiedt S, Hundeshagen G, Li T, Boehme JD, Chauhan D, Zhu J, Ricci A, Gorka O, Asare Y, Yang J, Lopez MS, Rehberg M, Bruder D, Zhang S, Gross O, Dichgans M, Hornung V, Liesz A. Post-injury immunosuppression and secondary infections are caused by an aim2 inflammasome-driven signaling cascade. *Immunity*. 2021;54:648-659 e648
21. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke t helper cell type 1-like immunostimulation. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198:725-736
22. McCulloch L, Smith CJ, McColl BW. Adrenergic-mediated loss of splenic marginal zone b cells contributes to infection susceptibility after stroke. *Nature communications*. 2017;8:15051
23. Hoadley ME, Galea J, Singh N, Hulme S, Ajao DO, Rothwell N, King A, Tyrrell P, Hopkins SJ. The role of cortisol in immunosuppression in subarachnoid haemorrhage. *European journal of medical research*. 2023;28:303
24. Stanley D, Moore RJ, Wong CHY. An insight into intestinal mucosal microbiota disruption after stroke. *Sci Rep-Uk*. 2018;8:568
25. Chang Y, Woo HG, Jeong JH, Kim GH, Park KD, Song TJ. Microbiota dysbiosis and functional outcome in acute ischemic stroke patients. *Sci Rep-Uk*. 2021;11:10977
26. Houlden A, Goldrick M, Brough D, Vizi ES, Lenart N, Martinecz B, Roberts IS, Denes A. Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. *Brain, behavior, and immunity*. 2016;57:10-20
27. Raoofi S, Pashazadeh Kan F, Rafiei S, Hosseinipalangi Z, Noorani Mejareh Z, Khani S, Abdollahi B, Seyghalani Talab F, Sanaei M, Zarabi F, Dolati Y, Ahmadi N, Raoofi N, Sarhadi Y, Masoumi M, Sadat Hosseini B, Vali N, Gholamali N, Asadi S, Ahmadi S, Ahmadi B, Beiramy Chomalu Z, Asadollahi E, Rajabi M, Gharagozloo D, Nejatifar Z, Soheylirad R, Jalali S, Aghajani F, Navidriahy M, Deylami S, Nasiri M, Zareei M, Golmohammadi Z, Shabani H, Torabi F, Shabaninejad H, Nemati A, Amerzadeh M, Aryankhesal A, Ghashghaee A. Global prevalence of nosocomial infection: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2023;18:e0274248
28. Westendorp WF, Dames C, Nederkoorn PJ, Meisel A. Immunodepression, infections, and functional outcome in ischemic stroke. *Stroke*. 2022;53:1438-1448
29. Denes A, Pradillo JM, Drake C, Sharp A, Warn P, Murray KN, Rohit B, Dockrell DH, Chamberlain J, Casbolt H, Francis S, Martinecz B, Nieswandt B, Rothwell NJ, Allan SM. *Streptococcus pneumoniae* worsens cerebral ischemia via interleukin 1 and platelet glycoprotein I $\alpha$ . *Annals of neurology*. 2014;75:670-683
30. Muhammad S, Haasbach E, Kotchourko M, Strigli A, Krenz A, Ridder DA, Vogel AB, Marti HH, Al-Abed Y, Planz O, Schwaninger M. Influenza virus infection aggravates stroke outcome. *Stroke*. 2011;42:783-791





31. Elkind MS, Ramakrishnan P, Moon YP, Boden-Albala B, Liu KM, Spitalnik SL, Rundek T, Sacco RL, Paik MC. Infectious burden and risk of stroke: The northern manhattan study. *Archives of neurology*. 2010;67:33-38
32. Elkind MSV, Boehme AK, Smith CJ, Meisel A, Buckwalter MS. Infection as a stroke risk factor and determinant of outcome after stroke. *Stroke*. 2020;51:3156-3168
33. Wong R, Lenart N, Hill L, Toms L, Coutts G, Martinecz B, Csaszar E, Nyiri G, Papaemmanouil A, Waisman A, Muller W, Schwaninger M, Rothwell N, Francis S, Pinteaux E, Denes A, Allan SM. Interleukin-1 mediates ischaemic brain injury via distinct actions on endothelial cells and cholinergic neurons. *Brain, behavior, and immunity*. 2019;76:126-138
34. Pawelec P, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T. The impact of the cx3cl1/cx3cr1 axis in neurological disorders. *Cells*. 2020;9
35. Luo P, Chu SF, Zhang Z, Xia CY, Chen NH. Fractalkine/cx3cr1 is involved in the cross-talk between neuron and glia in neurological diseases. *Brain research bulletin*. 2019;146:12-21
36. Subbarayan MS, Joly-Amado A, Bickford PC, Nash KR. Cx3cl1/cx3cr1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics*. 2022;231:107989
37. Goldman T, Wieghofer P, Jordao MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature immunology*. 2016;17:797-805
38. Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the cns in steady state and disease. *Nature neuroscience*. 2017;20:136-144
39. Kim JS, Kolesnikov M, Peled-Hajaj S, Scheyltjens I, Xia Y, Trzebanski S, Haimon Z, Shemer A, Lubart A, Van Hove H, Chappell-Maor L, Boura-Halfon S, Movahedi K, Blinder P, Jung S. A binary cre transgenic approach dissects microglia and cns border-associated macrophages. *Immunity*. 2021;54:176-190 e177
40. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013;155:1596-1609
41. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Williams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38:79-91
42. Wu Z, He K, Chen Y, Li H, Pan S, Li B, Liu T, Xi F, Deng F, Wang H, Du J, Jing M, Li Y. A sensitive grab sensor for detecting extracellular atp in vitro and in vivo. *Neuron*. 2022;110:770-782 e775
43. Bisht K, Okojie KA, Sharma K, Lentferink DH, Sun YY, Chen HR, Uweru JO, Amancherla S, Calcuttawala Z, Campos-Salazar AB, Corliss B, Jabbour L, Benderoth J, Friestad B, Mills WA, 3rd, Isakson BE, Tremblay ME, Kuan CY, Eyo UB. Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through panx1-p2ry12 coupling in mice. *Nature communications*. 2021;12:5289
44. Csaszar E, Lenart N, Cserep C, Kornyei Z, Fekete R, Posfai B, Balazsfi D, Hangya B, Schwarcz AD, Szabadits E, Szollosi D, Szigeti K, Mathe D, West BL, Sviatko K, Bras AR, Mariani JC, Kliewer A, Lenkei Z, Hricisak L, Benyo Z, Baranyi M, Sperlagh B, Menyhart A, Farkas E, Denes A. Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. *The Journal of experimental medicine*. 2022;219
45. Cserep C, Posfai B, Denes A. Shaping neuronal fate: Functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions. *Neuron*. 2020
46. Fekete R, Cserep C, Lenart N, Toth K, Orsolits B, Martinecz B, Mehes E, Szabo B, Nemeth V, Gonci B, Sperlagh B, Boldogkoi Z, Kittel A, Baranyi M, Ferenczi S, Kovacs K, Szalay G, Rozsa B,



- Webb C, Kovacs GG, Hortobagyi T, West BL, Kornyei Z, Denes A. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via p2y12 signalling and recruit monocytes through p2y12-independent mechanisms. *Acta neuropathologica*. 2018;136:461-482
47. Mo P, Xing Y, Xiao Y, Deng L, Zhao Q, Wang H, Xiong Y, Cheng Z, Gao S, Liang K, Luo M, Chen T, Song S, Ma Z, Chen X, Zheng R, Cao Q, Wang F, Zhang Y. Clinical characteristics of refractory covid-19 pneumonia in wuhan, china. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020
48. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe covid-19. *Science*. 2020;368:473-474
49. Qin Y, Wu J, Chen T, Li J, Zhang G, Wu D, Zhou Y, Zheng N, Cai A, Ning Q, Manyande A, Xu F, Wang J, Zhu W. Long-term microstructure and cerebral blood flow changes in patients recovered from covid-19 without neurological manifestations. *The Journal of clinical investigation*. 2021;131
50. Braga J, Lepra M, Kish SJ, Rusjan PM, Nasser Z, Verhoeff N, Vasdev N, Bagby M, Boileau I, Husain MI, Kolla N, Garcia A, Chao T, Mizrahi R, Faiz K, Vieira EL, Meyer JH. Neuroinflammation after covid-19 with persistent depressive and cognitive symptoms. *JAMA psychiatry*. 2023;80:787-795
51. Kubota T, Gajera PK, Kuroda N. Meta-analysis of eeg findings in patients with covid-19. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2021;115:107682