

A mikroglia szerepe az agyi véráramlás szabályozásában

Doktori tézisek

Császár Eszter

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dénes Ádám, Ph.D., vezető kutató

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Deli Mária, D.Sc., tudományos tanácsadó
Dr. Jakus Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Dobolyi Árpád, D.Sc., tudományos tanácsadó
Tagok: Prof. Dr. Csillag András, D.Sc., professor emeritus
Dr. Hájos Norbert, D.Sc., tudományos tanácsadó

Budapest
2022

1. Bevezetés

A központi idegrendszer rezidens immunsejtje a mikroglia fontos szerepet tölt be számos fiziológiás és patológiás idegrendszeri folyamat szabályozásában. A mikroglia sejtek részt vesznek a központi-idegrendszer fejlődésének koordinálásában, a szinaptikus metszés (pruning), a szinaptikus plaszticitás, a tanulás és az emlékezés folyamatainak szabályozásában, mindemellett kulcsszerepet játszanak az akut és krónikus agyi betegségek során fellépő központi idegrendszeri gyulladásos folyamatokban. Továbbá a mikroglia sejtek a vér-agy gát működésének szabályozásában is részt vesznek és jelentős mértékben hozzájárulhatnak a vaszkuláris gyulladás kialakulásához. A vaszkuláris gyulladás és vér-agy gát sérülés olyan gyakori idegrendszeri betegségek során alakulnak ki, mint például a stroke, a traumás agysérülés vagy a krónikus neurodegeneratív betegségek. A gyakori neurológiai betegségek hátterében a gyulladás kialakulása mellett gyakran megfigyelhető az agy vérellátásának korai károsodása. Az idegrendszeri betegségek kialakulásában és súlyosbodásában szerepet játszó mechanizmusok jelentős része ugyanakkor máig feltáratlan.

Az elmúlt évek kutatási eredményei rávilágítottak, hogy a mikroglia nem csak káros stimulus hatására aktiválódik, hanem nyúlványaival fiziológiás körülmények között is folyamatosan monitorozza környezetét. A mikroglia sejtek az agyi erek állapotát is folyamatosan felügyelik az intakt agyban, vaszkuláris sérülés esetén pedig percekben belül az érintett erekhez toborzódnak. A mikroglia vaszkuláris folyamatokban betöltött szerepe azonban nem tisztázott. A legtöbb kutatás a mikroglia-ér interakciókat a fejlődő agyban és különböző agyi betegségekben vizsgálta, például stroke-ban, Alzheimer-kórban és szklerózis multiplexben. Az eredmények azt mutatják, hogy a mikroglia fontos szerepet játszik a fejlődő agyban az erek kialakulásának szabályozásában (angiogenezis) és az érelágazások kialakításában. A mikroglia sejtek befolyásolják a vaszkuláris gyulladásos folyamatokat és a vér-agy gát működésének szabályozásában is részt vesznek, aktívan kommunikálnak az endotél sejtekkel, befolyásolják a vér-agy gát permeabilitását és a leukociták infiltrációját. A mikroglia különböző gyulladásos mediátorokat termel, mint az interleukin-1 β , tumor nekrozis faktor alfa, nitrogén-monoxid (NO), prosztaglandin E2 vagy a különféle reaktív oxigén intermedierek (ROS), amelyek közül néhányat vazoaktív mediátorként is ismerünk. Egyre több bizonyíték van rá, hogy a mikroglia dinamikus kapcsolatokat alakít ki a neurovaszkuláris egység sejtjeivel (asztrociták, periciták, endotél sejtek és neuronok), mely sejtek az agyi véráramlás fontos szabályozói. A korábbi kutatások azonban ezeket a kölcsönhatásokat a fejlődő agyban vagy idegrendszeri gyulladás jelenlétében vizsgálták, a mikroglia agyi véráramlás szabályozásban betöltött lehetséges szerepét azonban nem tanulmányozták.

A mikroglia megváltozott aktivitása, a csökkent agyi véráramlás, valamint a neurovaszkuláris csatolás károsodása a gyakori idegrendszeri kórképek, mint az iszkémiás stroke és a neurodegeneratív agyi betegségek esetén megelőzik a neurológiai tünetek kialakulását. Ezek a megfigyelések is jelzik, hogy a fiziológiás agyi vérkeringést szabályozó mechanizmusok és az agyi betegségek progressiójához hozzájáruló folyamatok megértése elengedhetetlen a megfelelő terápiák kifejlesztéséhez. Doktori értekezésem fő témájául a mikroglia szerepének vizsgálatát választottam a fiziológiás agyi véráramlás szabályozásában, valamint hipoperfúzió során.

2. Célkitűzések

- 1) A mikroglia szerepének vizsgálata a neurovaszkuláris csatolás szabályozásában.
- 2) A mikroglia szerepének tanulmányozása hiperkapnia-indukálta vazodilatációban.
- 3) A mikroglia szerepének vizsgálata a csökkent agyi perfúzióhoz történő adaptáció során, arteria carotis communis okklúziót követően.
- 4) Mikroglialis mechanizmusok azonosítása az agyi véráramlás szabályozásában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Egerek tartása és ellátása

A kísérleteimet 11-17 hetes hím C57BL/6J, P2Y12R^{-/-}, CX3CR1^{GFP/+}, CX3CR1^{GFP/+}/P2Y12^{-/-}, CX3CR1^{GFP/GFP}, CX3CR1^{tdTomato}, Thy1-GCaMP6, MicroDREADD^{Dq}, CX3CR1^{CGaMP5g-tdTomato}, MicroDREADD^{Dq} × CGaMP5g-tdTomato, IL-1R1^{fl/fl} és IL-1R1^{fl/fl} Δ *Slco1c1* egereken végeztem. Az egereket 12 órás fény-sötét ciklusban, ellenőrzött hőmérséklet és páratartalom mellett ad libitum etettük és itattuk. Minden kísérlet az Európai Parlament és Tanács irányelvének (86/609/EGK) és a magyarországi Állatvédelmi és Állatkísérleti Törvényben (1998; XXVIII., 243/1998. §) meghatározott irányelveknek megfelelően történt.

3.2. CX3CR1^{tdTomato}, MicroDREADD^{Dq}, MicroDREADD^{Dq} × CGaMP5g-tdTomato és CX3CR1^{CGaMP5g-tdTomato} egerek létrehozása

A CX3CR1^{tdTomato}, MicroDREADD^{Dq}, CX3CR1^{CGaMP5g-tdTomato} és MicroDREADD^{Dq} × CGaMP5g-tdTomato egereket tamoxifen (TMX)-indukálható CX3CR1^{CreERT2} egérvonal és Cre-függő tdTomato fluoreszcens fehérjét, hM3Dq

DREADD-et, vagy CGaMP5g-tdTomato-t expresszázó egérvonalak keresztezésével hoztuk létre. A tdTomato, hM3Dq DREADD vagy CGaMP5g-tdTomato expresszióját a mikroglia sejtekben a Cre rekombináza aktivitás két intraperitoneális TMX (2 mg/100 µl, kukoricaolajban oldva; #T5648; Sigma-Aldrich) injekcióval történő indukálásával hoztuk létre. A két TMX injekciót 48 óra különbséggel adtuk be a 3-4 hetes hím egerekbe. A TMX indukció után 4 héttel a mikroglia sejtek 95,3%-a expresszálta a hM3Dq receptorokat, amit az mCitrin kimutatására használt anti-zöld fluoreszcens fehérje (anti-GFP) (kecske anti-GFP antitest, 1:300; #600-101-215; Rockland) és a mikroglia kimutatására használt anti-P2Y12R immunfestés igazolt. CX3CR1^{CreERT2} egerek alkalmazásával a mikroglia állandó Cre-függő expressziót mutat, míg a CX3CR1-et expresszázó perifériás makrofágok/monociták többsége a TMX indukciót követő negyedik hét végére kicserélődik, gyors turnover-üknek köszönhetően. Ezért a kísérleteket az egerek 11 és 12 hetes korában végeztük el. A mikroglia válaszokat valós időben moduláltuk intraperitoneális CNO (klozapin-N-oxid) (0,5 mg/kg; Bio-Techne Corp.), C21-es vegyület (0,5 mg/kg; Hellobio) vagy intraperitoneális deszkloroklozapin (DCZ) (1 µg/kg; HelloBio) beadásával, a hM3Dq DREADD aktiválásán keresztül.

3.3. In vivo kísérletek

3.3.1. In vivo két-foton imaging

A CX3CR1^{GFP/+}, CX3CR1^{tdTomato}, CX3CR1^{GFP/+} x P2Y12^{-/-} vagy Thy1-GCaMP6s egereket 1,8%-os izofluránnal vagy fentanillal (0,05 mg/kg) altattuk a kraniális ablak műtétek során. A bal hemiszfériumon, az elsődleges szomatoszenzoros kéreg (barrel kéreg) felett egy 3 mm átmérőjű kraniális ablakot nyitottunk. Három héttel a kraniális ablak műtétet követően megvizsgáltuk a mikroglia-ér interakciókat a 3x arteria carotis communis okklúziós modellben, a hiperkapnia alatt vagy a neurovaszkuláris csatolás kísérleti modelljében ketamin-medetomidin érzéstelenítésben (i.p. 30 mg/kg-0,1 mg/kg). Az ereket Rhodamin B-dextrán vagy FITC-dextrán farok vénába vagy retro-orbital sinus-ba adásával jelöltük meg. A két-foton mikroszkópos képsorozatokot a Chameleon Discovery lézerrel összekapcsolt Femto2D-DualScanhead mikroszkóppal végeztük (Femtonics Ltd.). Az adatalemzést a MES szoftver (Femtonics Ltd.) segítségével végeztük.

3.3.2. Szövetfeldolgozás és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az egereket terminális ketamin-xilazin altatásban fiziológiás sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehiddel (PFA) transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat 24 órán át posztfixáltuk 10%-os szukrózos PFA oldatban, majd 25 µm vastag koronális metszeteket vágunk. Az immunfestéseket 5 %-os normál szarummal blokkolt szabadon úszó metszeten végeztük el. A nagy felbontású konfokális pásztázó mikroszkópiás és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 50 µm vastagságú vibratómos

metszeteket készítettünk és ezeket 1%-os humán szérum-albuminnal (HSA) blokkoltuk. Ezután a metszeteket primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap tris pufferolt sóoldatban (TBS) történő mosás után a metszeteket a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az inkubációt TBS-ben és foszfát pufferben (PB) történő mosás követte, majd a metszeteket tárgylemezre húztuk és Aqua-Poly/Mountal (Polysciences Europe) fedtük le. Az agymetszeteket Nikon Eclipse Ti-E invertált mikroszkóp, konfokális pásztázó mikroszkóp vagy elektron mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

3.3.3. Pre-embedding immunelektron-mikroszkópia

A vibratómmal metszett agy szeleteket PB-vel és TBS-el (pH 7,4) átmostuk, majd 1 %-os humán szérum-albuminnal (HSA) blokkoltuk. Ezután 2-3 napig TBS-ben oldott primer antitestekkel inkubáltuk őket. Többszöri mosás után a metszeteket 0,2% hideg vizes halbörzselatint és 0,5% HSA-t tartalmazó blokkoló oldatban (Gel-BS) inkubáltuk 1 órán át. Ezután a metszeteket 1,4 nm-es arany-kötött kecske anti-nyúl Fab-fragmentummal inkubáltuk önmagában vagy biotinilált szamar anti-egér antitestekkel keverve, Gel-BS-ben hígítva egy éjszakán át. Többszöri mosások után a metszeteket 2%-os glutáraldehiddel kezeltük 15 percig, hogy az aranyrészecskéket a szövetben rögzítsük. A kombinált immunogold-immunoperoxidáz reakciók esetében ezt követte az avidin-biotinilált torna-peroxidáz komplexben történő inkubálás 3 órán át szobahőmérsékleten vagy egy éjszakán át 4°C-on. Az immunoperoxidáz reakciót 3,3-diaminobenzidin (DAB) kromogénnel végeztük. Az immunarany reakcióhoz a metszeteket ezüst-intenzifikáló oldatban inkubáltuk 40-60 percig szobahőmérsékleten. Ezután a metszeteket 0,5%-os ozmium-teroxidot tartalmazó PB oldattal kezeltük szobahőmérsékleten, majd felszálló alkoholsorban és acetonitrilben víztelenítettük, és Durcupanba ágyaztuk a metszeteket. A dehidratálás során 70%-os etanol oldatban hígított 1 %-os uranil-acetáttal kontrasztoltuk a metszeteket 20 percig. A hagyományos elektronmikroszkópos elemzéshez szükséges ultravékony metszeteket Hitachi H-7100 elektronmikroszkópban, az elektron tomográfias metszeteket pedig Eagle 4k kamerával felszerelt FEI Tecnai Spirit G2 BioTwin transzmissziós elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

3.3.4. Post mortem humán agyminták

A post mortem humán agyminták egy 60 éves nő, egy 73 éves férfi és egy 27 éves férfi betegről származnak, akiknek a neuropatológiai vizsgálatok szerint nem volt ismert neurológiai betegségük (etikai engedély ETT TUKEB 31443/2011/EKU [518/PI/11]). Az immunhisztokémiai vizsgálatainkat fixált, vibratómmal lemetezett hippokampális agyszöveteken végeztük el.

3.3.5. Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)

A kortikális véráramlást PeriCam PSI nagy felbontású Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) technikával mértük. Az egerek fejét sztereotaxiás befogóval rögzítettük, a fejbőrt megnyitottuk és az intakt koponyán keresztül mértük az agyi keringést. Az arteria carotis communis okklúziós kísérleteket ketamin-xilazin (i.p. 100mg/kg - 10mg/kg) altatásban végeztük. A bajusz-stimulációs protokollt (neurovaszkuláris csatolás) és a hiperkapniás kísérleteket pedig ketamin-medetomidin (i.p. 30mg/kg – 0.1mg/kg) szedációban.

3.3.6. A mikroglia szelektív eltávolítása az agyból

Az egereket CSF1 receptor gátlót, PLX5622-t (Plexxikon Inc., 1200 mg PLX5622 1 kg tápban) tartalmazó táppal etettük 3 héten keresztül, hogy a mikroglitát elimináljuk az agyból.

3.3.7. PSB0739 ciszterna magnába injektálása és intraperitoneális L-NAME (NG-Nitro-L-arginin metil-észter) beadás

A mikrogliális P2Y₁₂ receptort szelektíven gátoltuk PSB0739 ciszterna magnába történő injektálásával (0,9 %-os fiziológias sóoldatban oldva, 40 mg/kg 5 µl térfogatban), a kontroll egerekbe 0,9 %-os fiziológias sóoldatot injektáltunk. A ciszterna magna injektálásokat 35 perccel az agyi véráramlás mérés előtt 1-1,5%-os izoflurán altatásban végeztük el. Az L-NAME-t, nem szelektív nitrogén-oxid-szintáz (NOS) gátlót (30 mg/kg 0,9%-os sóoldatban oldva) 5 perccel az agyi véráramlás mérés előtt intraperitoneálisan adtuk be.

3.3.8. SPECT és PET imaging

Az egyfoton-emissziós komputertomográfias (SPECT) és pozitronemissziós (PET) vizsgálatokat 2%-os izofluránnal altatott egereken végeztük el. A SPECT-mérésekhez [99mTc]-HMPAO ligandumot használtunk. Az adatgyűjtés 3 perccel a radiotracer farokvénán keresztül történő beadása után kezdődött (beadott aktivitás: 99,22 ± 9,33 MBq). A méréseket egy multi-pinhole egér kollimátorokkal felszerelt NanoSPECT/CT PLUS készülékkel (Mediso Kft., Magyarország) végeztük el. A SPECT-felvételt követően [18F]-FDG (2-deoxi-2-(18F)fluor-D-glükóz) PET-méréseket végeztünk. A PET-adatgyűjtés 20 perccel az intravénás [18F]-FDG injekció beadása után kezdődött, 10 perces akvizíciós idővel, microPET P4 készülékkel. A rekonstrukciót követően manuális koregisztrációt és atlasz alapján kiválasztott agy területeken (ROI), a kisagyban, az agykéregben és az egész agyban a VivoQuant

szoftver (InviCRO, USA) segítségével végeztünk méréseket a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében.

3.3.9. Szomatoszenzoros stimulációs protokoll (neurovaszkuláris csatolás)

Szomatoszenzoros ingerként egyoldali bajusz stimulációt alkalmaztunk, amit manuálisan vagy elektromechanikusan végeztük el. A manuális stimulációhoz fülpiszkálót használtunk (4-5 Hz) a következő protokoll szerint: a bal bajuszszálat 30 másodpercig stimuláltuk 60 másodpercenként ismételve hat körben. Az elektromechanikus stimuláció (5 Hz) során a bajuszszálat 15 másodpercig stimuláltuk, amit 10 körben, 40 másodperces szünetekkel ismételtünk. A véráramlást ketamin-medetomidin szedáció alatt végeztük el (30 mg/kg - 0,1 mg/kg 0,9 %-os sóoldatban oldva, i.p.).

3.3.10. Funkcionális ultrahang (fUS)

Az adatgyűjtést egy ultragyors ultrahangszkennerhez kapcsolt 128 elemű, 15 MHz-es probe-al végeztük (Iconeus One, Iconeus Franciaország, Párizs). Az állat fejét leborotvtáltuk és sztereotaxiás befogóba rögzítettük. A probe-ot a beépített 3D Allen Brain Atlas szoftver segítségével pozícionáltuk a barrel kéreg fölé. A véráramlást a koponyán keresztül mértük ketamin-medetomidin (i.p. 30mg/kg - 0,1mg/kg) szedációban.

3.3.11. In vivo elektrofiziológia

Az elektrofiziológiás mérésekhez egyedi készítésű, nyolc nikróm tetródot (átmérő 12,7 μm) és 50 μm -es optikai szálat tartalmazó microdrive-okat ültettünk be a jobb oldali barrel kéregbe (AP: -1,4; ML: 3,0 DV 0,75-2,0 mm) mély altatásban (i.p. ketamin-xilazin 125 mg/kg - 25 mg/kg 0,9%-os NaCl-ban oldva). A sztereotaxiás műtétet 3 napos felépülési időszak követte. Az elektrofiziológiai mérések alatt az egerek ketamin - medetomidin (3 mg/kg - 0,1 mg/kg) szedációban voltak. Az adatelemzést Matlab R2016a program segítségével végeztük.

3.3.12. In vivo hiperkapnia protokoll

Ketamin-medetomidin (i.p. 30 mg/kg - 0,1 mg/kg) szedációban 5 percig tartó alap agyi véráramlás mérést követően 10% CO₂-ot tartalmazó levegőelegy (21,1% O₂ és N₂ ad 100%) 2 percig tartó belélegeztetésével hiperkapniát idéztünk elő az egerekben. A kontroll és mikroglia-depletált egerek egy csoportjának a hiperkapnia indukálása előtt i.p. 0,01 $\mu\text{g/g}$ atipamezolt adtunk be, hogy felfüggesztjük a medetomidin α -2-agonista hatását.

3.3.13. Vérgázanalízis

A bal femorális artériát bekanüláltuk ketamin-medetomidine altatásban. Az artériás vért üvegkapillárisokba vettük le hiperkapnia előtt és után. A mintákból az artériás vérgáz értékeket (pO_2 , pCO_2) és a pH-át vérgázanalizátor készülékkel mértük meg (ABL90 Flex Plus, Radiometer Medical ApS, Dánia).

3.3.14. Akut szeleteken végzett hiperkapniás kísérlet és ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) immunhisztokémia

Az akut szeletek elkészítéséhez az egereket mély izoflurán altatásban dekapitáltuk, az agyakat eltávolítottuk a koponyából és vibratómmal lemetszettük. A szeleteket 20 percig előinkubáltuk 1 ml módosított mesterséges gerincvelői folyadékkal (mACSF). A mACSF-ben vagy mACSF+PSB0739-ben történő előinkubálás után a szeleteken hiperkapniás gázkeveréket buborékoltattunk át a CO_2 -szint fokozatos 5%-ról 14,6%-ra történő emelésével. 15 perc hiperkapnia után a szeleteket 48 órán keresztül jéghideg 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk $4^\circ C$ -on. A 0,1 M PB-vel történő mosás után a szeleteket 4%-os agarba ágyasztuk, és 50 μm vastagságú vibratomos metszeteket vágtunk. Ezután a metszeteket PBS-ben hígított primer ellenanyag-keverékben 48 órán át $4^\circ C$ -on inkubáltuk. Ezt követően többszöri PBS-ben történő mosás után a metszeteket PBS-ben hígított, a megfelelő másodlagos antitestek keverékével inkubáltuk. A metszeteket üveg tárgylemezre húztuk. A fluoreszcens képeket Nikon Eclipse Ti-E invertált mikroszkóppal készítettük.

3.3.15. Az agyi véráramlás és az agyi pH szimultán mérése hiperkapnia alatt

Az elektrofiziológiai változókat (DC-potenciál, agyi pH) és a lokális véráramlást (lézeres Dopplerrel) a kraniotómiát követően szimuláltan mértük, olyan ion-szenzitív mikroelektrodák segítségével, amelyek Ag/AgCl vezetőkön és a hozzájuk kapcsolódó szűrőmodulokon keresztül egy kétsatornás, nagy bemeneti impedanciájú elektrométerhez csatlakoznak. A kísérletek során a pH-érzékeny mikroelektrodát egy mikromanipulátorral engedjük le a kéregbe, egy másik, sóoldattal töltött üvegkapilláris mikroelektroddal (csúcsátmérő = 20 μm) együtt, amely referenciaként szolgált. A referenciaelektrodó lassú kortikális vagy DC potenciált vett fel. Az egér nyakának bőre alá egy Ag/AgCl elektrodát ültettünk be, amelyet közös földként használtunk. A műtéti előkészületeket 1,5-2%-os izoflurán altatásban, míg a pH- és LDF-méréseket medetomidin szedációban Faraday ketrecben végeztük a Szegedi Tudományegyetem Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszékén.

3.3.16. Ismételt, tranzienst, egyoldali arteria carotis communis okklúziós modell

Kifejlesztettünk egy tranzienst, ismételt egyoldali arteria carotis communis okklúziós modellt, hogy hipoperfúziót idézzünk elő anélkül, hogy az agyban iszkémia vagy sejtkárosodás keletkezne. Az arteria carotis communis-t ideiglenesen 5 percre cernával elhúztuk (elzártuk), majd 5 percre felengedtük (reperfúziós periódus). A protokoll az okklúzió-reperfúzió lépések háromszori megismétléséből áll (3x CCAo) ketamin-xilazin altatásban (i.p. 100mg/kg - 10mg/kg 0,9%-os sóoldatban oldva). Ez az okklúziós modell agyi iszkémia és neuronális sérülés kiváltása nélkül alkalmas a hipoperfúzió során fellépő vaszkuláris adaptációs válaszok vizsgálatára. Az agyi véráramlás mérések során az egerek testhőmérsékletét $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on tartottuk homeotermikus takaró segítségével (Harvard Apparatus).

3.3.17. A perivaszkuláris makrofágok eliminációja

A perivaszkuláris makrofágokat klodronátot tartalmazó liposzómák bal agykamrába történő injektálásával ($70\mu\text{g}/\text{egér}$ $10\mu\text{l}$ térfogatban) elimináltuk a perivaszkuláris térből. Az injektálást követő 3. napon maximális a klodronát hatékonysága, ezért 3 nappal az injektálás után mértük az agykérgi véráramlást LSCI-vel az okklúziós modellben.

3.3.18. Fokális agyi iszkémia

A stroke műtéthez az anesztéziát 4%-os izoflurán belélegeztetésével indukáltuk, és a műtét során az altatást 1,75%-os izoflurán belélegeztetésével tartottuk fenn. A testhőmérsékletet a műtét során folyamatosan monitoroztuk, és $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on tartottuk egy fűtőtakaró segítségével (Harvard Apparatus), az agyi véráramlást lézer Doppler segítségével monitoroztuk (Moor Instruments Ltd.). A nyak ventrális felszínén középvonali bemetszést végeztünk, majd izoláltuk és lekötöttük a jobb oldali arteria carotis communist. Az arteria carotis internát és az arteria pterygopalatinát ideiglenesen lekötöttük, majd egy 6-0 monofilamentet vezetünk be az arteria carotis internába az arteria carotis communis bemetszésén keresztül. A filamentet körülbelül disztálisan 10 mm-re a carotis bifurkációtól az arteria cerebri media eredésén túlra vezetünk be. A 45 perces okklúziót követően a filamentet visszahúztuk az arteria common carotisba, hogy a 40 perces reperfúzió megtörténhessen. A reperfúzió 30. percétől 10 percen át mértük az agykérgi véráramlást LSCI-vel.

3.4. *In vitro* kísérletek

3.4.1. *Primer endotél sejt kultúra*

A primer endotél sejt kultúrákat 6-8 hetes C57BL/6J egerek agyából készítettük. Az egér előagyakat PBS-be gyűjtöttük, és az agyhártyát steril kromatográfiás papírral eltávolítottuk. Az agyszövetet szikével apró darabokra vágtuk, és Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12-ben (DMEM-F12) lévő kollagenáz II és dezoxiribonukleáz I (DNáz I) keverékében 55 percig 37°C-on enzimatikusan emésztettük. 20%-os borjú szérum albumin (BSA) gradiensen háromszori centrifugálással (1000x g, 20 perc, háromszor) a mikroereket elválasztottuk a mielin tartalmú rétegtől. Az összegyűjtött mikroereket tovább emésztettük kollagenáz/diszpáz és DNáz I keverékével 35 percig 37°C-on. Az emésztett agyi mikroereket háromszor mostuk DMEM-F12-vel, majd kollagén I.-el bevont platekre ültettük ki a frissen izolált sejteket. Az első négy napban puromicint adtunk a primer tápfolyadékhoz a P-glikoproteint (P-gp) nem expresszáló sejtek szelektív eliminálása érdekében, melynek így összetétele: 1ng/ml alap fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), 100µg/ml heparin, 100x inzulin-transzferin-szelénium (ITS), 4µg/ml puromicin DMEM-F12-ben oldva. Miután az 5.-6. napon konfluenssé vált a tenyészet, a sejteket kollagén IV-el és fibronectinnel bevont 48 lyukú plate-ekre passzáltuk, 15.000 sejt/lyuk sejtsűrűséggel, és P1 napon *in vitro* hipoxiás vagy hiperkapniás kísérletekre használtuk.

3.4.2. *Primer asztroglia és mikroglia sejt kultúrák*

Az asztroglia sejtek primer tenyészeit újszülött egerek agyából állítottuk elő. A P0-P2 napos teljes agyáról először eltávolítottuk az agyhártyát, majd az agyszöveteket felaprítottuk. A szövetdarabokat 0,05% w/v tripszinnel és 0,5mg/ml DNase I-vel emésztettük foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS) 10 percig szobahőmérsékleten. Ezután a sejteket poli-L-lizin bevonatú műanyag Petri-csészékre ültettük ki $3-4 \times 10^5$ sejt/cm² sejtsűrűséggel. A sejteket 10%-os magzati szarvasmarha szérummal (FBS), 4 mM glutaminnal és 40 µg/ml gentamicinnel kiegészített Minimal Essential Mediumban tenyésztettük. A primer mikroglia sejteket C57BL/6J újszülött egerek teljes agyából származó asztroglia/mikroglia kevert sejttenyészetekből izoláltuk. A mikroglia izolálását a kultúra fenntartásának 21. és 28. napja között végeztük el enyhe tripszinzinálással. Az *in vitro* hipoxiás és hiperkapniás kísérletekhez az izolált sejteket $1,5 \times 10^5$ sejt/cm² sűrűségben poli-L-lizin bevonatú 48 lyukú platekbe ültettük, és 48 órán belül felhasználtuk.

3.4.3. *In vitro* hipoxia és hiperkapnia

Az O₂/CO₂ gázadagolókkal felszerelt Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader-t használtunk az 1% O₂/5% CO₂/94% N₂ (hipoxia) vagy 15% CO₂/85% levegő

(hiperkapnia) összetételű gázkeverékek szintjének biztosítására 37°C-on (BioTek Instruments). A 48 lyukú platekben konfluenssé növesztett endotél vagy asztrogli sejteket, illetve mikroglia sejteket a fedelek levétele után 5 (hiperkapnia) vagy 10 percre (hipoxia) helyezték a Cytation 5 kamrájába. A hipoxia sejszintű kialakulásának követése érdekében néhány tenyészetet 5µM Image-iT™ Green Hypoxia reagenssel kezeltünk 30 percig 37°C-on. A hipoxia-reagens akkor kezd fluoreszkálni, amikor a légköri oxigénszint 5% alá csökken. A Cytation5 készülékkel (10x nagyítás) 0/10percenként készített fluoreszcens képeket FIJI szoftverrel (v1.53, NIH) elemeztük ki. A közeg pH-értékében a hiperkapnia során bekövetkező változásokat a Cytation 5 Multi-Mode Reader segítségével a fenolvörös abszorbancia 415 és 560 nm-es hullámhosszán mértük. Az intracelluláris pH hiperkapnia alatti változásait a pHrodo Green AM-mal jelölt gliasejtek fluoreszcencia-intenzitásának leolvasásával határoztuk meg a Cytation 5 Multi-Mode Readerrel (BioTek Instruments).

3.4.4. Primer mikroglia sejt kultúrák és kalcium képződés

A primer mikroglia sejteket MicroDREADD^q újszülött egerek agyából származó asztrogli/mikroglia vegyes sejt kultúrákból izoláltuk. A mikroglia sejt izolálása előtt a kevert sejt kultúrák felét 2 µM 4-hidroxi TMX-el kezeltük 1 hétig, amit a sejt kultúra fenntartásának 21. és 28. napja között végeztünk el enyhe tripszinizálással. A sejteket poli-L-lizin bevonatú üveg fedőlemezekre ültettük ki 40 000 sejt/cm² sejtsűrűséggel, és 2-3 napon belül felhasználtuk. A mikroglia nyúlványok mozgékonyságának vizsgálatára használt fáziskontrasztos time-lapse felvételeket Zeiss Axiovert 200M mikroszkóppal készítettük 20× nagyításon (20× Plan-Neofluar Ph2 objektív), 0,2 képkocka/másodperc sebességgel. A kalcium képződéshez a sejteket 1 µM Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Invitrogen) vagy 5 µM Calbryte 590 AM (AAT Bioquest) festékkel töltöttük fel 2000× Pluronic F-127 (Invitrogen) vagy 100× PowerLoad Concentrate (Invitrogen) jelenlétében 30 perc alatt szobahőmérsékleten. A sejteket 30 percig szobahőmérsékleten tartottuk. A képződés során a sejteket ACSF-fel mostuk át 1 ml/perc áramlási sebességgel szobahőmérsékleten. A sejteket DREADD agonistákkal kezeltük: CNO (1 µM vagy 100 nM; Bio-Techne Corp) vagy C21 (1 µM; HelloBio). A 17. ábrához kapcsolódó kísérletekben a tenyészeteket többször, 10 percenként 1 µM C21-el kezeltük 1 percig, majd egyszer 10 µM ATP-ét adtuk a sejteknek. A kalcium képződését vagy egy Ti-E inverz mikroszkópra épített Nikon AIR konfokális lézeres pásztázó rendszerrel végeztük 60× nagyítással (60× Plan Apo VC WI objektív, NA = 1,2), 20 képkocka/másodperc sebességgel, vagy egy CoolLed pE-4000 megvilágítórendszerrel és Hamamatsu ORCA-Flash 4.0 kamerával felszerelt Nikon Ti2 mikroszkóppal 40× nagyítással (40× Apo WI λS objektív, NA = 1,25), 2 képkocka/másodperc sebességgel. Az adatok analíziséhez Fiji (ImageJ; National Institutes of Health [NIH]) és Clampfit (pClamp10 suite; Molecular Devices)

programot használtunk. A statisztikai analízist GraphPad Prism 8.4.3 programmal végeztük el.

3.4.5. A nukleotidok és nukleozidok mennyiségi meghatározása

A felszabaduló adenin-nukleotidok (adenozin-trifoszfát - ATP, adenzin-difoszfát - ADP, adenzin-mondofoszfát - AMP) és adenzin (Ado) koncentrációját a tápközegből vagy agyszöveti homogenizátumokból nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével határoztuk meg Shimadzu LC 20 AD analitikai rendszerrel, UV (Agilent 1100 VW 253 nm-re állított) detektálással. A homogenizátumok koncentrációit kétpontos kalibrációs görbével számoltuk ki, belső standard módszerrel. Az adatokat (n=4 vagy 5 minden csoportban) pmol per mg fehérje vagy nmol per mg-ban fejeztük ki.

3.5. Statisztikai elemzés

Minden kvantitatív analízist vakon végeztem a STAIR és ARRIVE irányelvek szerint. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7.0 vagy 8.4.3 szoftverrel végeztem. Az adatok normális eloszlását a D'Agostino-Pearson-féle normalitástesztel vizsgáltam. Két vagy több normális eloszlású csoport összehasonlítására a párosítatlan Student's t-tesztet használtunk Welch's korrekcióval, vagy egyutas ANOVA-t Dunett's többszörös összehasonlító teszttel, vagy kétutas ANOVA-t Tukey's vagy Sidak's többszörös összehasonlító teszttel. A nem normális eloszlású adatok esetében a Mann-Whitney-tesztet vagy az egyutas ANOVA-t használták Dunett's többszörös összehasonlító tesztjével, vagy a kétutas ANOVA-t Tukey's vagy Sidak's többszörös összehasonlító tesztjével.

4. Eredmények

4.1. A mikroglia közvetlen, purinerg kapcsolatokat alakít ki a neurovaszkuláris egység véráramlás szabályozásában részt vevő sejtjeivel

- Két-foton mikroszkóp és konfokális mikroszkóp segítségével megfigyeltük, hogy a mikroglia sejtek szoros asszociációt mutatnak az első, másod- és harmadrendű artériás érelágazásokkal, és a mikroglia nyúlványok az agyi érrendszer minden érszakaszával közvetlen kapcsolatokat alakítanak ki.
- Konfokális mikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy a parenchimális P2Y12 receptor pozitív mikroglia nyúlványok képesek a GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje) / AQP4 (akvaporin-4) pozitív asztrocita végtalpakon keresztlynúlva közvetlenül érintkezni a simaizomsejtekkel a penetráló nagy erek szintjén és az endotél sejtekkel a nagy erek és mikroerek szintjén egyaránt.

- Konfokális mikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálataink azt mutatják, hogy a P2Y₁₂R-pozitív mikroglia nyúlványok azokon a pontokon érintkeznek szorosban az endotél sejtekkel, ahol az endotél sejtek mitokondriumai találhatóak, a P2Y₁₂ receptor immunogold részecskék ezeken a határfelületeken feldúsultak. A TOM20 (mitokondriális marker) immunfluoreszcencia-intenzitása szignifikánsan magasabb azokon a helyeken, ahol a mikroglia kontaktál az endotél sejtekkel.
- Konfokális mikroszkópia és elektronmikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy az agyban az individuális mikroglia sejtek egyszerre több mikroérrel és a közelükben lévő neuronokkal is képesek közvetlen kapcsolatot kialakítani. A mikroglia nyúlványok közvetlenül érintkeznek az agyi véráramlás szabályozásában résztvevő neurovaszkuláris egység sejtjeivel és szimultán képesek kontaktálni a neuronokkal és az agyi erekkel.
- Konfokális mikroszkópia és elektronmikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy a mikroglia az egér agyszövetben megfigyelt kapcsolatokhoz hasonló vaszkuláris sejt-sejt interakciókat alakít ki a humán agykéregben is: a P2Y₁₂ receptor pozitív mikroglia nyúlványok közvetlenül érintkeznek mind a perivaszkuláris asztrocita végtalpakkkal, mind a kis arteriolák és a kapillárisok endothelium sejtjeivel.

4.2. A mikroglia P2Y₁₂ receptorain keresztül modulálja a neurovaszkuláris csatolást az agykéregben

- *In vivo* HMPAO-SPECT és FDG-PET méréseink eredményei azt mutatják, hogy a mikroglia szelektív eliminációja PLX5622 alkalmazásával (CSF1 receptor gátló) nem befolyásolja az erek szerkezetét és az agyi anyagcserét. Nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a mikroglia-depletált egerek között a HMPAO és FDG radioligandok felvételének tekintetében egyik agyi területen sem.
- *In vivo* Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) méréseink megmutatták, hogy a mikroglia hiányában a neurovaszkuláris csatolás károsodik, amit az bizonyít, hogy a szomatoszenzoros ingerre (bajusz-stimulációra) adott fokális véráramlásnövekedés mértéke szignifikánsan kisebb a mikroglia-depletált egerekben a kontroll egerekben mért értékekhez képest a barrel kéregben. *In vivo* funkcionális ultrahang méréseink megerősítik, hogy mikroglia hiányában a bajusz-stimulációra adott vértérfogat-változás növekedése a kontralaterális barrel kéregben szignifikánsan kisebb a kontroll egerekben mértékekhez képest.
- *In vivo* LSCI-vel végzett kísérleteink megmutatták, hogy a P2Y₁₂ receptor KO egerekben a szomatoszenzoros ingerre adott véráramlás válasz mértéke kisebb, mint a kontroll egerekben. A mikroglialis P2Y₁₂ receptor cisterna magna beadással, PSB0739-el történő akut, szelektív blokkolását követően a bajuszstimulációra adott véráramlsemelkedése szignifikánsan kisebb mértékű volt a kontroll egerekhez képest.

- LSCI-vel megvizsgáltuk, hogy a mikroglia-depléciónak hatása betudható-e a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) által szabályozott folyamatoknak. Mind a mikroglia-depléciónak, mind az L-NAME (NG-Nitro-L-arginin metil-észter, NOS inhibitor) beadás jelentősen csökkentette a bajuszstimulációra adott véráramlás-emelkedés mértékét a barrel kéregben. Az L-NAME beadása a mikroglia-depletált egerekbe további véráramlásnövekedést eredményezett a mikroglia-depletált vagy L-NAME-vel kezelt egerekben mértékekhez képest.

4.3. A mikroglia manipulációja nem a neuronális aktivitás megváltoztatásán keresztül hat a véráramlási válaszra

- Krónikusan beültetett tetród elektródákkal történt méréseink megmutatták, hogy mind a mikroglia-depletált, mind a P2Y12R KO egerekben szignifikáns mértékben megemelkedett a barrel kéreg neuronjainak alap tüzelési frekvenciája a kontroll egerekben mért értékekhez képest. Azonban a bajusz stimuláció által kiváltott neuronális válaszok (tüzelési frekvenciák) nem különböztek szignifikáns mértékben a mikroglia-depletált, P2Y12 receptor KO és kontroll egerekben.
- *In vivo* két-foton mikroszkópiás méréseink azt mutatták, hogy a Thy1-GCaMP6s egerekben a szomatoszenzoros stimuláció által kiváltott neuronális kalcium válaszok (GCaMP6s jel intenzitás) növekedésének mértéke nem különbözik szignifikánsan a kontroll és a mikroglia-depletált egerek között. A mikroglia hiánya (PLX5622 depletált) vagy diszfunkciója (P2Y12 receptor KO) eltávolítja az alap neuronális aktivitást, míg neurovaszkuláris csatolás során a mikroglia manipulációja nem a neuronális aktivitás megváltoztatásán keresztül hat a véráramlási válaszra.

4.4. A mikroglia valós idejű, kemogenetikusan aktiválása a neurovaszkuláris csatolás károsodásához vezet

- *In vitro* klozapin-N-oxid (CNO) vagy C21-es vegyület (C21) hatására a MicroDREADD^{Dq} egerekből származó mikroglia sejtekben az intracelluláris kalcium-szint gyorsan megemelkedik, míg a TMX-kezeletlen (nem indukált) sejtekben nem idéz elő kalcium választ.
- Ismételt CNO vagy C21 stimulációk hatására a MicroDREADD^{Dq} mikroglia csökkent mértékű kalcium választ ad, miközben kemogenetikusan aktivációra csökken az ATP-re adott válaszkészsége is *in vitro*.
- A mikroglia kemogenetikusan aktiválása a mikroglia nyúlványok motilitását néhány percen belül meggátolja és a mikroglia sejtek morfológiája is megváltozik, mind *in vivo*, mind *in vitro*. MicroDREADD^{Dq} × CGaMP5g-tdTomato egerekben *in vivo* két-foton mikroszkópos vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az agykéregben

lévő arteriolákkal és mikroerekkel kontaktáló mikroglia nyúlványokban a kalcium jel dinamikusan változik.

- *In vivo* LSCI méréseink megmutatták, hogy MicroDREADD^{Dq} egerekben a mikroglia kemogenetikus aktiválása a mikroglia-depletált egereknél tapasztaltakhoz hasonló mértékben csökkenti a bajusz stimuláció-indukálta véráramlás-emelkedést, tehát a neurovaszkuláris csatolás károsodását okozza.

4.5. A mikrogliális P2Y12 receptor részt vesz a hiperkapnia-indukálta vazodilatáció szabályozásában

- *In vivo* két-foton mikroszkópos méréseink azt mutatták, hogy hiperkapnia hatására az arteriolákat és mikroereket dinamikusan tapogató mikroglia nyúlványok morfológiája percekben belül megváltozik. A mikroglia nyúlványok dinamikusan tapogadják az arteriolák körül található SR101-jelölt perivaszkuláris asztrocita végtalpakat és a kontaktáló mikroglia nyúlványok végén található filopodium szám jelentősen megemelkedik hiperkapnia hatására. CX3CR1^{CGaMP5g-tdTomato} egerekben hiperkapnia hatására a perivaszkuláris mikroglia sejtek nyúlványaiban és filopódiumaiban 1-2 percen belül gyors kalcium jel pulzálásokat figyeltünk meg.
- *In vivo* két-foton mikroszkópos vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a penetráló artériák és arteriolák hiperkapnia-indukálta vazodilatációja jelentős mértékben károsodik mikroglia-depletált egerekben. *In vivo* LSCI-vel mért hiperkapnia-indukálta véráramlás-emelkedés mértéke is szignifikánsan kisebb volt a mikroglia sejtek hiányában a kontroll egerekben mért értékekhez képest.
- *In vivo* LSCI méréseink megmutatták, hogy a P2Y12 receptor KO egerekben is szignifikánsan kisebb hiperkapnia-indukálta véráramlás-emelkedés a kontroll egerekhez képest. *In vivo* két-foton mikroszkópos méréseink azt mutatták, hogy a mikrogliális P2Y12 receptor hiányában (CX3CR1^{GFP/+} x P2Y12R KO egerekkel) a kontroll (CX3CR1^{GFP/+}) egerekhez képest csökken hiperkapnia-indukált vazodilatáció mértéke. *In vivo* két-foton mikroszkópos méréseink során megfigyeltük, hogy a P2Y12 receptor KO egerekben a perivaszkuláris filopodium képződés is jelentős mértékben lecsökken hiperkapniát követően a kontrollokhoz képest.
- *In vivo* elektrofiziológias módszerrel megvizsgáltuk, hogy a hiperkapnia befolyásolja-e neuronális aktivitást. Nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll, a mikroglia-depletált és a P2Y12R KO egerek között.
- *Ex vivo* akut agyseleteken a hiperkapnia által kiváltott ciklikus guanozin-monofoszfát-növekedést jelentős mértékben gátolta a mikrogliális P2Y12 receptor PSB-0739-el történő blokkolása.

4.6. A hiperkapnia és a hipoxia purinerg metabolitok gyors, stimulus-függő felszabadulását indukálja a neurovaszkuláris egység sejtjeiből és az agyi mikroglia sejtéből

- pH-szelektív elektródával végzett *in vivo* méréseink megmutatták, hogy az alap/nyugalmi agyi pH mikroglia hiányában szignifikánsan alacsonyabb, miközben a hiperkapnia által kiváltott negatív pH-eltolódás mértéke nem különbözik szignifikánsan a kontroll és mikroglia-hiányos egerekben.
- *In vitro* kísérleteink kimutatták, hogy hiperkapnia hatására csökken az extracelluláris és az intracelluláris pH. Továbbá a hiperkapnia gyors ATP- és ADP-felszabadulást váltott ki a primer endotél sejtéből, míg az asztrociták főként ATP-t és adenozint termeltek. A primer mikroglia sejtek főként ADP-t és adenozint szabadítanak fel hiperkapnia hatására. Hiperkapnia hatására mikroglia hiányában kevesebb adenozin szabadul fel az agyban, mint a kontroll egerekben *in vivo*.
- Hipoxia hatására az endotél sejtek ATP-ét és AMP-ét, míg az asztrocita és a mikroglia főként ADP-t szabadított fel *in vitro*.

4.7. A mikroglia érzékeli és modulálja az agyi véráramlást cerebrális hipoperfúzió során

- *In vivo* két-foton mikroszkópiás vizsgálataink azt mutatják, hogy a mikroglia nyúlványok gyorsan reagálnak az arteria carotis communis okklúziókat követő véráramlás csökkenésre, amit az erek körül található mikroglia nyúlványok motilitásának növekedése mutat.
- *In vivo* LSCI-vel végzett méréseink azt mutatják, hogy a mikroglia-depletált egerekben az egyoldali arteria carotis communis okklúziókat követő agykérgi hipoperfúzióhoz történő adaptáció jelentős mértékben károsodott a kontroll egerekhez képest. A mikroglia-depletált egereknél mindkét agyféltekén tapasztalható az agyi véráramlás csökkenése a kontroll egereknél tapasztaltakhoz képest.
- *In vivo* LSCI-vel megvizsgáltuk, hogy a perivaszkuláris makrofágok (PVM) részt vesznek-e az agyi véráramlás modulációjában az ismételt arteria common carotis okklúziókat során. Nem találtunk szignifikáns különbséget az arteria common carotis okklúziókat követő agyi véráramlás-változásokban a kontroll és a PVM-depletált egerek között LSCI-vel mérve.
- *In vivo* LSCI méréseink azt mutatják, hogy a mikroglialis P2Y₁₂ receptor genetikai deléciója vagy akut farmakológiai blokkolása PSB0739 ciszterna magnába történő injektálásával az agyi véráramlás jelentős mértékű megváltozásához vezet az ismételt arteria common carotis okklúziókat követően. Az agyi véráramlás helyreállítása mind a genetikai, mind a farmakológiai P2Y₁₂ receptor gátlását

követően jelentősen károsodott mind az ipszilaterális, mind a kontralaterális agyféltekén, hasonlóan ahhoz, amit a mikroglia-depletált egereknél tapasztaltunk.

4.8. Az agyi endotéliális IL-1R1 deléciója javítja az agyi iszkiémiát követő korai kortikális perfúziós deficitet

- Megvizsgáltuk a lehetséges gyulladásoz mechanizmusokat is, amelyek beavatkozhatnak a vaszkuláris válaszkobba. *In vivo* LSCI-vel megvizsgáltuk, hogy az mikroglia által is termelt IL-1 (interleukin-1)-indukálta jelátvitel közvetíti-e az agyi perfúziós változásokat agyi iszkiémiát követően az endotéliális IL-1R1-en (interleukin-1 receptor 1) keresztül. Az endotéliális IL-1R1 deléciója szignifikánsan kisebb perfúziós deficitet eredményez az ipszilaterális agyféltekén az arteria cerebri media által ellátott agyterületeken a kontroll egerekhez képest.

5. Következtetések

A mikroglia, a központi idegrendszer rezidens immunsejtje fontos szerepet játszik a központi gyulladásoz folyamatok és a vér-agy gát funkcióinak szabályozásában. Bizonyított, hogy a mikroglia diszfunkciója hozzájárul a gyakori agyi betegségek kialakulásához, mely betegségek hátterében gyakran már a tünetek megjelenése előtt megfigyelhető az agyi véráramlás és a neurovaszkuláris csatolás károsodása. A mikroglia rendkívül aktív sejt az egészséges agyban, a mozgékony mikroglia nyúlványok dinamikusan kölcsönhatásba lépnek a központi idegrendszer sejtjeivel és az agyi erekkel. Gyorsan reagálnak a környezetükben bekövetkező változásokra, amelyeket elsősorban purinerg metabolitok közvetítenek. Az eddigi kutatások jelentős része a mikroglia-neuron kapcsolatok vizsgálatára összpontosított, míg a mikroglia-ér kölcsönhatások funkciójának tanulmányozásával, és ezen belül a mikroglia agyi keringés szabályozásában betöltött szerepével kevésbé foglalkoztak, ezért a mechanizmusok nagyrésze feltáratlan maradt. Kutatómunkánk során felfedeztük, hogy az egészséges agyban az individuális mikroglia sejtek egyszerre több neuronnal és az erekkel is képesek kontaktálni, így ideálisan helyezkednek el ahhoz, hogy érzékeljék és befolyásolják a neurovaszkuláris válaszkokat.

A mikroglia egy új sejtípus az agyi véráramlás modulálásában, mely folyamat komplex purinerg mechanizmusokon keresztül történik. Három különböző kísérleti modell segítségével megmutattuk, hogy a funkcionális mikroglia jelenléte elengedhetetlen a fiziológiai neuronális aktivitásra (neurovaszkuláris csatolás) és a hiperkapniára adott véráramlási válaszkok, valamint az egyoldali arteria carotis communis okklúziót követő hipoperfúzióhoz történő adaptáció megfelelő szabályozásához. Ezek a hatások a mikroglialis P2Y12 receptor jelátviteltől függenek,

ami egyértelműen megkülönbözteti a mikroglialis válaszokat a perivaszkuláris makrofágok vagy más agyi makrofágok által közvetített válaszoktól.

Anatómiai adataink azt mutatják, hogy a mikroglia dinamikus kapcsolatokat alakít ki az agyi érendszer különböző szegmenseivel *in vivo*. Közvetlen purinerg kapcsolatokat hoz létre az egér és humán agyban a neurovaszkuláris egység sejtjeivel, beleértve az endotél sejtet, asztrocitákat, pericitákat és a simaizomsejtet, mely sejtek részt vesznek az agyi véráramlás szabályozásában. A mikroglia ezeken a kapcsolatokon keresztül modulálhatja az agyi véráramlást a neurovaszkuláris csatolás, a hiperkapnia-indukálta vazodilatáció és a hipoperfúzióhoz történő cerebrovaszkuláris adaptáció során. Eredményeink rávilágítottak, hogy a mikroglia képes reagálni a purinerg szignálizációra a neurovaszkuláris egységben és adenoizint és valószínűleg más vazóaktív mediátorokat is termel. Bizonyítottuk, hogy a purinerg metabolitok felszabadulása különböző vaszkuláris ingerekre adott válaszként függ a sejtípustól és az alkalmazott ingerektől is. A mikroglia képes lehet érzékelni az agyi perfúzióval kapcsolatos különböző változásokat a neurovaszkuláris egységben és kompartment-specifikus módon kölcsönhatásba lépni a különböző sejtípusokkal. Továbbá azonosítottuk az iszkémiás stroke hatására felszabaduló IL-1 egyik fő célpontját az agyi erek endotél sejtjeit. Az agyi endotéliális IL-1 korai, robusztus hatást gyakorol az agykérgi perfúzióra akut agysérülést követően. Így a mikroglia-függő hatások és a cerebrovaszkuláris endotéliumra gyakorolt IL-1-hatások kulcsfontosságúak, mert alakíthatják az agyi perfúziót és hozzájárulhatnak a gyulladással járó állapotok kialakulásához, mely állapotok befolyásolhatják olyan cerebrovaszkuláris betegségek kimenetelét, mint például az agykérgi hipoperfúzió vagy a stroke.

Eredményeink azt mutatják, hogy a mikroglia fontos sejtípus az agyi véráramlás fiziológiás és patológiás változásainak modulálásában, működésének megértése elősegítheti az új terápiás lehetőségek kifejlesztését a gyakori neurológiai betegségek kezelésére.

6. Publikációk listája

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Csaszar E., N. Lenart, C. Cserep, Z. Kornyei, R. Fekete, B. Posfai, D. Balazsfi, B. Hangya, A. D. Schwarcz, E. Szabadits, D. Szollosi, K. Szigeti, D. Mathe, B. L. West, K. Sviatko, A. R. Bras, J. C. Mariani, A. Kliewer, Z. Lenkei, L. Hricisak, Z. Benyo, M. Baranyi, B. Sperlagh, A. Menyhart, E. Farkas, and A. Denes. (2022) Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. **Journal of Experimental Medicine**. 219 (3): e20211071. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20211071> IF: 14,03

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 S. M. (2019) Interleukin-1 mediates ischaemic brain injury via distinct actions on endothelial cells and cholinergic neurons. **Brain, Behavior, and Immunity**. 76:126-138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.012> **IF: 7,21**

További publikációk:

Varga D. P., Menyhart A., Posfai B., **Csaszar E.**, Lenart N., Cserep C., Orsolits B., Martinecz B., Szlepek T., Bari F., Farkas E., Denes A. (2020) Microglia alter the threshold of spreading depolarization and related potassium uptake in the mouse brain. **J Cereb Blood Flow Metab**. 40 (1_suppl):S67-S80. doi: 10.1177/0271678X19900097 **IF: 5,68**

Orsini F., Fumagalli S., **Csaszar E.**, Toth K., De Blasio D., Zangari R., Lenart N., Denes A., De Simoni M. G. (2018) Mannose-Binding Lectin Drives Platelet Inflammatory Phenotype and Vascular Damage After Cerebral Ischemia in Mice via IL (Interleukin)-1alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 38 (11):2678-2690. doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311058> **IF: 8,31**

Szalay G., Martinecz B., Lenart N., Kornyei Z., Orsolits B., Judak L., **Csaszar E.**, Fekete R., West B. L., Katona G., Rozsa B., Denes A. (2016) Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. **Nature Commun**. 7:11499. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms11499> **IF: 14,91**