

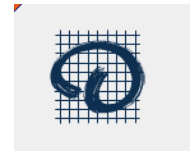
Válasz Dr. Deli Mária bírálataira

Tisztelt Professzor Asszony!

Hálásan köszönöm dolgozatom gondos bírálatát, pozitív értékelését és különösképpen építő kritikai észrevételeit, kérdéseit. Nagyra értékelem, hogy a dolgozatban szereplő széleskörű metodikai repertoár alkalmazását Professzor Asszony pozitív tényezőként értékelte: számomra nem kis fejtörést okozott, hogy az eleve határterületnek számító neuroimmunológia területén milyen módon lehet szakmailag korrekt, de mégis közérthető módon bemutatni a vizsgált, rendkívül komplex folyamatok mechanizmusainak azonosításához szükséges molekuláris biológiai, molekuláris anatómiai technikáktól a neuronhálózatok- és agyi keringés képzővizsgálatáig ívelő módszertant. Azért külön elnézést kérek, ha a gondos átnézés ellenére maradt a dolgozatban elütés és a referenciaszerkesztő (EndNote) program hibái közül néhány számomra feltáratlan maradt. A dolgozat alapjául szolgáló cikkeket az olvashatóság megkönnyítése végett az adott fejezetek elején és a dolgozat végén is listába szedtem, de valóban szerencsésebb lett volna, ha a 435 oldal terjedelmű mellékletben megadott cikkek kivonatainak helye a tartalomjegyzékben is egyenként feltüntetésre kerül. Ennek fényében utólag is külön köszönöm a sok türelmet és a részlet gazdag bírálatot. Az alábbiakban megpróbálom a feltett kérdésekre, megjegyzésekre megfelelő válaszokat adni, azzal a fenntartással, hogy a Bíráló kérdései által érintett mechanizmusok részben jelenleg feltáratlanok.

1. A jelölt csoportjával leírta a mikroglia sejtek és az agyi hajszálerek közti kapcsolat finomszerkezeti és molekuláris részleteit (Császár és mtsai, 2022). A közelmúltban egy szisztémás gyulladással modellben a perivaszkuláris mikroglia sejtekben a kladin-5 sejtkapcsoló fehérje kifejeződését mutatták ki (Haruwaka és mtsai 2019, <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13812-z>). Ebben a modellben a kladin-5 fehérje segítette a mikroglia sejtek kapcsolódását az agyi endotélsejtekhez abluminálisan és a vér-agy gát szorosságának fenntartását. Elképzelhető-e a perivaszkuláris mikroglia sejtekben a kladin-5 vagy más kladin (pl. kladin-25) hasonló szerepe élettani körülmények között?

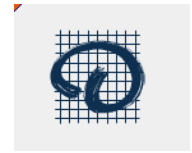
Válasz: A felvetés, hogy a mikroglia sejtek szisztémás gyulladás során endotheliális barrier funkcióért felelős fehérjéket fejezhetnek ki és ennek révén részt vehetnek a vér-agy-gát funkciók szabályozásában, rendkívül érdekes. Mivel a hivatkozott publikációban a kladin-5 fehérjét célzó funkcionális vizsgálatot (pl. mikroglia-specifikus kladin-5 kondicionális KO egérmodell felhasználásával) a szerzők nem végeztek, a levont következtetések értelmezésénél zömmel az elvégzett immunfluoreszcens- és elektronmikroszkópiás vizsgálatokra tudtam támaszkodni. Ezek alapján nem látok meggyőző bizonyítékot arra, hogy az alkalmazott modellekben a mikroglia sejtek a gyulladt erek mentén kifejezik a kladin-5 fehérjét és hogy ez szerepet játszhat a mikroglia-vér-agy-gát interakciók során. A cikkben leírtak ellenére nem látok egyértelmű kolokalizációt a mikroglia és a kladin-5 fehérje között (pl. Supplementary Figure 7a és 7c ábrák), és a szerzők nem alkalmaztak szuperrezolúciós mikroszkópiát vagy immunogold jelölést elektronmikroszkópiával kombinálva, hogy meggyőzően mutassák a mikroglialis kladin-5 expresszió meglétét. Ezeket az eljárásokat



kutatócsoportunkban esszenciálisnak tartjuk sejt-sejt interakciókban involvált fehérjék pontos lokalizációjának kimutatására, és fontos az antitest specifikus kötődéséről is kontroll kísérletek (KO egér szövet, antitest neutralizáció, jelölési kontrollok, stb) révén megbizonyosodni¹⁻³. A cikk elektronmikroszkópiás képeivel kapcsolatban azt a megjegyzést tenném, hogy a gyulladt / sejthalált mutató agyszövetben a DAB „ragadós” és gyakran kirajzolja a fagocitált sejtörmelékét, amely aspecifikus jelölést eredményezhet immunhisztokémiai reakciók során. Gyulladás során a mikroglia intenzíven fagocitál, és ez alól az esetlegesen degenerálódó endothel sejtek sem képeznek kivételt. Mivel a cikk átesett külső bírálaton, a fenti kritikai észrevételt kellő óvatossággal tettem. Kutatócsoportunk vizsgálja a cikkben bemutatott modellhez hasonló, ismételt, perifériás LPS beadással kiváltott szisztémás gyulladás során a mikroglia-endotheliális interakciókat (publikálatlan adatok). Ezekben a kísérletekben a mikroglia-ér asszociációk megnövekedése látható, ugyanakkor a mikroglia sejtest az esetek túlnyomó többségében a gliális basalis lamina parenchymalis oldalán marad, még akkor is, ha a szinte „ráfekszik” az erekre, nyúlványai ugyanakkor direkt kontaktusba lépnek az endothel sejtekkel is. Miközben a klaudin-5 mikroglialis expresszióját kutatásaink során nem vizsgálatuk, a mikroglia funkcionális szerepe a vaszkuláris gyulladás fenntartásában, a leukocita transzmigráció szabályozásában és a vérkeringés modulálásában igazolható. További vizsgálatok szükségesek az endothelium-mikroglia interakciók pontos mechanizmusainak feltérképezésére és véleményem szerint a mikroglialis klaudin-5 szerepének azonosítása a fenti folyamatokban mindenképpen igényli egy mikroglia-specifikus kondicionális klaudin-5 KO modell használatát is.

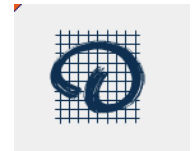
2. A szakirodalom alapján a mikroglia sejtek elősegítik a vér-agy gátérését (10. oldal, Hattori 2023, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.09.006>), ebben milyen mikroglia faktorok vehetnek részt? Kétirányú kapcsolatot feltételezve, milyen hatása lehet az agyi mikrovaszkuláris endotélsejteknek a mikroglia sejtekérésére és működésére, és melyek lehetnek a legfontosabb mediátorai ennek a kommunikációnak?

Válasz: A mikroglia-endothel sejt interakciók vélhetően az egyedfejlődés nagyon korai stádiumában kialakulhatnak. A mikroglia előalakok a primitív szikzacskói makrofágokból származnak, amelyek egérben az embrionális fejlődés (E) 9-9.5-ik napján, emberben több hullámban a 4.5-ik gesztációs héttől kolonizálják a fejlődő központi idegrendszert⁴⁻⁸. Érdekes módon, a korai erythromieloid progenitorok, amelyek a szikzacskóban az E7 időszakban találhatóak, nemcsak a mikroglia sejtek, de az endothel sejtek egy populációjának előalakjai is, amelyek képesek a későbbi fejlődési stádiumokban toborzódni az agyi vaszkulaturába⁹. Mindenesetre, a mikroglia-ér interakciók a központi idegrendszerben már az E9.5 naptól dokumentálhatóak és élethosszon át fennmaradnak. Az elérhető bizonyítékok szerint a mikroglia szabályozza az angiogenezist és ebben számos, párhuzamos mechanizmus is részt vehet, eltérésekkel a különböző agyterületek esetén. A PU.1 KO és CSF1 KO egerekben nem található mikroglia sejtek, és ezzel párhuzamosan, csökkent vaszkuláris komplexitás is tapasztalható¹⁰. Ugyanakkor, miközben a mikroglia depléciója újszülött patkányok retinájában csökkent vaszkuláris denzitást eredményez¹¹, a CX3CR1-pozitív mikroglia és agyi makrofágok aktivitás változása az interferon α/β receptor (IFNAR) depléciója révén fokozza az angiogenezist a retinában¹². Számos mediátorról ismert, hogy szerepet játszhat az angiogenezis szabályozásában, ilyenek a több tanulmányban is vizsgált VEGF és IGF-1. Számos további mediátor és molekuláris mechanizmus szerepe is felmerült az élethosszon át tartó mikroglia-endothelium interakciók közvetítésében, többek között a vizsgálataink során azonosított P2Y12R, valamint a PANX1 csatornák, a TGF β 1, a



CXCL1/CX3CR1, a CXCR4/CXCL12, az IL-34/CSF1R, vagy a CCL5/CCR5 szerepe is^{1, 13-17}. E mechanizmusok szerepet játszhatnak az angiogenezis, az endotheliális gyulladás, endotheliális apoptózis és vaszkuláris “remodelling” (itt nem találtam pontos magyar kifejezést) szabályozásában. Konkrétan a vér-agy-gát funkciókra gyakorolt mikroglialis hatások tekintetében az irodalmi adatok hiányosak és sok közöttük az ellentmondás. A mikroglia depléció fiatal egerekben nem okoz észlelhető permeabilitás változást és az NVU sejtekben (asztroglia, periciták, sima izom sejtek, stb) sem alakul ki nagyobb mértékű morfológiai változás, de az asztrocita GFAP szintek emelkedése megfigyelhető, miközben idős állatokban a CSF1R gátló PLX5622 hatására kialakuló mikroglia depléció már enyhe vér-agy-gát sérüléshez vezet¹⁸⁻²⁰. Transzkraniális ultrahang segítségével indukált cerebrovaszkuláris sérülés esetén a mikroglia (és a mikroglialis P2Y12R) protektívnek bizonyult a vér-agy-gát sérülésre (ellentétben az infiltrálódó monociták káros szerepével), miközben egy gyulladásos demielinizációs modellben a CSF1R gátlás csökkentette a barrier funkciók károsodását^{21, 22}. A mikroglia-endothelium interakciókról fellelhető irodalmi adatokat egy nemzetközi konzorcium szakértőivel épp a közelmúltban tekintettük át (a közlemény hamarosan elérhető lesz), és a mikroglia-mediálta vaszkuláris és neuronális hatásokról cerebrális iszkémia során összefoglaló tanulmányt is közzeltünk, amelyekben számos további mechanizmust érintettünk²³.

A mikrovaszkuláris endothel sejtek mikrogliaira gyakorolt hatásai ugyancsak szerteágazóak, de az irodalmi adatok itt is hiányosak és kevés az érdemi funkcionális vizsgálat. Ismert ugyanakkor, hogy a vaszkuláris fejlődés zavara az idegrendszerben mikroglialis kolonizációs defektusokhoz is vezet, például *Ncx1*^{-/-} ((Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 KO) egerek esetén⁷. Jelenleg a mikroglialis kolonizációt szabályozó faktorok, mint a CXCL12, a CSF-1, vagy az IL-34 pontos celluláris forrása nem tisztázott. Ismert ugyanakkor, hogy a mikroglia állapotát alapvetően meghatározó CX3CL1 (fractalkine) az endothel sejteken is kifejeződik neuronok mellett és CX3CR1 receptoron keresztül szabályozza a mikroglia aktivitását, proliferációját, vagy fagocitotikus folyamatait. Kutatásaink alapján valószínűleg fontos az aktivitás- és sérülés-függő endotheliális ATP termelés szerepe is a mikroglialis fenotípusok szabályozásában a P2Y12 receptoron keresztül. Különböző vaszkuláris stimulusok esetén, mint a hiperkapnia és a hipoxia, az endothel sejtek, asztrociták és a mikroglia különböző purin mediátorokat termel, amelynek fontos szerepe lehet a kompartment-specifikus celluláris válaszok szabályozásában különböző fiziológiás és patológiás állapotokban^{1, 24, 25}. *In vitro* vizsgálatok azt mutatják, hogy az endotheliális mediátorok hatása (pl. oxigén-glükóz megvonás esetén) a mikroglialis fagocitózis vagy migráció folyamataira eltérő lehet az asztrocita eredetű mediátorok hatásaitól²⁶, miközben felmerült az endotheliális mikrovezikulák szerepe is a mikroglia polarizáció és autofágia folyamataiban²⁷. Vizsgálataink kimutatták az endotheliális IL-1R1 és mikroglialis IL-1 α és IL-1 β szerepét is a mikroglia-endothelium interakciókban, cerebrális iszkémia és szubkrónikus szisztémás gyulladás során (²⁸ és publikálatlan adatok), de itt sem sikerült még a kulcsfontosságú endotheliális mediátorokat azonosítani. Hasonlóképpen, a szisztémás gyulladás során az endotheliális Toll-like receptor 4 (TLR4) depléciója csökkenti a mikroglia aktivitás változásait a retinában²⁹, de nem ismert, hogy milyen gyulladásos mediátorokon keresztül. Ezért nagy igény lenne endothelium-specifikus intervenciók felhasználásával a mikroglia fiziológiás vagy patológiás folyamataiban szerepet játszó mediátorok azonosítására.

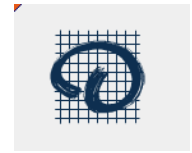


3. *Figyelembe véve a mikroglia sejtek bonyolult, térben és időben is változó központi szabályozó szerepét neuroinflammációban, mennyire tekinthető a P2Y12 receptor lehetséges gyógyszer támadáspontnak gyulladással járó idegrendszeri betegségekből?*

4. *A P2Y12 receptor nagy mennyiségben található a vérlemezkéken, és szerepe van a vérlemezke aktiválódást követő véralvadásban, ezen felül pedig kifejeződik megakarioblasztokon, vaszkuláris simaizom sejteken, és leukocitákon is. A klinikailag alkalmazott P2Y12 receptorgátló gyógyszerek, mint az irreverzibilis inhibitor klopidozrel vagy az alloszterikus gátlószer tikagrelor gyakori mellékhatása a vérzéses szövődmények megnövekedése. Várhatóak-e ilyen, vagy más szövődmények centrális hatású P2Y12 receptor gátlószer alkalmazásában?*

Válasz: Köszönöm ezt a két releváns kérdést – mivel az érintett témakör rendkívül komplex és állandóan felmerül kutatásaink kapcsán, az alábbiakban megpróbálom ezekre együttesen válaszolni a jelenleg ismert adatok birtokában. A P2Y12R az egészséges agyban mikroglia specifikus expressziót mutat^{1-3, 30}. Kutatásaink és mások vizsgálatai is igazolták, hogy a P2Y12R hiánya, vagy mikroglialis expressziójának nagymértékű csökkenése – amely számos neurológiai betegségben és agyi gyulladásos állapotban megtörténik – komoly kóros tényező lehet. A P2Y12R mediált hatások közül a neuronális excitabilitás mikroglialis kontrollja, a vér-agy-gát funkciók védelme, az agyi vérkeringés szabályozása és a mikroglialis fagocitózis szabályozása mindenképpen fontos, terápiásan targetálható folyamatok lehetnek^{1-3, 30-34}. Kutatócsoportunk a közelmúltban bizonyítékot talált arra is, hogy a COVID-19 során a mikroglialis P2Y12R nagymértékű csökkenést mutat számos agyterületen, amely szerepet játszhat az akut neurológiai tünetek és a poszt-COVID szindrómák kialakulásában is (részletesebben erről a Bíráló 7. kérdésére adott válaszban írok). Nem világos ugyanakkor, hogy milyen módon érhető el a P2Y12R által közvetített folyamatok terápiás modulálása az egyes neurológiai kórképek esetén az alapvető betegségmechanizmusok ismerete nélkül.

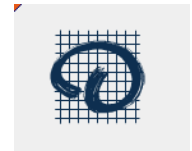
A P2Y12R szelektív gátlására számos klinikumban használt gyógyszer elérhető, amelyek a vérlemezkék ADP-indukálta aggregációját célozzák (Clopidogrel, Cangrelor, Ticagrelor, stb). Miközben ezek a gyógyszerek első sorban a vér-agy-gáttal nem védett, perifériás szervekben és a keringésben gátolják a P2Y12R-t, ennek hatása a mikroglialis P2Y12R működésére hagyományos klinikai alkalmazás során nem egyértelmű. Vizsgálatainkban a mikroglia-specifikus P2Y12R gátlását PSB0739 cisterna magna-ba történő beadásával érjük el, amely több órán keresztül (4-24 óra), nagymértékű változásokat okoz a mikroglia-neuron és mikroglia-vaszkuláris interakciók terén – ezt a megváltozott neuronális kalcium válaszok, mikroglia morfológia- és kontaktomikai változások, a neurovaszkuláris csatolás modulálása, valamint az agyi keringés mikroglia-függő változásai is megerősítik^{1, 2, 35}. Iszkémiás stroke, vagy neuronális hiperexcitabilitás során az akut P2Y12R gátlás nagymértékben fokozza a patológiai hálózati aktivitást és megnövekedett infarktus méretet, rosszabb neurológiai kimenetelt eredményez^{2, 23, 35}. Ezekben a vizsgálatokban a centrális P2Y12R gátlás esetén nem tapasztaltunk egyértelmű vérzéses komplikációt. Miközben vizsgálataink rámutatnak a mikroglia fontos szerepére a stroke pathofiziológiájában, ezek a kísérletek azt is sugallják, hogy a centrális P2Y12R gátlás akut agyi sérülés esetén kifejezetten káros lehet. Vélhetően nem lenne szerencsés a P2Y12R centrális gátlása neurotróp vírusfertőzések esetén sem, mert miközben a P2Y12R-pozitív mikroglia toborzódik a fertőzött idegsejtekhez és fagocitálja ezeket humán HSV-1 encefalitisz során, a mikroglia depléciója vagy a P2Y12R depléciója egér neurotróp vírusfertőzés modellben a fertőzés markáns terjedéséhez és rosszabb neurológiai kimenetelhez vezet³. Ugyanakkor, amíg egér MPTP-indukálta Parkinson-kór modellben a P2Y12R gátlás növeli a mortalitást, javítja a krónikus neurodegenerációt³⁶. Végül,



óvatosságra int, hogy a rekurrens stroke megelőzésére előírt Clopidogrel terápia megnöveli a vérzéses komplikációk gyakoriságát. Miközben ez a hatás vélhetőleg a vérlemezkék P2Y₁₂R gátlásának tulajdonítható, ultrahang-indukálta experimentális vérzés során a mikroglia depléció és a P2Y₁₂R gátlása nagyobb vér-agy-gát sérülést is eredményezett^{33, 37}. Ezen megfigyelések ismeretében, véleményem szerint a mikroglialis P2Y₁₂R fontos terápiás célpont lehet, de a pontos betegségmechanizmusok, terápiás hatások, valamint az intervenciók időzítésének és időtartamának gondos megválasztása nélkül a rendkívül heterogén háttérű idegrendszeri betegségek esetén komoly mellékhatások várhatók. Ezért további kutatás nélkül sem a receptor centrális gátlása, sem a P2Y₁₂R-mediálta jelátvitel stimulációja nem lenne javasolt. A legígéretesebb lehetőségnek azt tartom, hogy a P2Y₁₂R-mediálta folyamatok tanulmányozása révén (mint egy mikroglia-szelektív stimulus a központi idegrendszerben) megérthetjük, hogyan lehetne a különböző neurológiai kórképekben kiemelt kóroki tényezőnek tartott mikroglialis diszfunkciót hatékonyan gátolni, és mikroglialis „rejuvenáció” révén az endogén agyi védekező mechanizmusok terápiás finomhangolását elősegíteni.

5. A perifériásan adott NKCC1 gátló bumetanid csökkentette az agyi gyulladást (Tóth és mtsai, 2021). Az NKCC1/SLC12A2 ion kotranszporter az agyban a mikroglia sejtek mellett többek között kifejeződik agyi endothelisejteken és igen nagy mennyiségben agyi mikroér pericitákon és simaizomsejteken is (<https://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>). Lehet-e szerepe ezeknek a sejteknek is a bumetanid védőhatásában?

Válasz: Egyetértve a Bíráló felvetésével, az agyi endothelium, periciták, simaizomsejtek, és emellett az egysejt-szekvenálási adatok szerint oligodendrocitákon és asztrocitákon kifejezett NKCC1 is szerepet játszhat a korábban széles körben vizsgált neuronális- és az általunk feltárt mikroglialis NKCC1 mellett a bumetanide centrális hatásainak közvetítésében. Érthető módon, az NKCC1 fejlődésbiológiai, neuronális fiziológiában- illetve idegrendszeri betegségekben betöltött fontos szerepe miatt³⁸, a megjelent publikációk túlnyomó többsége a bumetanide és más NKCC1 gátlók hatásait zömmel neuronális hatásoknak tulajdonítja. Miközben a bumetanide farmakokinetikai tulajdonságai miatt (pl. alacsony vér-agy-gát penetráció) az alkalmazott szisztémás kezelési dózissal nehéz elérni effektív koncentrációt az agyi parenchymában, ezidáig rendkívül kis figyelmet fordítottak az NKCC1 gátlás lehetséges perifériás hatásmechanizmusaira is, amelyek nagymértékben módosíthatják a központi idegrendszerben zajló, NKCC1 függő hatások kimenetelét. A bumetanide szerepe a cerebrovaszkuláris folyamatokban ellentmondásos. Korábbi vizsgálatok felvetik lehetséges vér-agy-gát funkciókkal összefüggő hatásait a cerebrális iszkémiát követő agyi ödéma kialakulásában, miközben más kutatások vérzéses stroke esetén nem találtak egyértelmű összefüggést³⁹⁻⁴¹. Rendkívül nehéz ugyanakkor kondicionális endothelium-, pericita- és simaizomsejt-specifikus NKCC1 KO modellek és párhuzamos farmakológiai vizsgálatok hiányában megítélni, mi lehet az NKCC1 szerepe az adott sejttípusok esetén a különböző experimentális modellekben és a klinikumban. Az asztrocitákon kifejezett NKCC1 deléciója *ex vivo* és *in vivo* is csökkentette az epileptiform aktivitást⁴², de vaszkuláris hatásokat nem vizsgáltak. Kísérleteinkben az alkalmazott mikroglialis NKCC1 deléció fokozta az agyi gyulladást, ödémát és a neuronális károsodást, de elképzelhető, hogy más NVU sejteken vagy a periférián az NKCC1 ezzel ellentétes hatást fejt ki, amely magyarázhatja a bumetanide protektív szerepét számos experimentális modellben. Számunkra meglepő volt, hogy a mikroglialis NKCC1 deléció és a centrális bumetanide beadás nagyon hasonló mértékben fokozta a centrális gyulladást

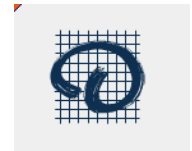


LPS beadást követően, amely a mikroglialis NKCC1 lényeges szerepére utal a vizsgálat folyamatokban. Mindenképpen további vizsgálatok elvégzése szükséges az NKCC1 sejt-specifikus hatásainak azonosításához, nem is beszélve a klinikai transzláció fontosságáról, hiszen az egér és a humán NKCC1 függő hatások nagymértékben eltérőek lehetnek.

6. A pseudorabies vírus egérkísérletek és az autopsziából származó humán HSV fertőzött agyminták alapján a mikroglia sejteknek a fertőzött idegsejtek felismerésével és azok fagocitózissal történő eltávolításával szerepe van a neurotróp vírusok idegrendszeri terjedésének korlátozásában (Fekete és mtsai, 2018). Az értekezés 52. oldalán utalás történik eddig nem közölt eredményekre COVID-19 betegségben. Igazolták-e ezt a jelenséget SARS-CoV-2 vírus fertőzés esetén?

Válasz: Kutatócsoportunk publikálás alatt álló eredményei szerint a mikroglialis P2Y₁₂ receptor COVID-19-ban elhunyt betegekben számos agyterületen (agykéreg, thalamus, hypothalamus, medulla, stb) fokális csökkenést mutat. 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. Nem találtunk ugyanakkor fertőzött idegsejteket az agyban, amely arra utal, hogy a koronavírusok ismert neurotropizmusa ellenére nem az idegsejtek fertőzöttsége a látható neuropathológiai változások elsődleges oka. Ugyanakkor, megfigyeltük a glutamaterg szinapszisok degenerációját, valamint szinapszisok és mielin mikroglialis fagocitózist a mikroglia diszfunkciót és vaszkuláris gyulladást mutató agyterületeken. Nagyfelbontású mikroszkópia, egycell RNS szekvenálás és gyulladási, valamint metabolikus markerek vizsgálatával megmutattuk, hogy a mikroglialis diszfunkció együtt jár egy mind centrális, mind szisztémás 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. Ezekből a megfigyelésekből nem tudunk érdemben következtetni arra, hogy a mikroglia játszhat-e bármilyen szerepet a fertőzés centrális terjedésének gátlásában. Neuropathológiai vizsgálataink eredményei ugyanakkor azt mutatják, hogy a legsúlyosabb gyulladás és a mikroglialis P2Y₁₂ receptor expresszió csökkenése a medulla vegetatív (kardiovaszkuláris- és légzésszabályozásért felelős) magcsoportjaiban tapasztalható. A cikk bírálat alatt van, preprint verziója nyilvános szerveren elérhető (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.06.23.546214v1>). Támogatja megfigyeléseinket, hogy a rendkívül heterogén neurológiai tünetek mellett a rohamok és a keringési zavarok is rendkívül gyakoriak COVID-19 betegekben^{1-3, 31, 35, 43-49}. Ez felveti annak valószínűségét, hogy a COVID-19-el társuló keringési- légzési- és vegetatív idegrendszeri zavarok kialakulásában is szerepet játszhat a mikroglialis védő funkciók sérülése akár a betegség akut fázisában, akár poszt-COVID betegekben, hónapokkal a felgyógyulást követően.

7. A szakmai terület perspektívái között említi az értekezés a humán primer és iPSC alapú sejtes modellek, az akut és organotipikus agysejtek kísérletes alkalmazásának használatát a jelenlegi



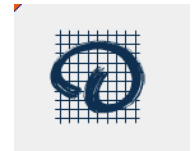
módszerek mellett. Milyen kihívásokat és lehetőségeket jelentenek az iPSC alapú modellek a mikroglia sejtek kutatásának területén? Tervezik-e iPSC alapú 3D agyi organoidok használatát?

Válasz: Celluláris-molekuláris mechanizmusok azonosítása nem nélkülözheti *in vitro* módszerek használatát a mikroglia- és neuroimmunológiai kutatások terén sem. Ugyanakkor az agyi mikrokörnyezet speciális volta miatt nagy óvatossággal kell eljárni az eredmények értelmezése során. Jó példa erre, hogy miközben a mikroglia sejtek számos kulcsfehérjéje – mint a P2Y₁₂R – gyors downregulációt mutat mikroglia izolálást követően, a sejt kultúrákban rutinszerűen használt fehérjék, mint az albumin, a fibrinogén és más, vér-agy-gáttal védett területen nem található szérumfehérje is gyulladásszerű stimulust jelenthetnek a mikroglia sejtek számára. Publikálás alatt álló vizsgálataink azt is mutatják, hogy akut agyszeletek preparálásakor a mikroglia morfológiája, membránpotenciálja, és a sejtek interakciói neuronokkal percekben belül komoly változásokon mennek át, mit több, a mikroglia fenotípusváltozásai a neuronális hálózati aktivitást is nagymértékben befolyásolják (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.12.487998v2>). Az ismert nehézségek ellenére mindenképpen ígéretes lehetőségnek tartom iPSC alapú technikák vagy agyi organoidok használatát, hiszen a megfelelő kontroll kísérletek elvégzése mellett célzott mikroglialis folyamatok jól modellezhetők ezekben a rendszerekben. Komoly potenciált rejt a genetikusan háttérű celluláris fenotípusok és az ezekhez köthető idegrendszeri betegségek kórfolyamatainak vizsgálata is ezen technikák segítségével. A területen áttörést jelenthetne, ha sikerülne az *in vivo* „naiv” mikroglialis fenotípus fenntartását irányító humorális faktorok és sejt-sejt interakciók főbb mechanizmusait feltárni (ezek csak részben ismertek), hiszen így az iPSC alapú, agyi organoid- vagy primer mikroglia tenyészetek agyi mikrokörnyezetre jellemzőbb modelljeiben lehetne a mikroglia sejtek működését vizsgálni. Jelenleg gondot okoz az egyes *in vitro* kultúrák között tapasztalható nagymértékű heterogenitás is. Látható ugyanakkor komoly fejlődés is ezen a területen, ezért nem kizárható, hogy megfontoljuk iPSC alapú 3D agyi organoid modell beállítását a közeljövőben.

Végezetül nagyon köszönöm Professzor Asszonynak, hogy elvégezte az értekezés gondos bírálatát, köszönöm az építő kritikai megjegyzéseit is és támogatását az MTA doktora fokozat elnyerésére.

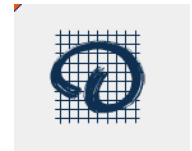
Budapest, 2023. 12. 03.

Dr. Dénes Ádám

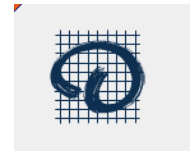


Referenciák:

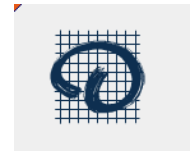
1. Csaszar E, Lenart N, Cserep C, Kornyei Z, Fekete R, Posfai B, Balazsfi D, Hangya B, Schwarcz AD, Szabadits E, Szollosi D, Szigeti K, Mathe D, West BL, Sviatko K, Bras AR, Mariani JC, Kliewer A, Lenkei Z, Hricisak L, Benyo Z, Baranyi M, Sperlagh B, Menyhart A, Farkas E, Denes A. Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. *The Journal of experimental medicine*. 2022;219
2. 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
3. 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
4. Prinz M, Masuda T, Wheeler MA, Quintana FJ. Microglia and central nervous system-associated macrophages-from origin to disease modulation. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:251-277
5. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367-402
6. Chen S, Li J, Meng S, He T, Shi Z, Wang C, Wang Y, Cao H, Huang Y, Zhang Y, Gong Y, Gao Y. Microglia and macrophages in the neuro-glia-vascular unit: From identity to functions. *Neurobiol Dis*. 2023;179:106066
7. 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
8. 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
9. Plein A, Fantin A, Denti L, Pollard JW, Ruhrberg C. Erythro-myeloid progenitors contribute endothelial cells to blood vessels. *Nature*. 2018;562:223-228
10. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of vegf-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*. 2010;116:829-840
11. Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:3595
12. Lückoff A, Caramoy A, Scholz R, Prinz M, Kalinke U, Langmann T. Interferon-beta signaling in retinal mononuclear phagocytes attenuates pathological neovascularization. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8:670-678
13. Dudiki T, Meller J, Mahajan G, Liu H, Zhevlakova I, Stefl S, Witherow C, Podrez E, Kothapalli CR, Byzova TV. Microglia control vascular architecture via a tgfbeta1 dependent paracrine mechanism linked to tissue mechanics. *Nat Commun*. 2020;11:986
14. Mills SA, Jobling AI, Dixon MA, Bui BV, Vessey KA, Phipps JA, Greferath U, Venables G, Wong VHY, Wong CHY, He Z, Hui F, Young JC, Tonc J, Ivanova E, Sagdullaev BT, Fletcher EL. Fractalkine-induced microglial vasoregulation occurs within the retina and is altered early in diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118



15. Hattori Y. The microglia-blood vessel interactions in the developing brain. *Neurosci Res.* 2023;187:58-66
16. Zhao X, Eyo UB, Murugan M, Wu LJ. Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. *Developmental neurobiology.* 2018;78:604-617
17. Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J Neuroimmunol.* 2002;132:93-98
18. 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
19. Halder SK, Milner R. Exaggerated hypoxic vascular breakdown in aged brain due to reduced microglial vasculo-protection. *Aging Cell.* 2022;21:e13720
20. Szalay G, Martinecz B, Lenart N, Kornyei Z, Orsolits B, Judak L, Csaszar E, Fekete R, West BL, Katona G, Rozsa B, Denes A. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature communications.* 2016;7:11499
21. Mastorakos P, Mihelson N, Luby M, Burks SR, Johnson K, Hsia AW, Witko J, Frank JA, Latour L, McGavern DB. Temporally distinct myeloid cell responses mediate damage and repair after cerebrovascular injury. *Nature Neuroscience.* 2021;24:245-258
22. Yu Z, Fang X, Liu W, Sun R, Zhou J, Pu Y, Zhao M, Sun D, Xiang Z, Liu P, Ding Y, Cao L, He C. Microglia regulate blood-brain barrier integrity via mir-126a-5p/mmp9 axis during inflammatory demyelination. *Advanced Science.* 2022;9:2105442
23. Lenart N, Cserep C, Csaszar E, Posfai B, Denes A. Microglia-neuron-vascular interactions in ischemia. *Glia.* 2023
24. 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
25. Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2013;7:44
26. Xing C, Li W, Deng W, Ning M, Lo EH. A potential gliovascular mechanism for microglial activation: Differential phenotypic switching of microglia by endothelium versus astrocytes. *Journal of neuroinflammation.* 2018;15:143
27. Wang C, Feng L, Zhu L, Wu L, Chen B, Cui C, Yang M, Gao Y, Jiang P. Cerebral endothelial cell-derived extracellular vesicles regulate microglial polarization and promote autophagy via delivery of mir-672-5p. *Cell death & disease.* 2023;14:643
28. 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
29. Tsioti I, Steiner BL, Escher P, Zinkernagel MS, Benz PM, Kokona D. Endothelial toll-like receptor 4 is required for microglia activation in the murine retina after systemic lipopolysaccharide exposure. *Journal of neuroinflammation.* 2023;20:25
30. Haynes SE, Hloppeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. The p2y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature neuroscience.* 2006;9:1512-1519
31. 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



32. Eyo UB, Mo M, Yi MH, Murugan M, Liu J, Yarlagadda R, Margolis DJ, Xu P, Wu LJ. P2y12r-dependent translocation mechanisms gate the changing microglial landscape. *Cell reports*. 2018;23:959-966
33. Mastorakos P, Mihelson N, Luby M, Burks SR, Johnson K, Hsia AW, Witko J, Frank JA, Latour L, McGavern DB. Temporally distinct myeloid cell responses mediate damage and repair after cerebrovascular injury. *Nature neuroscience*. 2021;24:245-258
34. Lou N, Takano T, Pei Y, Xavier AL, Goldman SA, Nedergaard M. Purinergic receptor p2ry12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113:1074-1079
35. Cserep C, Posfai B, Denes A. Shaping neuronal fate: Functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions. *Neuron*. 2020
36. Iring A, Toth A, Baranyi M, Otrókoci L, Modis LV, Goloncser F, Varga B, Hortobagyi T, Bereczki D, Denes A, Sperlagh B. The dualistic role of the purinergic p2y12-receptor in an in vivo model of parkinson's disease: Signalling pathway and novel therapeutic targets. *Pharmacological research*. 2022;176:106045
37. Johnston SC, Easton JD, Farrant M, Barsan W, Conwit RA, Elm JJ, Kim AS, Lindblad AS, Palesch YY. Clopidogrel and aspirin in acute ischemic stroke and high-risk tia. *The New England journal of medicine*. 2018;379:215-225
38. Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*. 2014;15:637-654
39. Lam TI, Anderson SE, Glaser N, O'Donnell ME. Bumetanide reduces cerebral edema formation in rats with diabetic ketoacidosis. *Diabetes*. 2005;54:510-516
40. O'Donnell ME, Tran L, Lam TI, Liu XB, Anderson SE. Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier na-k-cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2004;24:1046-1056
41. Wilkinson CM, Fedor BA, Aziz JR, Nadeau CA, Brar PS, Clark JJA, Colbourne F. Failure of bumetanide to improve outcome after intracerebral hemorrhage in rat. *PloS one*. 2019;14:e0210660
42. Nguyen TD, Ishibashi M, Sinha AS, Watanabe M, Kato D, Horiuchi H, Wake H, Fukuda A. Astrocytic nkcc1 inhibits seizures by buffering cl- and antagonizing neuronal nkcc1 at gabaergic synapses. *Epilepsia*. 2023
43. 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
44. 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
45. 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
46. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe covid-19. *Science*. 2020;368:473-474
47. 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
48. 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
49. Kubota T, Gajera PK, Kuroda N. Meta-analysis of eeg findings in patients with covid-19. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2021;115:107682