

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Kísérletes- és Megelőző Orvostudományi Doktori Iskola

**A kalcium-homeosztázis farmakológiai
modulációja csökkenti a mikroglia-aktivációt
sejttenyészetben**

PhD Tézis



Pesti István

Témavezetők: Prof. Dr. Farkas Eszter
Prof. Dr. Gulya Károly

Szeged, 2025

Bevezetés

A neuroinflammáció egy összetett gyulladásos válasz a központi idegrendszerben (KIR), amelyet a mikroglia, az agy szervspecifikus makrofág populációja közvetít. A mikroglia aktivációja a krónikus neurodegeneratív betegségek és az akut agysérülések gyakori patológiai jellemzője. Egészséges agyban a mikroglia kulcsfontosságú szerepet játszik a KIR fejlődésében, a homeosztázis fenntartásában, a szinaptikus denzitás meghatározásában, a neuronális plaszticitás modulálásában és a véráramlás szabályozásában. Fiziológias körülmények között a mikroglia kis sejttel és erősen elágazó nyúlványokkal rendelkezik. Fertőzés vagy sérülés hatására a mikroglia nyugalmi állapotból aktivált állapotba kerül. A mikroglia-aktiváció morfológiai, funkcionális és génexpressziós változásokkal jár. A mikroglia a KIR specializált fagocitáló sejttípusa, és kulcsszerepet játszik az elhalt sejtek és káros anyagok érzékelésében és bekebelezésében.

A mikroglia aktivációja elősegítheti a neuroprotekción, de neuronális károsodást is okozhat. Az aktivált mikroglia M1-M2 polarizációs állapota egy spektrumként értelmezhető, részben átfedő köztes állapotokkal. Az M1 gyulladásos fenotípus gyulladáskeltő citokineket termel, ami neuronális sejthalálhoz vezet. Ezzel szemben az M2 mikroglia gyulladáscsökkentő tulajdonságokat mutat, és neuroprotektív funkciót lát el. Az egysejt-szintű RNS-szekvenálás kimutatta, hogy a mikroglia egyszerre fejezi ki az M1 és M2 aktivációs markereket, míg a transzkriptomikai vizsgálatok szélesebb transzkripciós profilt tártak fel.

Az autofágia kulcsfontosságú folyamat a sejtes metabolizmus fenntartásában, hozzájárul a sejt homeosztázisához. Képes lebontani és újrahasznosítani a citoplazmatikus komponenseket stresszhelyzetekben, például iszkémia, hipoxia és oxidatív stressz esetén. Az autofágia a mikroglia funkcióját is befolyásolja. A lipopoliszacharid (LPS) képes aktiválni a PI3K/AKT/mTOR útvonalat a mikrogliaiban, gátolva az autofágiát és fokozva a gyulladásos választ. Az autofágia-inhibitor bafilomicin A1 (Baf) kimutathatóan blokkolja a mikroglia gyulladásos polarizációját.

A sejtben belüli Ca^{2+} -koncentráció kulcsfontosságú a mikroglia immun-effektor állapotának szabályozásában, mivel másodlagos hírvivőként működik a sejtjelátviteli útvonalakban. Aktiváció során a Ca^{2+} -koncentráció gyorsan növekszik, ami befolyásolja a mikroglia fagocitózisát, proliferációját, citokin- és reaktív oxigéngyök-termelését. A Ca^{2+} a sejtmembránban elhelyezkedő ioncsatornákon keresztül áramlik a sejtekbe, amelyek közül jelentős az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák (LVGCC) szerepe. Az endoplazmatikus retikulum (ER) szintén részt vesz a citoplazmatikus kalciumszint szabályozásában, a Ca^{2+} felszabadítása és visszavétele révén a SERCA pumpákon keresztül.

A nimodipin egy dihidropiridin típusú LVGCC blokkoló, amelyet először 1983-ban szintetizáltak. Leginkább klinikai alkalmazásáról ismert, mivel képes megelőzni a késői iszkémiás defícitet a subarachnoidealis vérzés után. A nimodipin a cerebrovaszkuláris simaizomsejteket célozza meg, gátolva a Ca^{2+} beáramlást az LVGCC-n keresztül, csökkentve a Ca^{2+} -függő aktivációt, kontrakciót és növelve az agyi véráramlást. Magas lipofilitása révén átjut a vér-agy gáton, ami potenciális neuroprotektív hatásúvá teszi. Újabb kutatások bizonyítják, hogy a mikroglia is expresszál LVGCC-eket, melyek gátlása csökkentheti a neuroinflammációt. Azonban intakt agyszövetben a nimodipin mikroglián kifejtett közvetlen hatásai nehezen különíthetők el az indirekt hatásoktól, mivel az LVGCC-k számos más agyi sejttypusban, pl. neuronokon, asztrocitákon is jelen vannak.

Az *N,N*-dimetiltriptamin (DMT) egy természetes indol-alkaloid, amelyet dél-amerikai növények tartalmaznak, és pszichedelikus hatásairól ismert, hallucinációkat okozhat. A DMT az Amazonas esőerdőiben élő őslakos törzsek által használt tradicionális Ayahuasca főzet egyik komponense, amelyet spirituális és gyógyító célokra alkalmaznak. A közelmúltban nőtt a DMT mint neuroprotektív szer iránti érdeklődés, elsősorban a neurodegeneratív betegségek és akut iszkémiás agysérülések esetében. Kimutatták, hogy a DMT védi az emberi iPSC-eredetű kortikális neuronokat és mikroglia jellegű sejteket hipoxia ellen, csökkenti az iszkémiás infarktus méretét és gyulladáscsökkentő hatással bír. A DMT nagy affinitással kötődik a szigma-1 receptorokhoz (Sig-1Rs), amit az iszkémiás neuroprotekcio mechanizmusának

tekintenek. A Sig-1R egy intracelluláris receptor, amely megtalálható az agyban, immunsejtekben és egyéb szervekben, elsődlegesen a mitokondriális ATP-szintézist és a Ca^{2+} -szintet szabályozza. Chaperon szerepet tölt be, támogatja a sejtes homeosztázist és energiatermelést. A Sig-1R-k az agyszöveti több sejttypusában előfordulnak, beleértve a neuronokat, asztrocitákat, oligodendrocitákat és a mikroglia. Kimutatták, hogy a Sig-1R aktiváció csökkenti a neuroinflammációt, a gyulladáskeltő citokinek szintézisét, és gátolja az M1 mikroglia polarizációt.

A mikroglia primer monokultúrai vagy neuronokkal, asztrocitákkal vagy oligodendrocitákkal való ko-kultúrai széles körben alkalmazott módszerek a mikroglia patofiziológiájának vizsgálatára. Ezek az eszközök lehetővé teszik a mikroglia funkció reprodukálható, mélyreható és nagy áteresztőképességű elemzését, értékes betekintést nyújtva a mikroglia sejt szintű (kór)élettani folyamataiba. A sejttenyésztési modellek elengedhetetlenek a mikroglia működésének vizsgálatához, mivel szabályozott manipulációt, standardizált kísérleti feltételeket és az eredmények egyértelmű értelmezését teszik lehetővé. A mikroglia tenyészetek felhasználhatók a morfológiai és funkcionális fenotípusok vizsgálatára, valamint fehérje- vagy génexpressziós profilok meghatározására. Azonban a rácsálók primer mikroglia tenyészetek korlátai közé tartozik a genetikai diverzitás hiánya az intenzív beltenyésztés és steril tartási körülmények miatt, valamint a más sejttypusokkal való interakció lehetősége. A problémát egyrészt emberi eredetű mikroglia tenyészetek segíthetnek áthidalni, másrészt a mikroglia neuronokkal, asztrocitákkal és oligodendrocitákkal való ko-kultúrája elősegítheti a más sejtekkel történő interakció vizsgálatát.

Kutatásain során célul tűztük ki a mikroglia-aktiváció farmakológiai modulációját, és a farmakológiai hatás sejt szintű mechanizmusainak azonosítását:

1. Elemezni kívántuk a nimodipin hatását az aktivált mikroglia morfológiai és funkcionális fenotípusaira, valamint transzkriptomikai profiljára. Feltételeztük, hogy a nimodipin kezelés gátolja a mikroglia aktivációját a Ca^{2+} -homeosztázison

keresztül, illetve az ezzel összefüggő génexpressziós változásokra gyakorolt hatása révén.

2. Célunk volt jellemezni a DMT hatását a mikroglia-aktivációjára, valamint a mikroglia proteomjában bekövetkező változásokra. A DMT kezeléstől gyulladáscsökkentő hatást vártunk, amit a fehérjeexpressziós mintázat változása támaszt alá.
3. Az antibiotikum bafilomicin hatásának vizsgálatát tűztük ki célul az aktivált mikroglia autofágiájára. Feltételeztük, hogy a bafilomicin csökkenti a mikroglia autofágiás aktivitását.

Anyagok és módszerek

Primer mikrogliasejt-tenyészetek fenntartása és kezelése

A tenyészetet újszülött Sprague-Dawley patkányok agykérgéből készítettük. Kísérletünk során ko-kultúrát, valamint mikroglia monokultúrát alkalmaztunk. A tiszta mikroglia-tenyészetet a letapadt sejtek rázatásával állítottuk elő. A hatodik napon a Petri csészékbe vagy fedőlemezekre szétterített sejteket LPS-sel (20 ng/ml) aktiváltuk. Az első kísérletsorozatban a tenyészeteket csak nimodipinnel (5–10–20 μ M), vagy LPS és nimodipin kombinációjával kezeltük 24 órán keresztül. A második kísérletsorozatban a tenyészeteket csak DMT-vel (Sig-1R agonista; 5–10–20–50 μ M), vagy LPS és DMT kombinációjával kezeltük 24 órán keresztül. A harmadik kísérletsorozatban a mikroglia-tenyészeteket 3 órán át Baf A1-gyel (50 nM) előkezeltük, majd 24 órán keresztül LPS-sel aktiváltuk.

A mikroglia aktiváltsági állapotát Iba1 immunjelöléssel értékeltük. A nyúlványozottság mértékét transzformációs index (TI) számításával határoztuk meg, a sejtek kerülete és területe alapján. Az Iba1 fehérjeszintet Western blot analízissel kvantifikáltuk, a fagocitikus aktivitást pedig fluoreszcens mikrogyöngyökkel tettük láthatóvá. A sejtenyésző médium TNF- α citokin koncentrációját ELISA-val mértük. A kísérlet végén összegyűjtött sejtekből RNS-t izoláltunk RNS szekvenálásra (RNA-seq) a nimodipin kezelésre eltérően expresszálódó gének (DEG-k) meghatározására.

A DMT kezeléssel végzett kísérletek végén a sejtekből fehérjét izoláltunk tömegspektrometriás proteomikai analízisre.

Immunhisztokémia

Immunfestéseket primer ko-tenyészeteken (DIV7) és mikroglia monokultúrákon (subDIV7) végeztünk, polil-L-lizin bevonatú fedőlemezeken. A sejteket 4%-os formaldehiddel fixáltuk, majd a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk. Ezután a sejteket primer antitestekkel (Iba1, p62), majd Alexa Fluor festékkel konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Végül fluoreszcens mikroszkópos felvételeket készítettünk transzformációs index számítására és a jelölések ko-lokalizálására.

Western blot analízis

A primer ko-tenyészetekből és mikroglia monokultúrákból származó sejteket homogenizáltuk és centrifugáltuk. Meghatároztuk a fehérjekoncentrációt a kvantitatív immunreakciós analízishez. Öt-tíz µg fehérjét SDS-poliakrilamid gélben futtattunk, Hybond-ECL nitrocellulóz membránra transzferáltuk, blokkoltuk, majd primer antitestekkel (Iba1 és GAPDH) inkubáltuk. Ezután a membránokat másodlagos antitestekkel inkubáltuk, végül az immunreaktív sávokat kemilumineszcencia alapján detektáltuk.

In vitro fagocitózis vizsgálat

A mikroglia sejtek folyadékfázisú fagocitikus aktivitását fluoreszcens mikrogöngyöök hozzáadásával állapítottuk meg. A sejteket 37°C-on 60 percig inkubáltuk mikrogöngyökkel, majd mostuk, fixáltuk és Iba1, valamint DAPI immunfestéssel jelöltük.

Enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (ELISA)

A vizsgálat az interleukin-10 (IL-10) és a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) koncentrációját elemezte primer ko-tenyészetek és mikroglia monokultúrák felülúszóiban ELISA módszerrel. Az IL-10 és a TNF- α esetében is <8%-os belső variációs egyúttarót kaptunk, ami jó mérési precizitásra utal, és alátámasztja az ELISA eredmények megbízhatóságát.

RNS szekvenálás („next generation sequencing”, NGS) és NEB mRNS-könyvtár készítés

A vizsgálat nimodipinnel kezelt mikroglia monokultúrák génexpressziós analizisére fókuszált. Az RNS izolálást követően az RNS mennyiségi meghatározásához Qubit 3.0 Fluorométer-t használtunk. A NGS-könyvtárat az NEBNext Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina készlettel készítettük el. Az NGS-hez NovaSeq X Plus szekvenálórendszert használtunk. A minőségellenőrzést D5000 ScreenTape technológiával végeztük.

LC-MS/MS analízis

A mintákat a Strap mikroprotokoll szerint tripszinnel emésztettük, TEAB-ben újra oldottuk, TCEP-pel redukáltuk, és MMTS-sel alkileztük. A peptidkeverékek 10%-át LC-MS analízis céljából C18 EvoTips-re töltöttük. A reverz fázisú elválasztást Evosep One HPLC oszloppal, majd az adatfüggő MS/MS mérést Orbitrap Fusion Lumos Tribrid tömegspektrométerrel végeztük. Az adatgyűjtés kompenzációs feszültséggel és nagy felbontással történt.

Eredmények

A nimodipin csökkenti a mikroglia aktivációját

A mikroglia sejtek morfológiai fenotípusa jól jellemzi a mikroglia aktivációt. A mikroglia sejtek nyugalmi állapotban nyúlványozott fenotípussal rendelkeznek, aktivációkor lekerekednek, amöboid alakot öltenek. LPS-sel történő aktiváció után a mikroglia sejtek transzformációs indexe (TI) jelentősen csökken, ami aktivált amöboid fenotípusra utal. Nimodipin hozzáadása LPS-sel nem aktivált, kontroll tenyészetekhez nem növelte a TI-t szignifikáns mértékben. A nimodipin LPS-aktivált ko- és monokultúrákban növelte a TI-t, ami arra utal, hogy a nimodipin a mikroglia-aktivációt gátolta.

A kontroll, nem aktivált ko- és monokultúrákban a mikroglia sejtek fagocitózisa alacsony szintű volt, kevés mikrogyöngyöt kebeleztek be. A nimodipin önmagában

nem befolyásolta a fagocitózis mértékét. Az LPS aktiváció egyértelműen fokozta a fagocitózist, a nimodipin egyidejű adagolása ezt teljes mértékben kivédte.

Az Iba1 expressziója a mikroglia aktivációját jelzi. Az LPS-sel aktivált sejtekben, közös monokultúrákban is jelentősen fokozódott az Iba1 expresszió. Nem aktivált, kontroll kultúrákban a nimodipin nem befolyásolta az Iba1 szintjét. Ugyanakkor az LPS-aktivált kultúrákhoz adott nimodipin szignifikánsan csökkentette az Iba1 fehérjeszintet.

Kísérleteinkben felmértük a nimodipin hatását a TNF- α proinflammatorikus és IL-10 gyulladáscsökkentő citokinek termelésére is. Eredményeink szerint az itt használt, relatív alacsony LPS koncentráció (20 ng/ml) nem befolyásolta az IL-10 szintjét egyik kultúrában sem. A nimodipin nem változtatta meg szignifikánsan az IL-10 szintjét, függetlenül az aktiváltsági állapottól. Azonban 20 μ M nimodipin LPS-aktivált monokultúrákban kontroll szintre csökkentette a TNF- α koncentrációt. A nimodipin hozzáadása az LPS-aktivált monokultúrákban koncentráció-függő módon a TNF- α szint fokozatos csökkenését eredményezte, de a hatás nem érte el a statisztikai szignifikanciát.

A mikroglia monokultúrákban végzett NGS RNS szekvenálás 13 866 gént azonosított, amelyek közül 9720 expressziója módosult az LPS aktiváció vagy nimodipin kezelés hatására. Az LPS fokozta a TRPM (transient receptor potential melastatin) csatorna és a purinerg receptor expresszióját, ami a Ca²⁺ citoplazmába áramlásának fokozódását jelzi. Ezzel szemben az LPS csökkentette a VGCC-t kódoló gén expresszióját, ami kompenzatórikus mechanizmust jelezhet. Az LPS csökkentette a Ryr és az IP3 receptorok expresszióját, valamint növelte a SERCA kalciumpumpa transzkripcióját.

A nimodipin 110 gén expresszióját változtatta meg az LPS-hez képest. Az eltérő expressziójú gének közül 29 upregulálódott, míg 81 downregulálódott. Figyelemre méltó, hogy a nimodipin ellentétes hatásokat fejtett ki az LPS-hez képest. A 110 gén szűrése során kiderült, hogy ezek közül legalább 20 kapcsolatban állt a mikroglia immunválaszával, 7 a sejtek adhéziójával, 2 pedig az autofágia szabályozásával, továbbá 4 gén az intracelluláris Ca²⁺ homeosztázisban játszott szerepet.

A DMT modulálja a mikroglia aktivációját

A DMT önmagában, minden vizsgált koncentrációban tendenciózan növelte a mikroglia sejtek nyúlványozott fenotípusát, amit a transzformációs index növekedése mutatott. Az LPS-kezeléssel járó alacsony TI-értékeket a 20 és 50 μ M DMT-kezelések szignifikánsan növelték, a DMT mikroglia-aktivációt ellensúlyozó hatását jelezve.

Az LPS-kezelés növelte a fagocitáló sejtek arányát, miközben a nem fagocitáló sejteké azonos mértékben csökkent. Az LPS és a DMT együttes alkalmazásakor, elsősorban 20 és 50 μ M DMT koncentrációk mellett a fagocitáló sejtek aránya a kontroll szintre csökkent.

Az Iba1 fehérje koncentrációjára az LPS aktivációra válaszul emelkedett, melyet a DMT-kezelés tovább fokozott. Ez a további emelkedés az Iba1 koncentrációban csak a kontrollhoz képest volt statisztikailag jelentős, az LPS aktivációhoz képest nem.

Proteomikai vizsgálataink során összesen 2793 fehérjét azonosítottunk, amelyek közül 244 expressziója mutatott változást. Az LPS aktiváció 111 fehérje kifejeződését upregulálta, 33 fehérjét downregulálta a kontrollhoz képest. DMT LPS-aktivált kultúrához való hozzáadása az upregulált fehérjék mennyiségét részlegesen ellensúlyozta, 21 fehérje kifejeződését upregulálta és 84 fehérje expresszióját downregulálta. Nyolc olyan fehérjét azonosítottunk, melyek expressziója LPS hatására nőtt, és a DMT ezt egyértelműen ellensúlyozta; ezek közül kettő összefüggésbe hozható az aktivált mikroglia gyulladásos működésével. Továbbá tizenkét olyan, többnyire enzim fehérjét találtunk, amelyek expressziója az LPS aktivációra válaszul csökkent, és a DMT ezt a csökkenést visszafordította.

Autofágia gátlása Baf jelenlétében

Az autofágia szabályozása kulcsfontosságú a mikroglia működése szempontjából, és a p62/SQSTM1 fehérje szerepet játszik ebben a szabályozásban. Az LPS-kezelés nem befolyásolta jelentősen a mikroglia sejtek számát, azonban a Baf előkezelés jelentős csökkenést eredményezett a mikroglia proliferációjában. Western blot vizsgálat kimutatta, hogy az LPS-kezelés enyhe növekedést eredményezett a p62 fehérje mennyiségében, míg a bafilomicin előkezelés nem változtatta meg a p62 szintjét. A p62/SQSTM1 immunreaktivitásának eloszlása egyenletes volt a citoplazmában, a

p62/SQSTM1-gyel jelölt autofagoszómák pedig elsősorban pontszerű eloszlásban, a perinukleáris citoplazmában lokalizálódtak. Hasonló számú p62/SQSTM1-pozitív autofagoszóma volt megfigyelhető az LPS-sel kezelt tenyészetekben, függetlenül attól, hogy Baf jelen volt-e vagy sem.

Megbeszélés

A primer mikroglia-tenyészetek alkalmasak a mikroglia-aktivitás farmakológiai modulációjának vizsgálatára

Vizsgálataink az aktivált mikroglia morfológiai, funkcionális, génexpressziós és proteomikai jellemzőire fókuszáltak újszülött patkányokból származó ko- és monokultúrákban, nimodipin vagy DMT kezelést követően. Az aktivált mikroglia-tenyészetek kulcsfontosságúak a neuroinflammáció elleni hatóanyagok tesztelésében, mivel lehetővé teszik a hatóanyagok direkt, a mikrogliasejteken kifejtett hatásának értékelését, monokultúrák esetén más agyszöveti elemekkel történő interakciótól elkülönítve.

Általánosságban elmondható, hogy mikroglia-tenyészetekben az aktivációs állapot fehérjedetektlálással vagy génexpressziós profilozással (pl. egyféhéjés ELISA, multiplex ELISA, tömegspektrometria, Western blot, vagy RNS-szekvenálás) jól azonosítható. Aktiváció során a mikrogliasejtek képesek pro- és anti-inflammatorikus szerepet betölteni, polarizációjuk a neurotoxikus (M1) és neuroprotektív (M2) állapot között folyamatos spektrumon mozog a sérülésre adott válasz szerint.

A mikroglia aktivációját a kalcium-homeosztázis változásai jellemzik, amelyek célpontként szolgálnak a neuroinflammáció csökkentésére. Korábbi kutatások a mikroglia intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjának emelkedését összefüggésbe hozták az immun effektor funkcióval. Kísérleteink során a mikroglia Ca^{2+} -homeosztázisát céloztuk meg, egyrészt a sejthártyán keresztüli Ca^{2+} -beáramlás gátlásával, nimodipin segítségével, valamint a sejten belüli Sig-1R receptorok aktivációjával DMT-vel. Ezek a megközelítések a génexpresszió vagy a fehérjék kifejeződésének modulálásán keresztül gátolták a mikroglia-aktivációt, befolyásolva a morfológiai és funkcionális

fenotípusokat. Kutatásaink hangsúlyozzák a Ca^{2+} -homeosztázis fontosságát az immunválasz szabályozásában.

Eredményeink rávilágítottak mindkét hatóanyag komplex jótékony hatásaira, és kiváló jelöltekként azonosították őket preventív neuroinflammációs terápiára gyulladáscsökkentő tulajdonságaik miatt.

A nimodipin alkalmazásának előnyei a neuroinflammáció kezelésében

A mikroglia aktivációjának kutatásában az LPS az egyik leggyakrabban használt aktivátor. Eredményeink is igazolták, hogy LPS hatására a mikroglia morfológiai és funkcionális fenotípusa az aktivált állapotra jellemző. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a mikroglia Ca^{2+} -homeosztázisának módosítása LVGCC blokkolással képes-e gátolni a mikroglia aktivációját. Eredményeink alapján valószínű, hogy az aktivációt jellemző Ca^{2+} -koncentráció-emelkedés a P2X4 purinerg receptorokon és TRPM2 csatornákon keresztül valósul meg. Az ER-ből történő Ca^{2+} felszabadulást közvetítő rianodin- és IP3-receptor gének megfigyelt downregulációja, valamint az ER-en található SERCA pumpa gének magasabb expressziója arra utalhat, hogy a magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció az ER szintjén kompenzációs mechanizmusokat indít el.

Nimodipinnel folytatott vizsgálataink szerint továbbá a mikroglia aktivációja során bekövetkező Ca^{2+} -felhalmozódásban az LVGCC-k fontos szerephez jutnak. A nimodipin következetesen gátolta a mikroglia aktivált fenotípusváltását, ami arra utal, hogy a kezelés megbízhatóan célozta a mikrogliát. Génexpressziós vizsgálataink alapján azt feltételezzük, hogy az LVGCC gátlása az intracelluláris Ca^{2+} -jelátvitel módosításán keresztül génexpressziós változásokat idéz elő. Jól ismert, hogy a Ca^{2+} másodlagos hírvívő szerepet tölt be a génexpresszió szabályozásában, ami feltételezésünk szerint a nimodipin gyulladáscsökkentő hatása mögötti molekuláris mechanizmusként azonosítható.

Irodalmi adatok felvetik a lehetőséget, hogy a nimodipin az LVGCC-n túl alternatív célpontok működését is befolyásolhatja, például a Kv1.3 feszültségfüggő káliumcsatornákat, a mineralokortikoid receptorokat és a CFTR kloridcsatornákat, amelyek szintén hozzájárulhatnak gyulladáscsökkentő hatásához.

A DMT terápiás potenciálja a neuroinflammáció kezelésében

A DMT, egy pszichedelikus tulajdonságairól ismert vegyület, bizonyítottan rendelkezik neuroprotektív hatásokkal, mely felel a potenciális terápiás alkalmazások lehetőségét. Az endogén eredetű DMT szerepet játszik a központi idegrendszerben, különösen a sejtszintű stresszválaszokban. A DMT neuroprotektív, csökkenti a gyulladást, és elősegíti a neuroplaszticitást például az agyi eredetű neurotróf faktor (BDNF) szintjének növelése révén. A Sig-1R receptorok – amelyek intracelluláris chaperonok és receptorok az ER membránján – szabályozzák a mitokondriális Ca^{2+} -egyensúlyt, támogatják az ATP szintézist, és gátolják a reaktív oxigéngyökök (ROS) termelését, ezzel elősegítve a sejtek túlélését stresszhelyzetekben.

Kísérletes agyi iszkémiában a DMT neuroprotektív hatásának bizonyult, csökkentette az agyi infarktus méretét, javította a motoros funkciókat, és gátolta a gyulladásos citokinek transzkripcióját az agyban. *In vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy a DMT célpontját, a Sig-1R-t a mikroglia nagy mértékben expresszálja.

Kutatásaink bizonyították, hogy mikroglia-tenyészetekben a DMT-kezelés morfológiai és funkcionális változásokat idéz elő. Aktivált mikroglia-tenyészetekhez 20 és 50 μM koncentrációban adagolva a DMT a nyugalmi állapotra jellemző nyúlványozottabb sejtmorfológiát eredményezett, és csökkentette a fagocitáló sejtek arányát a tenyészetben. A proteomikai elemzés jelentős fehérjeszint-változásokat tárt fel: a DMT több esetben ellensúlyozta az LPS által indukált specifikus proinflammatorikus fehérjék expresszióját.

A mikroglia-aktiváció gátlása, amelyet kísérleteink során megfigyeltünk, összhangban áll más kutatásokból származó korábbi eredményekkel, melyek szerint a DMT védő hatású volt hipoxiának kitett monocita-eredetű makrofágok tenyészetében. A fokális agyi iszkémia rágszálómodelljében továbbá a Sig-1R receptor aktiválása DMT-vel gátolta a gyulladásos citokinek – köztük a $\text{TNF-}\alpha$ – mRNS-ének transzkripcióját, így gyulladáscsökkentő (anti-neuroinflammatorikus) hatást figyeltek meg. Ezek a megfigyelések hasznosulhatnak a gyógyszerfejlesztésben olyan KIR kórképek esetén, ahol a neuroinflammáció rontja

a gyulladás esélyeit. A DMT a közelmúltban a gyógyszeripar figyelmét is felkeltette: a kanadai Algernon Pharmaceuticals sikeresen zárta a klinikai I-es fázist.

A mikroglia autofágijának gátlása együtt jár a p62/SQSTM1 fehérje szintjének növekedésével

Az autofágira koncentrált kísérleteink az autofágia szabályozásának szerepét vizsgálták a mikrogliafunkcióra, különös tekintettel a p62/SQSTM1 fehérjére. Az autofágia és a mikroglia sejtek alapvető fontosságúak a sejt homeosztázis fenntartásában és a központi idegrendszer erős stresszhatásokra adott válaszában. Az autofágia elősegíti a sérült sejt komponensek lebontását és újrahasznosítását, különösen kóros állapotok – például iszkémia és hipoxia – esetén. A gyulladás szorosan összefügg az autofágiával és a gyulladásos folyamatokkal, melyek szabályozásában kulcsszerepet játszanak olyan molekulák, mint a p62/SQSTM1.

Rávilágítottunk a p62/SQSTM1 összetett szerepére az autofágia szabályozásában a mikroglia működése során, különösen az LPS által indukált gyulladásos állapotokban. A bafilomicinnel végzett előkezelés hatására bekövetkező jelentős csökkenés a mikroglia proliferációban felveti az autofágia és a gyulladás közötti bonyolult kölcsönhatásokat. Az LPS-re adott válaszként megfigyelt p62-szintnövekedés, valamint a bafilomicin előkezelés melletti stabil p62-koncentráció arra utal, hogy a p62 gyulladásos állapotokban betöltött szerepe árnyalt és további vizsgálatokat igényel.

További bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a bafilomicin képes modulálni az autofágiás folyamatokat, és hatással lehet a sejtválaszokra, valamint az autofágiához kapcsolódó jelátviteli útvonalakra. Az ionhomeosztázis és a jelátviteli utak – különösen a TLR4 és az LVGCC csatornák – közötti kölcsönhatás kiemeli a mikroglia szabályozó szerepét a sérüléseket követő gyulladásos válaszokban. A mikroglia árnyalt viselkedésének és modulációjának megértése ígéretes terápiás lehetőséget kínál a központi idegrendszeri betegségek kezelésében, különösen az iszkémiás stroke utáni válaszreakciók optimalizálásában.

Fő megállapítások

1. Megmutattuk, hogy a nimodipin, ami egy L-típusú feszültségfüggő kalciumcsatorna blokkoló és vaszkuláris simaizom relaxáns, csökkenti a mikroglia aktivációját. A gyulladáscsökkentő hatás hátterében génexpressziós változásokat azonosítottunk. Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a nimodipinnek terápiás szerepe lehet az agysérülések és neurodegeneratív betegségek során fellépő neuroinflammáció csökkentésében.
2. Bizonyítottuk, hogy a szigma 1 receptor agonista DMT csökkenti a mikroglia aktivációját. A proteomikai elemzés alapján megállapítottuk, hogy a DMT mérsékelte az LPS által indukált pro-inflammatorikus fehérjék, például az iNOS és a PLA2 expressziójának növekedését.
3. Eredményeink igazolják, hogy az autofágia kulcsszerepet játszik a mikroglia gyulladásos válaszában szabályozásában. Az LPS és Bafilomycin A1 együttes hatására az autofágia gátlódott, amit a p62/SQSTM1 szint emelkedése jelzett. Ez arra utal, hogy az autofágia zavara hozzájárulhat a gyulladás fennmaradásához. Felfedeztük, hogy az autofágia nemcsak a sejt túlélését támogatja, hanem aktívan részt vesz a mikroglia működésének és a sérülést követő ionháztartási és jelátviteli folyamatok szabályozásában is.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni őszinte hálámat Prof. Dr. Gulya Károlynak, amiért lehetőséget adott arra, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak, és hitt bennem.

Köszönet illeti kutatócsoport jelenlegi és korábbi kollégáimat a segítségükért és támogatásukért: Dr. Törteli Anna, Dr. Tóth Réka, Dr. Bálint Armand Rafael, Dr. V. Kecskés Szilvia, Dr. Szarvas Péter Archibald, Dr. Frank Rita és Dr. Menyhárt Ákos. Külön köszönet illeti Dr. Kata Dianát, aki mindig mellettem állt és segített.

Hálás vagyok a barátaimnak a támogatásukért, még ha többnyire nem is értik, miről beszélek, és pontosan mivel is foglalkozom. Szavakkal leírhatatlan, mennyire hálás vagyok a családomnak, amiért a nehéz időkben is inspiráló gondolatokkal segítettek, hittek bennem, és rendkívül türelmesek voltak.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Farkas Eszternek, hogy lehetőséget adott arra, hogy PhD-hallgatóként csatlakozhassak kutatócsoportjához. Lelkesedése, víziója, elkötelezettsége, ötletei és tudomány iránti alázata példát mutatott számomra a jó tudományos gyakorlatban. El sem tudnék képzelni nála jobb témavezetőt.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Pesti I, Légrádi Á, Farkas E., *Primary microglia cell cultures in translational research: Strengths and limitations*. **Journal of Biotechnology**, 2024 May 10;386:10-18. doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.03.005. Epub 2024 Mar 20. PMID: 38519034. **IF: 4.1**
- Pesti I, Barczánfalvi G, Dulka K, Kata D, Farkas E, Gulya K., *Bafilomycin 1A Affects p62/SQSTM1 Autophagy Marker Protein Level and Autophagosome Puncta Formation Oppositely under Various Inflammatory Conditions in Cultured Rat Microglial Cells*. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024 Jul 29;25(15):8265. doi: 10.3390/ijms25158265. PMID: 39125836; PMCID: PMC11311604. **IF: 4.9**
- Pesti I, Varga V, Qorri E, Frank R, Kata D, Vinga K, Szarvas PA, Menyhárt Á, Gulya K, Bari F, Farkas E., *Nimodipine reduces microglial activation in vitro as evidenced by morphological phenotype, phagocytic activity and high-throughput RNA sequencing*. **British Journal of Pharmacology**, 2025, in press, doi: 10.1111/bph.70060 (BioRxiv: doi: 10.1101/2024.11.11.623031) **IF: 6.8**