

37. OTDK Biológia Szekció

A DMT hatásának vizsgálata kortikális mikroglia tenyészeteken

Vinga Krisztián
Biológus MSc, I. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem
Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék

Témavezetők:
Prof. Dr. Farkas Eszter, tanszékvezető egyetemi tanár
Pesti István, PhD hallgató

Szeged
2024

Tartalmi összefoglaló

Akut agysérülések, mint például iszkémiás stroke során a mikroglia aktiváció egy korai válaszejelenség, amely beindítja a neuroinflammációt. A mikroglia aktiváció hátterében az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szint hirtelen, nagy mértékű megemelkedése áll. Ebben a sejt felszíni NMDA receptorok és a feszültség függő Ca^{2+} csatornák (VGCC) játszanak szerepet, amelyet a szigma-1 receptor (Sig-1R) modulál. A dimetiltriptamin (N,N-dimetiltriptamin, DMT) a Sig-1R agonistája. Célul tűztük ki a DMT hatásának felmérését a mikroglia aktivációra.

Kísérleteinket újszülött Sprague Dawley patkányok cortex régiójából készített tiszta mikroglia sejt kultúrákon végeztük. A tenyészetekben a sejteket lipopoliszachariddal (LPS) aktiváltuk. Az aktiválatlan, nyugalmi állapotot tekintettük kontrollnak. A tenyésztés 6. napján 5, 10, 20 és 50 μM -os DMT-t tartalmazó médiumot mostunk a sejtekre. 24 óra elteltével fluoreszcensen megfestettük a sejteket, majd az Iba1 pozitív sejtek arborizációját transzformációs index-szel (TI) jellemeztük, valamint western blot analízist végeztünk az Iba-1 koncentráció változás mérésére, a fluoreszcens mikroglyöngyökkel a fagocitotikus aktivitás nyomon követését végeztük, valamint proteomikai vizsgálatokat folytattunk. A kezelések során a jelen lévő fehérjék nyomon követésére proteomikai vizsgálatokat alkalmaztunk.

A kontroll, nyugalmi állapotban ramifikált sejtek LPS hatására aktivált, amöboid alakot vettek fel (TI: $2,08 \pm 0,48$ vs. $3,62 \pm 1,4$ LPS vs. kontroll). A mikroglia-aktivációt a DMT csökkentette (TI: $9,14 \pm 5,17$ LPS+20 μM DMT). A Western blot analízis LPS aktivációra az Iba1 jelintenzitás erősödését mutatta (integrált optikai denzitás, IOD: $121,08 \pm 63,31$ vs. 100 ± 0 , LPS vs. kontroll), amelyet a DMT kezelés tovább erősített (IOD: $212,64 \pm 201,37$, LPS+20 μM DMT). A fagocitáló mikroglia arányát a tenyészetben az LPS hozzáadása fokozta (65 vs. 48 %, LPS vs. kontroll), amit a DMT kezelés ellensúlyozott (25 vs. 65 %, LPS+20 μM DMT vs. LPS). Proteomikai vizsgálat során összesen 2793 fehérjét azonosítottunk, amelyek közül 20 mennyisége minden páros csoport-összehasonlításban szignifikáns változást mutatott. Az indukálható nitrogén-monoxid szintáz és a foszfolipáz kiemelkedett azzal, hogy LPS hatására upregulálódtak, amit a DMT kivédett. Ugyanakkor a foszfolipáz D3 (PLD3) 5'-3' exonukleáz és az NMB transzmembrán glikoprotein LPS hatására downregulálódott, amit a DMT visszafordított.

A DMT hatékonyan csökkentette a mikroglia-aktivációt. Feltételezzük, hogy a DMT az endoplazmatikus retikulum (ER) stresszválaszát és a mikroglia Ca^{2+} homeosztázisát módosítva fejtette ki védő hatását, hiszen a Sig-1R az ER mitokondriummal asszociált membránszakaszon fejeződik ki, és az ER és a mitokondrium közti Ca^{2+} transzportot szabályozza.

Kulcsszavak:

lipopoliszacharid, mikroglia, neuroinflammáció, N,N-dimetiltriptamin, primer sejt kultúra, proteomika

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések	5
2. Bevezetés	6
3. Célkitűzés	10
4. Kísérleti módszerek	10
4.1. Felhasznált anyagok.....	10
4.2. Antitestek.....	11
4.3. Mikroglia sejttenyészet készítése	11
4.4. Mikroglia sejttenyészet kezelése	12
4.5. Immunocitokémia	13
4.6. Transzformációs index	14
4.7. Western blot.....	14
4.8. Fagocitózis – szintetikus mikrogyöngyök	14
4.9. Proteomika.....	15
5.Eredmények.....	15
5.1. Transzformációs index	15
5.2. Western blot.....	16
5.3. Fagocitózis – szintetikus mikrogyöngyök	17
5.4. Proteomika.....	19
6. Megbeszélés, összegzés	21
7. Irodalomjegyék	25
8. Köszönetnyilvánítás.....	31

1. Rövidítések

APC: antigén prezentáló sejt

BSA: szarvasmarha szérum albumin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenil-indol

DAMP: károsodás-asszociált molekuláris mintázat

DMEM: Dulbecco által módosított Eagle médium

DMT: N,N-dimetiltriptamin

ER: endoplazmás retikulum

FBS: magzati borjú szérum

IL-1 β : interleukin-1béta

IP3R: inozitol-trifoszfát receptor

LC-MS/MS: folyékony kromatográfiai tömegspektrometria

LPS: lipopoliszacharid

MAM: mitokondrium asszociált membrán

MAO: monoamin-oxidáz

MAOI: monoamin-oxidáz inhibitor

MD-2: mieloid differenciált protein-2

MMTS: S-metil metán-etio-szulfonát

NMB: neuromedin B

NMDA R: N-metil-D-aszpartát receptor

PAMP: patogén-asszociált molekuláris mintázat

PBS: foszfát puffer

PLD3: foszfolipáz D3

PRR: mintázat felismerő receptor

ROS: reaktív oxigén gyök

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

Sig-1R: szigma-1 receptor

TCEP: Tris-(2-karboxietil)-foszfin

TEAB: tetraetilammónium-bromid

TI: transzformációs index

TLR: toll-like receptor

TNF- α : tumor nekrosis faktor-alfa

VGCC: feszültség függő Ca²⁺ csatorna

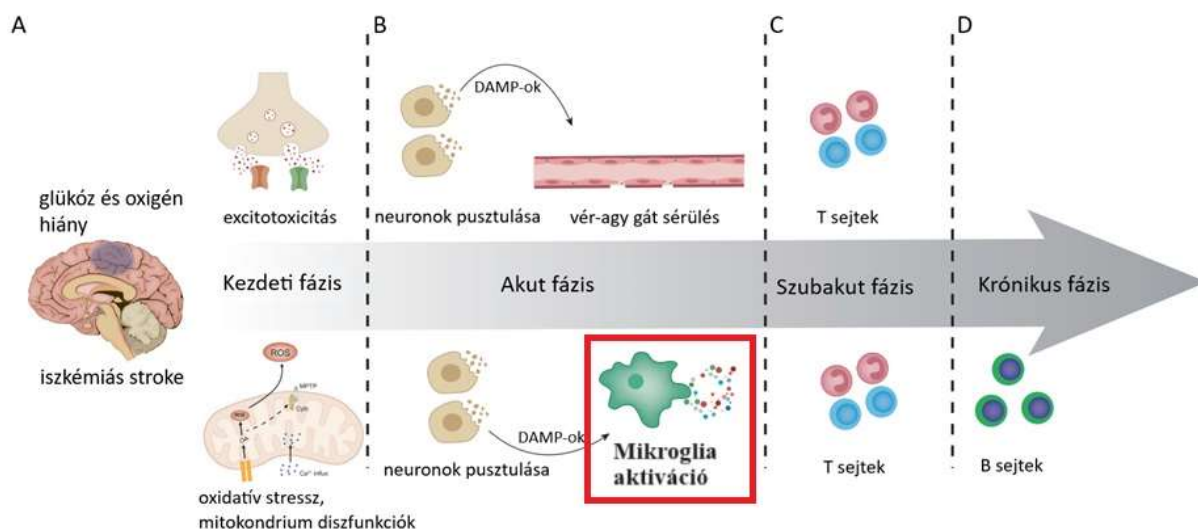
2. Bevezetés

A mikroglia a központi idegrendszer rezidens makrofágjai, amelyek az agy sejtömegének 10-15%-át teszik ki. Az egyedfejlődésben, az idegsejtek működésének finomhangolásában és a homeosztázis fenntartásában betöltött élettani szerepük mellett a mikroglia az agy immunvédelmében is kulcsfontosságú. Az agysérülések, így a stroke neuroinflammációval járnak, amelynek központi eleme a mikroglia aktivációja.

Napjainkban az elhalálozások okainak második helyét a stroke foglalja el. 2019-ben 12,2 millió embert érintett stroke, akik közül 6,55 millióan hunytak el (GBD 2019 Stroke Collaborators, 2021). A stroke-nak két fajtája van, az egyik a vérzéses stroke, amely magába foglalja az intracerebrális és a subarachnoideális vérzést. Ilyenkor az agyban található erek fala sérül és a vér a szöveti térbe áramlik. A másik típus az iszkémiás stroke, amelyet az agy, a gerincvelő vagy a retina infarktusaként definiálnak, amely során egy érelzáródás történik (Campbell et al., 2019). 2019-ben az összes stroke miatti elhalálozás 62,4%-ért az iszkémiás stroke, 27,9%-ért az intracerebrális vérzés és 9,7%-ért a subarachnoideális vérzés volt felelős (GBD 2019 Stroke Collaborators, 2021).

Az iszkémiás stroke során egy agyi ér elzáródik. Ennek következtében egy korai sejtpusztulás történik, amit infarktusnak nevezünk. Ezt a területet más néven mag régióknak is nevezzük. A penumbra régió a mag régiót veszi körül, ahol a sejtek ugyan életképesek, de sérülésnek vannak kitéve. Amennyiben a keringés nem áll vissza időben, a penumbra régióban is elhalnak a sejtek, így a mag régió kiterjedéséhez vezet (Appireddy et al., 2015).

Az érelzáródás következtében az érintett agyterületen csökken a vérellátottság, aminek következtében a sejtek nem jutnak megfelelő mennyiségű glükózhhoz és oxigénhez, azaz hipoxiás állapotba kerülnek. A neuronok homeosztázisa ennek következtében felborul, ugyanis glükóz hiányában az ATP mennyisége is lecsökken. ATP hiányában a neuronok nem képesek a transzmembrán gradiensüket fenntartani, ami depolarizációhoz vezet. Ennek következtében nagy mennyiségű neurotransmitter ürül, elsősorban glutamát, amely excitotoxicitáshoz vezet. Emiatt számos további sejtkárosító anyag felszabadulását fogja okozni, mint például a reaktív oxigén gyök (ROS). A ROS következtében az endothél sejtek apoptotizálnak, ami miatt a vér-agy gát sérül. A vér-agy gát sérülése miatt pedig további agykárosodások lépnek fel (1. ábra) (Kaplan-Arabaci et al., 2022).



1. ábra. Az iszkémiás stroke időbeni változása során történő folyamatok. A: kezdeti fázis: glükóz és oxigén hiány, excitotoxicitás, oxidatív stressz. B: akut fázis: mikroglia aktiváció, vér-agy gát sérülése. C: szubakut fázis: T-sejtek D: krónikus fázis: B-sejtek

A mikroglia sejtek az agy rezidens makrofágjai, amelyek a többi glia sejtől, pl.: asztrocitától, oligodendrocitától eltérően nem a neuroektodermából erednek, hanem a mezodermából származtathatóak (Hanani et al., 2021).

A mikroglia sejtek feladatai közé tartozik többek között az agy homeosztázisának monitorozása és a bekövetkezett változásokra való megfelelő válaszadás, illetve nagyobb sérülések esetén a mikroglia aktivációval válaszol.

A morfológiájukhoz igazodik a mikroglia sejtek funkciója. Nyugalmi állapotban ramifikáltak, szómájuk kicsi, amelyből tüskés elágazódású nyúlványokkal monitorozzák a környezetüket. Aktivációjukat okozhatja trauma, fertőzések, citokinek, illetve nagyobb sérülések, például stroke. Ekkor a mikroglia sejtek a sérülés helyére, illetve annak környezetébe vándorolnak, nyúlványaik megrövidülnek és megvastagodnak, szómájuk megduzzad, ez tekinthető amőboid alaknak. Intenzív fagocitózisba, valamint citokin termelésbe kezdenek (Colonna et al., 2017). Az aktivált mikroglia sejteknek két fenotípusa létezik. Az egyik az M1-es, amely a pro-inflammatorikus folyamatokért felelős, antigén prezentáló sejtneként (APC) viselkedik, valamint gyulladásos mediátorok, mint például a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) vagy a reaktív oxigén gyökök (ROS) szekréciójáért felelős, ezáltal a neuronok pusztulásához járulnak hozzá. A másik fenotípusa az M2-es mikroglia, amelyek elsősorban a fagocitózis révén a szöveti törmelékek eliminálást végzik, valamint az anti-inflammatorikus válasz reakciókat biztosítják. Első sorban IL-4-et, IL-10-et juttatnak környezetükbe és a neuronok védelméhez járulnak hozzá (Wendimu et al., 2022).

A mikroglia sejtek különböző receptorokat expresszálnak membránjukon, amelyeknek köszönhetően megfelelő választ tudnak adni a környezetük megváltozására. Ilyen receptor a metabotróp glutamát receptor is, amelyen keresztül az intracelluláris térben megnövekedett glutamát koncentráció aktiválja a mikroglia sejteket, így beindul a neuroinflammáció folyamata. Továbbá szintén megtalálhatóak a mikroglia membránjában az NMDA receptorok, amelyek szintén részt vesznek a neuroinflammációban (Balbi et al., 2023). A mikroglia aktiváció folyamata az intracelluláris Ca^{2+} szinttől függ. Nyugalmi állapotban lévő sejtekben alacsony koncentrációban van jelen a Ca^{2+} , míg aktiváció során az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja ugrásszerűen megemelkedik (2. ábra) (Eichhoff et al., 2011). A korábban leírtak alapján az aktiváció a mikroglia morfológiájában is megmutatkozik. A nyúlványok rövidülésében a citoszkeleton átrendeződése, többek között az aktin filamentumok vesznek részt, amelyben a Ca^{2+} -nak fontos szerepe van (Uhlemann et al., 2016).



2. ábra. Mikroglia intracelluláris Ca^{2+} szint változása idegszöveti sérülés hatására (A) piros: Iba1, zöld: Ca^{2+} indikátor, sárga: átfedés. (B) idegszöveti sérülés miatt bekövetkezett intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ változás (Eichhoff et al., 2011)

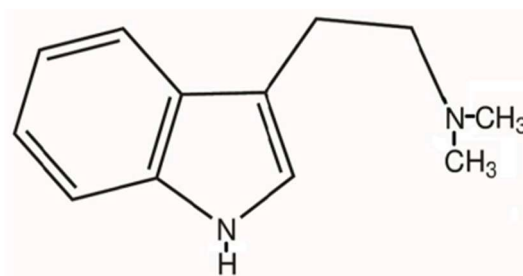
Ezen felül még expresszálnak a sejtfelszínükön mintázat felismerő receptorokat (PRR). Ezek közé tartoznak a Toll-like receptorok-ek (TLR), a fertőzések során exogén jelekre aktiválódó patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) és endogén hatásokra aktiválódó károsodás-asszociált molekuláris mintázatokat (DAMP) ismernek fel (Kwon et al., 2020). A TLR4 ismeri fel a gram negatív baktériumok sejtfalában megtalálható LPS-t, amely így aktiválni fogja a mikroglia sejteket. A TLR4 mieloid differenciált protein 2-vel (MD2) asszociálva downstream gyulladásos mediátorok megjelenéséhez vezet. Ilyen pro-inflammatorikus citokin a $\text{TNF-}\alpha$ és az $\text{IL-1}\beta$ is, de az aktiváció révén közvetve ROS felszabadulást is okoz (Glass et al., 2010).

A mikroglia sejtek morfológiai változásának nyomon követésére bináris szilvetteket lehet alkalmazni. Ezen szilvettekből transzformációs index értéket (TI) lehet számolni, amely alapján meg tudjuk állapítani, hogy a mikroglia sejt aktivált vagy nyugalmi állapotban van.

Amennyiben a TI értéke kisebb mint 3, úgy amőboid alakú, aktivált mikroglának, ha pedig nagyobb mint 3, úgy ramifikálnak, nyugalmi állapotban lévő mikroglának tekintjük a sejteket (Kata et al., 2016).

Az aktivált, fagocitózist folytató mikroglia feladata a különböző szöveti törmelékek lehető legnagyobb mértékű eliminálása, ezáltal a mikrokörnyezet helyreállítása. Ahhoz, hogy egy akut agysérülést követően a neuronhálózat képes legyen regenerálódni és újraszerveződni, először a mikrokörnyezetnek kell helyreállnia (Fu et al., 2014).

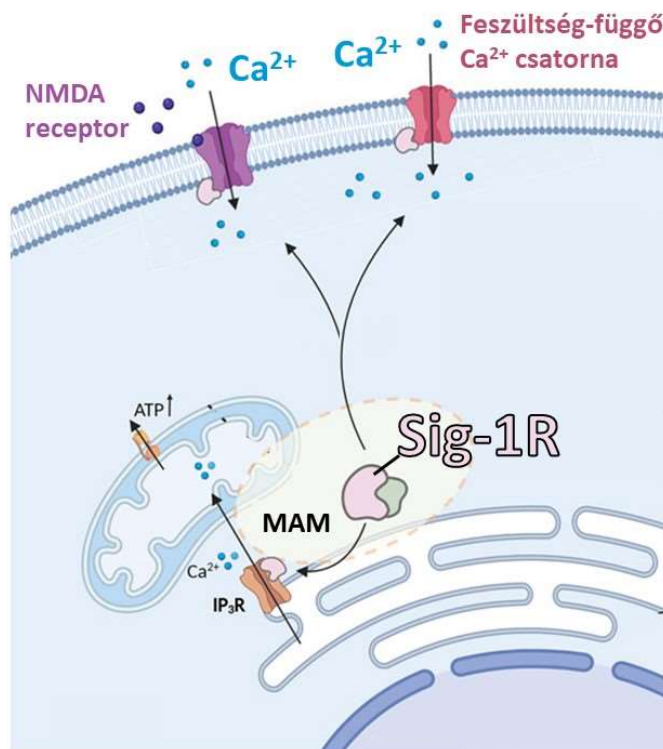
Az N,N-dimetiltriptamin (DMT) egy endogén, pszichoaktív szer. Dél-Amerikában az őslakosok az ayahuasca gyógyászati főzetben alkalmazzák, amelyben a *Psychotria viridis*-ből a DMT, a *Banisteriopsis caapi*-ből pedig egy monoamin-oxidáz (MAO) gátló származik (Domínguez-Clavé et al., 2016). A DMT jelenlétét több növényben, emlősállatban, valamint az emberben is kimutatták (Szabo et al., 2016). Az emberi szervezetben a MAO révén a DMT gyorsan elbomlik, ezért alkalmazása csak MAO gátlóval együtt ajánlott. Az emberi agyban a DMT kis koncentrációban jelen van és neurotranszmitter vezikulákban képes tárolódni, majd onnan felszabadulni. Továbbá tudjuk, hogy a DMT a Sig-1R agonistája (Carbonaro et al., 2016).



3. ábra. N,N-dimetiltriptamin szerkezeti képlete (Barker et al., 2018)

A Sig-1R egy az endoplazmatikus retikulumban (ER), annak a mitokondriummal asszociált membrán szakaszán (MAM) expresszálódik. Elsődleges feladata a mitokondriális ATP szintézis serkentése, amelyet az inozitol-trifoszfát recepttorral (IP3R) együtt működve a mitokondriális Ca^{2+} szint szabályozásával ér el. Továbbá a sejtmembránban megtalálható NMDA receptorok és a VGCC-k nyitásának modulálásával az intracelluláris Ca^{2+} szintet regulálják (4. ábra) (Ren et al., 2022).

Korábbi kísérletek során bebizonyították, hogy a Sig-1R a mikroglia sejtekben is expresszálódik (Szabó et al., 2021). A DMT-nek ezáltal a mikroglia aktivációra hatása lehet és az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozása révén a citokinek termelését is befolyásolhatja.



4. ábra. A Sig-1R (szigma-1 receptor) expressziójának helye és a rajta keresztül kiváltott Ca^{2+} koncentráció változás útvonala. MAM: mitokondrium asszociált membrán, IP_3R : inozitol-trifoszfát receptor (Ren et al., 2022)

3. Célkitűzés

A fent leírtak alapján kutatásunk fő hipotézise az volt, hogy a DMT a Sig-1R farmakológiai agonizmusa által csökkenti a mikroglia sejtek aktiválódását, ezáltal a neuroinflammációs folyamat mértékét is, amely alapján arra következtethetünk, hogy a kései neuronpusztulás mértéke is kisebb lesz.

Ennek fényében a jelen kísérletek célja az volt, hogy értékeljük a DMT koncentráció függő hatását a mikroglia sejtek aktivációjára nézve.

Ennek érdekében primer mikroglia sejtenyészetet készítettünk, majd DMT kezelést követően immunocitokémiai módszereket, transzformációs index-et, western blot analízist, fagocitotikus aktivitást és proteomikai vizsgálatokat folytattunk.

4. Kísérleti módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

poli-L-lizin (Sigma, St. Louis, MO, USA); DMEM (Dulbecco által módosított Eagle medium; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); DMT (Nicolas Cozzi, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI, USA); tripszin (0,25%, Gibco); FBS (10%-os hő-inaktivált magzati borjú szérum, Capricorn); formaldehid (4%-os, Molar

Chemicals); PBS (foszfát puffer 0,05 M, pH 7,4); BSA (szarvasmarha szérum albumin; Sigma, St. Louis, MO, USA); NGS (5% normál kecske szérum, Sigma, St. Louis, MO, USA); Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA); Iba1 elsődleges antitest (nyúl anti-Iba1 Sigma, St. Louis, MO, USA); Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl másodlagos antitest (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); DAPI (4',6-diamidino 2-fenil-indol, NBP2-31156, Novus Biologicals); precipitáló puffer; TBS (Tris pufferelt sóoldat); GAPDH (Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz) elsődleges antitest (egér anti-GAPDH Sigma, St. Louis, MO, USA); TEAB (tetraetilammónium-bromid); TCEP (Tris-(2-karboxietil)-foszfin); MMTS (S-metil metán-etio-szulfonát)

4.2. Antitestek

A kísérletek során nyúl anti-Iba1-et használtunk, mint mikroglia markert. Az Iba1 egy kis molekula tömegű intracelluláris kalciumköti fehérje, amely egyben specifikus markere mind a nyugalmi állapotban lévő, mind az aktivált mikrogliaénak is. Másodlagos antitestnek Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl antitestet használtunk az immunocitokémia során és kecske anti-nyúl IgG alkalikus-foszfátást western blot analízis során. Továbbá GAPDH (Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz) háztartási fehérjét alkalmaztunk a western blot során. A kapott Iba1 eredményeinket a GAPDH optikai intenzitására normalizáltuk.

4.3. Mikroglia sejtenyésztés készítése

A mikroglia sejtenyésztéshez újszülött Sprague-Dawley hím és nőstény patkányokat használtunk. A munkát steril fülke alatt, steril eszközökkel és anyagokkal végeztük. Az újszülött patkányokat dekapitáltuk, majd ezt követően az agyukat kiemeltük. A kortex régióból kisebb szövetmintákat csíptünk ki, amiket 9 ml DMEM-et tartalmazó Petri-csészékbe helyeztünk. Az emésztés elősegítése érdekében a szövetmintákat apróbb darabokra vágtuk. Minden Petri-csészéhez 1-1 ml 2,5%-os tripszin enzimet mértünk és a szövetet 10 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezen idő alatt a sejtek közötti kapcsolatok fellazulnak. Emésztést követően a sejtuszpenziót Pasteur-pipetta segítségével 50 ml-es centrifugacsövekbe mértük és 10 percig 1000 g-n 21 °C-on centrifugáltuk. A sejtekről leöntöttük a felülúszót, majd 10 ml DMEM/10%-os FBS-t mértünk hozzá. Pasteur-pipetta segítségével a teljes homogén oldat eléréséig szuszpendáltuk a sejteket. Ezt követően egy újabb 10 perces 1000 g-s 21 °C-os centrifugálást hajtottunk végre. A felülúszót ismételtelen eltávolítottuk, majd 2 ml DMEM/10% FBS-t adtunk hozzá és Pasteur-pipettával szuszpendáltuk a sejteket. A homogén oldatból 60 µl-t eppendorf-csőbe mértünk ki, amelyhez 240 µl DMEM/10% FBS-t adtunk. Az eppendorf-cső tartalmának összekeverését

követően bürker-kamrába mértünk a sejtszuspenzióból és fénymikroszkóp segítségével 20x-os nagyításon megszámoltuk a sejteket. A kapott sejtszám alapján poli-L-lizinnel előkezelt tenyésztő flaskákba 10 millió sejtet mértünk. A flaskákhoz ezután még 10-10 ml DMEM/10% FBS oldatot adtunk. A sejteket 37°C-on 5%-os CO₂-ot tartalmazó környezetben tenyésztettük. A tenyésztés utáni napon, majd 3 naponta tápfolyadék cserét hajtottunk végre.

Ezen tenyészet kevert jellegű, azaz egyaránt tartalmaz gliasejteket és neuronokat is. A tiszta mikroglia tenyészetet a letapadt sejtek rázatásával hoztuk létre. A legkönnyebben az aktivált mikroglia sejtek rázódnak fel, mivel amöboid morfológiát mutatnak, kevesebb a nyúlványaik száma, szemben a nyugalmi állapotban lévő ramifikált mikroglia sejtekkel, amelyek jóval több nyúlvánnyal rendelkeznek, ezáltal erősebben is tapadnak.

A tenyésztés 7. napján 20 percre, 37 °C-os rázatóba tettük a tenyésztő flaskákat és 100 rpm-es sebességen ráztattuk. Ez idő alatt a mikroglia sejtek döntő többsége elvált a flaskák felszínétől és a felülúszóba került. A médiumot 10 ml-es pipetta segítségével steril centrifugacsövekbe átpipettáztuk. Ezt követően a mintákat 8 percig, 3000 g-n, 21 °C-n centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót leöntöttük az üledékről és friss 2 ml DMEM/10% FBS-t adtunk hozzá, amiben a pellet felszuszpendálását végeztük a teljes homogén minta eléréséig. Bürker-kamra segítségével sejtszámlálást végeztünk, majd steril poli-L-lizinnel kezelt Petri-csészékbe 1-1 millió sejtet, valamint szintén steril Petri-csészékbe helyezett poli-L-lizinnel kezelt fedőlemezekre 200 ezer sejtet tartalmazó mintát mértünk. Az 1-1 millió sejtet tartalmazó csészékre 5-5 ml DMEM/10% FBS-t mértünk, a fedőlemezes Petri-csészékre pedig 2-2 ml DMEM/10% FBS-t. Ezt követő napon, majd 3 naponta cseréltünk tápfolyadékot a mintákon. A tenyészeteket a tápfolyadék cserék között végig 37 °C-on 5%-os CO₂-n inkubáltuk.

4.4. Mikroglia sejtenyészet kezelése

A sejtek állapotát, azon keresztül génexpressziójukat és fehérjetermelésüket különböző kezelések alkalmazásával tudtuk befolyásolni. A sejtek kezelési ideje alatt az előző pontban foglaltaknak megfelelő környezeti feltételeket biztosítottuk. A sejtenyészeteket 20 ng/ml LPS-sel aktiváltuk. A mikroglia aktivációt DMT hozzáadásával kívántuk módosítani. A DMT-t ioncserélt vízben feloldottuk, póruszűrőn átszűrtük majd sterilizáltuk, végül pedig 5, 10, 20, valamint 50 µM-os koncentrációban alkalmaztuk. A kezelések után nyert adatokat a kontroll csoporttal, valamint egymással is összehasonlítottuk. A tenyésztés 6. napján a korábbiakban leírtaknak megfelelően kezeltük a kultúrákat és 24 óra elteltével 0,05 M PBS-sel lemostuk a felesleget. Ezután az immunocitokémiára szánt fedőlemezeket 5 percig 0,05 M PBS-sel hígított 4%-os formaldehidben fixáltuk, majd 0,05 M PBS-sel mostuk őket kétszer 5 percig. Mosást

követően megszárítottuk a fedőlemezeket és a felhasználásukig 4 °C-on tároltuk őket. A western blotra szánt csészéken az immunocitokémiához hasonlóan 0,05 M PBS-sel gyorsmosást alkalmaztunk, majd precipitáló pufferrel összegyűjtöttük a sejteket. Ezt követően mechanikailag disszociáltuk a sejteket, majd 10000 g-n 8 °C-on 10 percig centrifugáltuk a homogenizátumot. A felülúszó összegyűjtését követően -80 °C-on tároltuk a mintáinkat. A proteomikára szánt fehérjék összegyűjtéséhez a mintákon először 0,05 M PBS-es gyorsmosást végeztünk. Ezután mechanikai úton disszociáltuk a sejteket és 10000 g-n 8 °C-on 10 percig centrifugáltuk a homogén oldatot. Centrifugálást követően a felülszóból mintát vettünk, majd -80 °C-on tároltuk őket a felhasználásig.

4.5. Immunocitokémia

A mosást követően a nem specifikus kötéseket blokkoltuk, majd a sejtmembránt átjárhatóvá tettük, amely biztosítja az antitestek és az antigének megfelelő kötődését, valamint a nem specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokat minimalizálja. 5%-os NGS-t és 0,3%-os Triton X-100-at tartalmazó 0,05 M-os PBS oldatot készítettünk, majd ebből 100-100 µl-t mértünk a fedőlemezekre, amelyekre parafilmot helyeztünk és 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

5%-os NGS-t, 1%-os BSA-t, valamint 0,3%-os Triton X-100-at kihígított 0,05 M-os PBS-oldatban feloldottuk az elsődleges antitestet. Az elsődleges antitestet 1/1000-es végső hígításban alkalmaztuk. A hígítás alapján a fedőlemezekre 100-100 µl oldatot pipettáztunk, majd ismételten parafilmot helyeztünk rájuk. A mintákat egész éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Másnap a fedőlemezeket PBS-sel mostuk 3 alkalommal 5-5 percen keresztül, majd ezt követően 1%-os BSA-t tartalmazó 0,05 M PBS-ben feloldottuk a másodlagos antitestet 1/1000-es végső hígításban. Ebből is 100-100 µl-t mértünk a fedőlemezekre és parafilmmel letakarva szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk a mintákat fénytől elzárva, ugyanis a minták innentől kezdve fényérzékenyek. Az inkubációs idő leteltével a fedőlemezeket 0,05 M PBS-sel háromszor mostuk 5-5 percen keresztül, végül pedig desztillált vízzel szintén 5 percig mostuk a mintákat. Ezt követően a fedőlemezeket megszárítottuk, majd szárítás után tárgylemezre rögzítettük őket Prolong Diamond Antifade with DAPI mounting médiummal. A mintáink rögzülését követően megvizsgáltuk a sejteket Leica D LB2 mikroszkóppal (Leica Microsystems Wetzlar GmbH., Wetzlar Germany) és képeket készítettünk róluk LEICA DFC250 color kamerával (Leica Microsystems Wetzlar GmbH., Wetzlar Germany).

4.6. Transzformációs index

A transzformációs index meghatározásához szükséges a sejtek egyes paramétereinek ismerete, ezért a fluoreszcens immunocitokémia során készült színes képeket számítógépes képanalizáló szoftver, Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) segítségével a thresholding módszert alkalmazva bináris sziluettké alakítottuk át. Ezután a kapott bináris sziluettek már csak két különböző pixel-értéket tartalmaztak, amelyből a kvantitatív információt egy képfeldolgozó program, az ImageJ (version 1.47; U.S. National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)) segítségével nyertük ki. A kvantitatív mérések a sziluettek legfontosabb mutatószámaira, a kerületre (μm) és a területre (μm^2) irányultak. A transzformációs index (TI) kiszámításához az alábbi képletet alkalmaztuk: $\text{kerület}^2 / 4\pi \cdot \text{terület}$. Ha a kapott TI értéke 3-nál kisebb akkor amöboidnak, ha 3-nál nagyobb akkor ramifikáltnak tekintettük a sejteket.

4.7. Western blot

SDS-poliakrilamid gélen (4–10% gyűjtő gél/szeparáló gél) 10 μg mennyiségű fehérjét választottunk el a western blot analízis során. Ezt követően Hybond-ECL nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) transzferáltuk a mintáinkat. Majd 1 órán keresztül 5%-os zsírszegény száraz tejben blokkoltuk a membránt. Egy éjszakán át inkubáltuk a megfelelő elsődleges antitesttel (Iba1 poliklonális antitest), valamint a belső kontrolléval (egér anti-GAPDH monoklonális antitest). Másnap ötször mostuk a membránt 0,1%-os TBS-Tween-20-ban. A membránt 1 órán keresztül inkubáltuk alkalikus foszfátazzal konjugáltatott másodlagos antitesttel. Az inkubáció után háromszor mostuk a membránt 0,1%-os TBS-Tween-20-ban, majd kromofór (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével feltártuk az immunreaktív sávokat. Az elkészült membránt beszkenneltük és utána ImageJ képanalizáló program segítségével megmértük a jelek intenzitását. Az Iba1 értéket a GAPDH-ra normalizáltuk.

4.8. Fagocitózis – szintetikus mikrogyöngyök

A mikroglia sejtek legfontosabb feladatának, a fagocitózisnak a mérésére latexba csomagolt fluoreszcens mikrogyöngyöket alkalmaztunk. A fagocitózis markert a sejtenyésztesben leírt kezelések után a 7. napon adtuk a mintáinkhoz a fixálást megelőző 1 órában, majd a szintén fent leírtaknak megfelelően fixáltuk a sejteket 4%-os formaldehidben. Ezután az immunocitokémiai módszernél leírtaknak megfelelően megvizsgáltuk a sejteket és képeket készítettünk a mintákról. ImageJ program cell counter plugin-ját használva

megszámoltuk a sejtenként fagocitált szintetikus mikrogyöngyök számát, majd a kapott számadatokat kiértékeltek.

4.9. Proteomika

A proteomikai analízist a HCEMM-BRC Single-cell Omics ACF (vezető kutató: Dr. Darula Zsuzsa) szolgáltatta. Szemikvantitatív LC-MS/MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) jellemzést használtunk 3 féle kezelés (kontroll, LPS, LPS + 20 μ M DMT) értékelésére. A DMT koncentrációját az előző kísérleteinkből nyert adatok alapján választottuk ki. A proteomikai vizsgálat során 3 független párhozamos mintát használtunk. A mintákat 25 μ l 50 mM tetraetilammónium-bromid ban (TEAB) vettük fel, majd Tris-(2-karboxietil)-foszfínnal (TCEP) redukáltuk és S-metil metán-etio-szulfonáttal (MMTS) blokkoltuk, ezt követően pedig tripszinnel emésztettük. A kiizolt peptidegyeket Evosep One-FAIMS-Orbitrap Lumos LC-MS rendszerrel analizáltuk. A kapott adatokat ProteomeDiscoverer 3.0 (ThermoScientific) programcsomag segítségével analizáltuk és a fehérjéket Sequest adatbázis keresővel azonosítottuk.

5. Eredmények

5.1. Transzformációs index

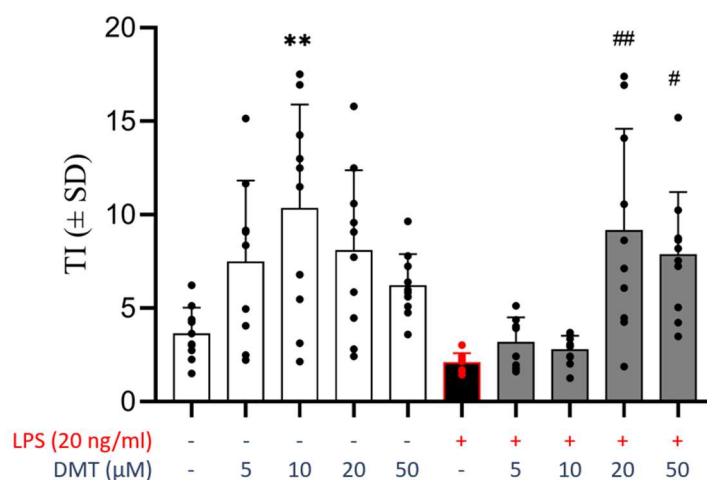
A mikroglia sejtekről készült bináris szilvetteken jól megfigyelhetők a különböző kezelések hatására bekövetkezett morfológiai változások. Ez a szembetűnő különbség a reprezentatív ábrán is jól látható (5. ábra).



5. ábra. Reprezentatív bináris szilvettek a mikroglia sejtek morfológiai változását mutatják az LPS indukció és a DMT kezelés hatására. Az LPS önmagában kicsi, amőboid, a DMT hozzáadása nagyobb, ramifikált sejtalakot eredményezett.

Számszerűsítve, a mikroglia aktivációt az LPS hatására bekövetkező transzformációs index értékének csökkenése mutatta a kontroll eredményekhez képest ($2,08 \pm 0,48$ vs. $3,62 \pm 1,4$; TI: LPS vs. kontroll) (6. ábra). A DMT önmagában valamennyi koncentráción a kontrollhoz képest megnövekedett transzformációs indexet mutatott, mely a 10 μ M-os koncentrációnál statisztikai eltérésnek is bizonyult ($10,32 \pm 5,57$ vs. $3,62 \pm 1,4$, DMT vs. kontroll). Az LPS kezelés mellett megfigyelt alacsony transzformációs index értékeket az 5 és 10 μ M-os DMT kezelések nem változtatták meg, azonban a 20 és 50 μ M-os DMT kezelések a transzformációs index

értékeket szignifikánsan növelték, azaz ramifikáltabb sejtalak felé tolták el a mikroglia sejteket (6. ábra).



6. ábra. Transzformációs index kvantitatív analízise (n=10). A Kolmogorov-Smirnov normalitási teszt az adatok normáloszlását igazolta, így egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) majd Tukey post hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában ábrázoltuk az egyes adatpontok megadásával. **P < 0.01 vs. kontroll, #P < 0.05 vs. LPS, ##P < 0.01 vs. LPS

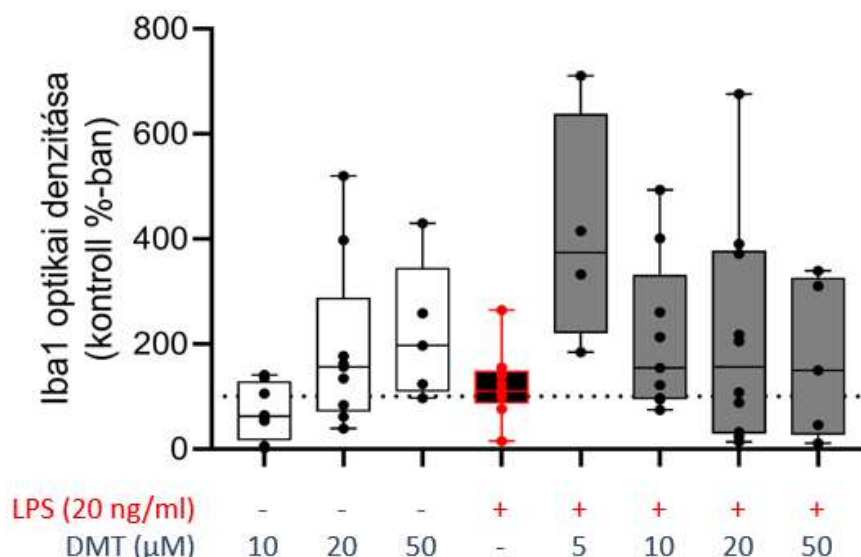
5.2. Western blot

A mikroglia aktiváció vizsgálatára western blot analízist is alkalmaztunk. A mikroglia aktivációját az Iba1 fehérje kvantitatív mennyiségének meghatározásával jellemeztük a GAPDH háztartási fehérje mennyiségére normalizálva (7. ábra).



7. ábra. A reprezentatív western blot-okon az Iba1 fehérje jelének intenzitásfokozódása a mikroglia sejtek aktivációját demonstrálja.

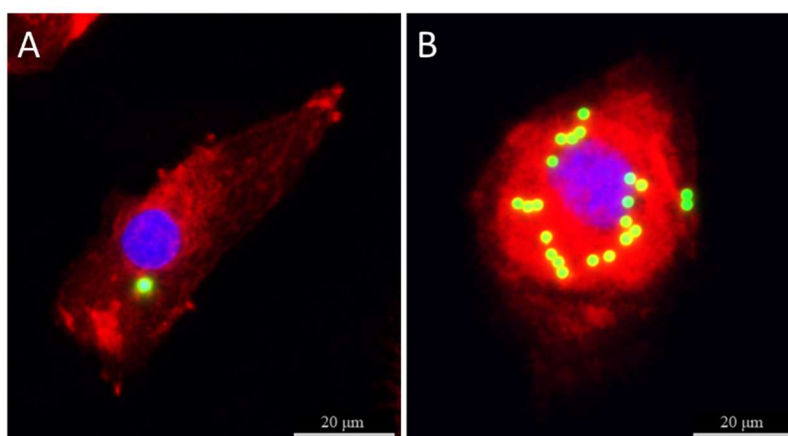
Az adatok kvantitatív értékeléshez az Iba1 optikai denzitását (integrált optikai denzitás, IOD) a kontroll %-ban adtuk meg. Bár az LPS-sel kezelt tenyészeteken megemelkedett jelintenzitást kaptunk ($121,08 \pm 63,31$ vs. 100 ± 0 IOD LPS vs. kontroll), az eltérés nem érte el a statisztikai különbséget (8. ábra). A DMT önmagában és LPS indukcióval kombinálva is növelte az Iba1 jelintenzitást, azonban az adatok nagy szórása miatt ez sem felelt meg statisztikailag értékelhető eltérésnek (8. ábra).



8. ábra. Western blot kvantitatív elemzése ($n=6$). A Shapiro-Wilk normalitási teszt nem igazolta az adatok normáloszlását, ezért a nem-parametrikus Kruskal-Wallis tesztet és Dunn-féle post hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat box-plot diagrammal ábrázoltuk az egyes adatpontok megadásával. A csoportok között statisztikailag szignifikáns eltérés nem mutatkozott.

5.3. Fagocitózis – szintetikus mikrogyöngyök

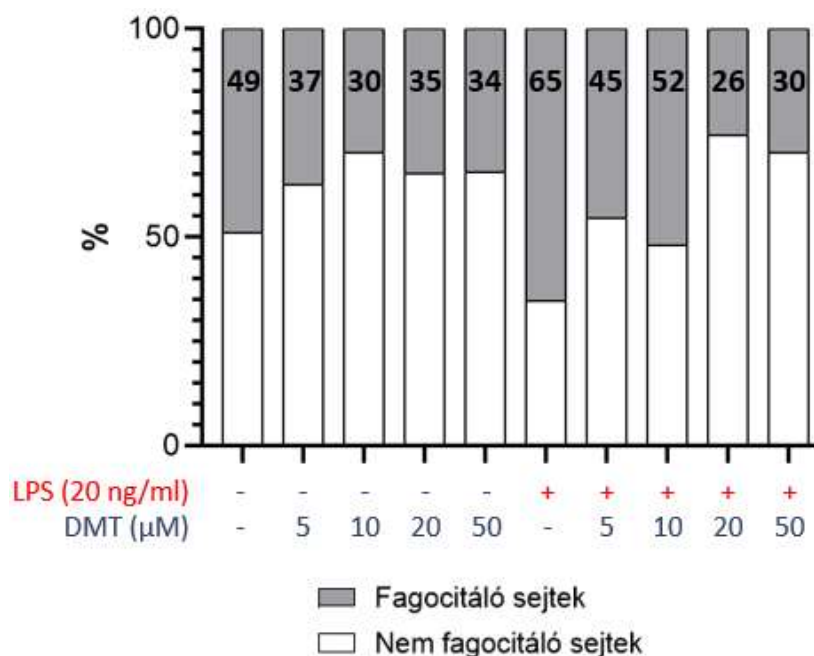
Az immunocitokémiával jelölt preparátumokon szembeűnő, jól kivehető különbségeket láttunk a különböző kezelések hatására (9. ábra). Az LPS-sel kezelt mikroglia kultúráinkon jóval nagyobb fagocitotikus aktivitás volt megfigyelhető ($2,93 \pm 2,44$ szintetikus mikrogyöngy/sejt), mint a kontroll csoportba tartozó sejtek esetében ($2,54 \pm 2,27$ szintetikus mikrogyöngy/sejt).



9. ábra. A reprezentatív képek a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitását mutatják be kontroll (A) és LPS kezelt (B) tenyészetekből. Piros: Iba1 - mikroglia marker, kék: DAPI - sejtmag marker, zöld: bekebelezett szintetikus mikrogyöngy - fagocitózis marker.

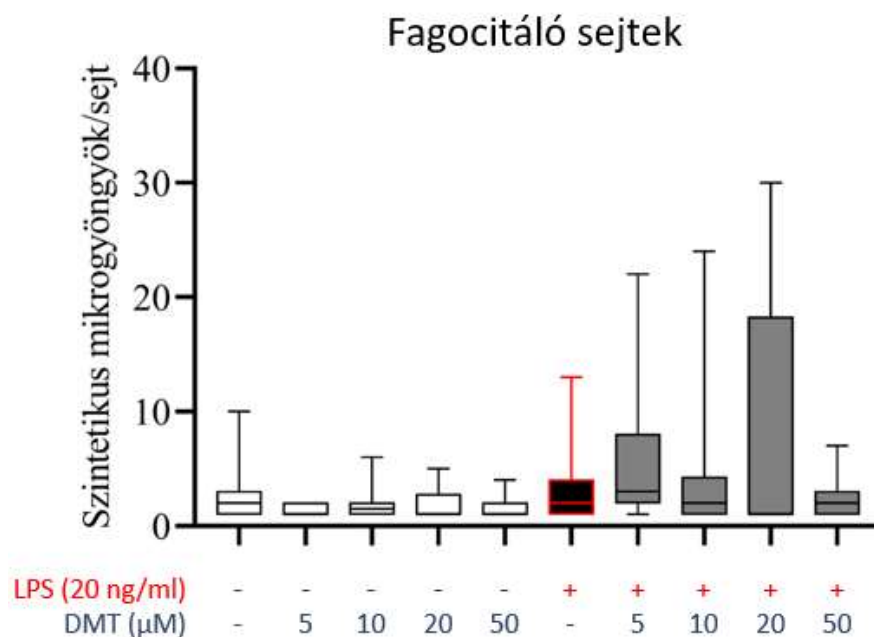
Először megállapítottuk a fagocitáló és nem fagocitáló sejtek arányát az egyes tenyészetekben. A kontroll tenyészetekben a fagocitáló és nem fagocitáló sejtek aránya közel 50-50%-os volt. LPS kezelés hatására a fagocitáló sejtek aránya megnövekedett (65%) a nem

fagocitáló sejtek rovására (35%) (10. ábra). A DMT kezelés önmagában mind a négy használt koncentrációban csökkentette a fagocitáló sejtek arányát kontroll tenyészetéhez képest. A DMT az LPS-sel együtt adva 20 és 50 μM -os koncentrációban szintén számottevően visszaszorította a fagocitotikus aktivitást (10. ábra).



10. ábra. Fagocitáló sejtek aránya az egyes csoportokhoz tartozó tenyészetekben.

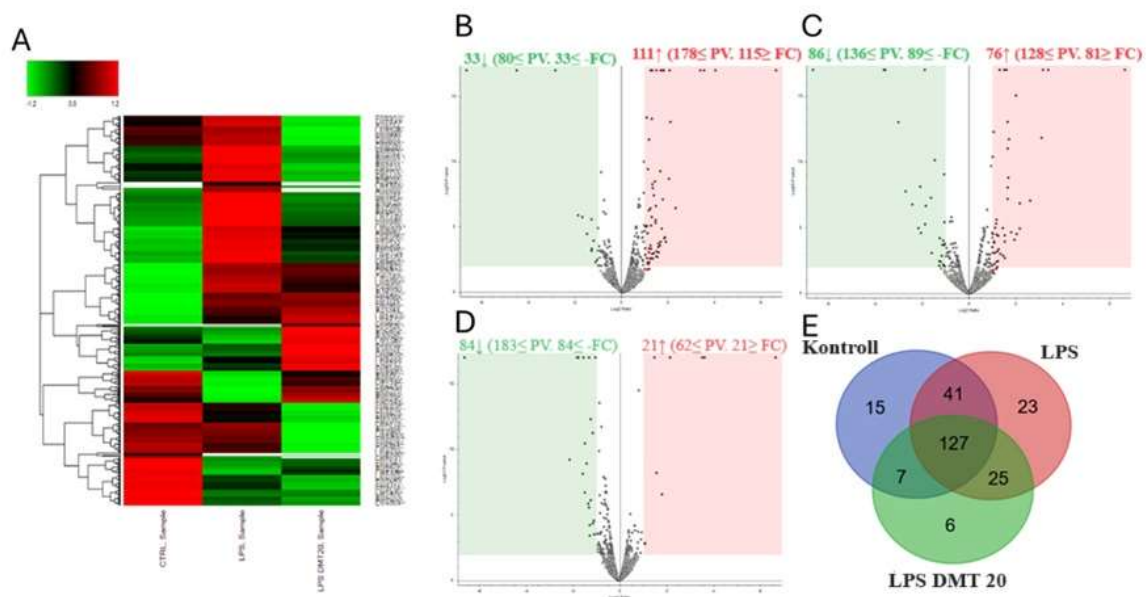
A továbbiakban az egyes tenyészetekben azonosított fagocitáló sejtekben számoltuk meg a bekebelezett mikrogyöngyöket. A statisztikai próba nem jelzett értékelhető különbséget a csoportok között, bár az LPS-sel együtt alkalmazott DMT nagy szórás mellett növekedési tendenciát eredményezett. (11. ábra). Összefoglalva, a tenyészetekben kevesebb fagocitáló mikroglia tendenciózan nagyobb számú mikrogyöngyöt kebelezett be.



11. ábra. A fagocitáló mikroglia sejtek kvantitatív analízise (n=50). A Spapiro-Wilk normalitási teszt nem igazolta az adatok normáloszlását, ezért nem-parametrikus Kruskal-Wallis tesztet és Dunn-féle post hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat box-plot diagrammal ábrázoltuk. A csoportok között statisztikailag szignifikáns eltérés nem mutatkozott.

5.4. Proteomika

A proteomikai vizsgálatok során összesen 2793 fehérjét azonosítottunk, amelyekből 244 fehérje mennyisége változott meg (12A ábra). A csoportok közötti összehasonlítások szerint az LPS a kontrollhoz képest 111 fehérje upregulációját és 33 fehérje downregulációját eredményezte (12B ábra). A DMT hozzáadása az LPS-el indukált kultúrához a kontrollhoz képest alacsonyabb upregulációt (76 fehérje) de magasabb downregulációt (86 fehérje) mutatott, jelezve a DMT hatását (12C ábra). Végül a DMT és az LPS együttes adása az LPS-hez képest 21 fehérje upregulációját és 84 fehérje downregulációját eredményezte (12D ábra).



12. ábra. A proteomikai vizsgálatok eredménye. A mikroglialis fehérjék kifejeződésének változásait heatmap (piros: upreguláció, zöld: downreguláció) összegzi (A). A fehérje-expressziós vizsgálatból nyert adatok vulkán-diagramjai páros csoportösszehasonlításokban a szignifikáns mértékben downregulálódott (zöld háttér) és upregulálódott (piros háttér) fehérjéket ábrázolják: LPS vs. Kontroll (B), LPS+DMT vs. Kontroll (C) LPS+DMT vs. LPS (D). A vízszintes tengely a fehérje mennyiségi változást ($\log_2$), a függőleges tengely pedig a változás statisztikai P-értékét ($-\log_{10}$) adja meg. A három adatkészletből származó, megváltozott kifejeződésű fehérjék átfedése (E).

A továbbiakban olyan fehérjéket kerestünk, amelyek kifejeződése az LPS hatására megváltozott, majd ezt a változást a DMT hozzáadása visszafordította. Nyolc olyan fehérjét azonosítottunk, amelyek LPS hatására upregulálódtak, majd a DMT ezt a fokozott kifejeződést kivédte. Közülük kettő, az indukálható nitrogén monoxid szintáz (iNOS) (13.ábra) és a foszfolipáz A2 (PLA2) (1. táblázat) egyértelműen köthető az aktivált mikroglia pro-inflammatorikus funkciójához. Továbbá 12 olyan, zömében enzimfehérjét találtunk, amelyek LPS hatására downregulálódtak, és ezt a DMT hozzáadása visszafordította. Ilyen fehérje volt a gyulladásos reakciókkal összefüggésbe hozható lizoszómális 5'-3' exonukleáz PLD3 (2. táblázat).

1. táblázat. Az LPS hatására upregulálódó, majd DMT hozzáadására downregulálódó fehérjék

Azonosító	Fehérje név	#q peptidek	LPS /CTRL		LPS DMT20 /LPS		funkció (uniprot.org)
			abundancia hányados	Adj. P-érték	abundancia hányados	Adj. P-érték	
P42533	szöveti faktor	1	3.019	5.11E-03	0.516	2.70E-02	vér koaguláció
D3ZYW7	mitokondriális frataxin	1	3.247	2.23E-03	0.522	4.63E-02	perszulfid transzfer aktivátor
P14423	membrán asszociált foszfolipáz A2	2	2.808	5.55E-06	0.558	1.39E-04	antimikrobiális védelem
Q06518	indukálható nitrogén-oxid szintáz	39	10.458	2.97E-16	0.665	3.73E-06	antimikrobiális védelem
Q63688	25-hidroxi-koleszterol-7-alfa-hidroziláz	5	2.569	2.55E-07	0.674	2.50E-02	sejtpozíció és mozgás limfoid szövetben
Q6IFU7	I-es típusú citoskeletális 42	4	3.548	2.97E-16	0.726	2.28E-02	szennyezés
P19132	ferritin nehéz lánc	15	2.509	2.97E-16	0.733	1.67E-03	vastarolás
Q5PQM2	kinezin könnyű lánc 4	1	3.031	1.20E-02	2.079	1.96E-02	sejtorganelum transzport; ATP-áz aktivitás modulálás

A táblázatban az LPS hatására szignifikánsan up-, majd DMT hatására downregulálódó fehérjék szekvenciájának egyedi azonosítószáma, neve, peptidek száma, abundancia hányadosa, a P-érték és a fehérjék funkciói láthatóak.

2. táblázat. Az LPS hatására downregulálódó, majd a DMT hozzáadására upregulálódó fehérjék.

Azonosító	Fehérje név	#q peptidek	LPS /CTRL		LPS DMT20 /LPS		funkció (uniprot.org)
			abundancia hányados	Adj. P-érték	abundancia hányados	Adj. P-érték	
Q4V7C1	Centroszómális fehérje 43	2	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	mikrotubulus horgonyzása a centroszómához
P56536	Kinezin nehéz lánc izoforma 5C	1	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	mikrotubulus-asszociált fehérje, organelum transzport
O08560	diacil-glicerol kináz zéta	1	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	sejttípustól és fejlődési állapottól is függ a funkciója
O08984	delta (14)-szterol reduktáz LBR	1	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	NADPH oxidáz aktiváció mediálása
B5DF93	fehérje PAT1 homológ 1	1	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	Scaffold fehérjeként viselkedik a deadeniláció és a decapping között
Q0KL00	Piezo-típusú mechanoszenzitív ioncsatorna komponens 1	1	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	apoptózisban játszik szerepet
O55000	szérin/treonin-fehérje foszfatáz 1 regulátor alegység 10	1	0.01	2.97E-16	100	2.76E-16	protein kináz A regulátor szerep
P39948	g1/S-specifikus ciklin-D1	2	0.045	2.97E-16	3.461	6.04E-06	az őssejtekből neuronális indukciót promótál
Q63787	foszfatidilinozitol-3-kináz regulátor alegység alfa	2	0.277	2.73E-05	11.374	2.76E-16	piroptózis promótálása, gyulladási faktorok felszabadulását szabályoz
P38483	C->U módosító enzim APOBEC-1	1	0.363	6.11E-04	1.863	1.12E-02	COX-2 expresszió és COX-2 mRNS stabilizáció a neuronokban
Q5FVH2	5'-3' exonukleáz PLD3	11	0.6	1.99E-06	1.355	1.71E-04	gyulladásos citokin válasz szabályozás
Q6P7C7	Transzmembrán glikoprotein NMB	21	0.627	2.16E-05	1.29	3.48E-03	melanogén enzim

A táblázatban az LPS hatására szignifikánsan down-, majd DMT hatására upregulálódó fehérjék szekvenciájának egyedi azonosítószáma, neve, peptidek száma, abundancia hányadosa, a P-érték és a fehérjék funkciói láthatóak.

6. Megbeszélés, összegzés

Kísérletes munkánk során primer mikroglia tenyészeteket LPS-sel aktiváltunk abból a célból, hogy a DMT mikroglia aktivációra kifejtett hatását szelektíven tanulmányozzuk.

A DMT egy természetes növényi indol-alkaloid, amely pszichedelikus hatásairól ismert (pl.: ayahuasca főzet) (Luna, 2011). Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy a DMT a Sig-1R agonistája (Fontanilla et al., 2009). A Sig-1R-ek intracelluláris receptorok, amelyek az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjának azon szegmensére lokalizálódnak, amely a mitokondrium külső membránjához rendeződik (mitokondrium-asszociált ER-membrán, MAM). A Sig-1R-ek szabályozzák a sejt Ca^{2+} háztartását, gátolják a ROS termelődését, és végeredményben elősegítik a stressznek kitett sejt túlélését (Hayashi, 2015; Penke et al., 2018). Számos kísérleti adat utal arra, hogy a Sig-1R aktiválása neuroprotektív hatást eredményez iszkémiás stroke-ban.

Ezen ismereteken elindulva kísérletes agyi iszkémiában a DMT neuroprotektívnek bizonyult (Szabó et al., 2021), csökkentette az agyi infarktus méretét, javította a motorikus funkciót és gátolta a pro-inflammatorikus citokinek mRNS-ének átíródását az agyban (Nardai et al., 2020). A kutatók a korábbi tanulmányokban a DMT jótékony hatását a Sig-1R aktiválásának tudták be. Az *in vivo* kutatások azt is bizonyították, hogy a neuronok mellett a mikroglia is kifejezi a DMT célpontját, a Sig-1R-t (Nardai et al., 2020; Szabó et al., 2021). Az élő agyban azonban a DMT hatása összetett, a mikrogliaán elért hatást nehéz elkülöníteni.

Az agyi gyulladásos folyamatok ellen fejlesztett gyógyszerjelölt hatóanyagok vizsgálatára a primer mikroglia kultúrák sok szempontból alkalmasak (Chao et al., 1992; Suzumura et al., 1999; Kata et al., 2016; McKee et al., 2023; Szabo et al., 2023). A gyógyszerjelöltek szelektíven a mikrogliaát célozzák, így nem kell számolni más központi idegrendszeri sejtípusokra gyakorolt farmakológiai hatásokkal vagy a mikroglia és más sejtípusok közötti kölcsönhatással. A mikroglia aktiválására a legszélesebb körben alkalmazott módszer az LPS hozzáadása a tápoldathoz (Witting és Möller, 2011). Az LPS a gram negatív baktériumok sejtfalának külső membránkomponense, amely egy immunválaszt kiváltó, patogén-asszociált molekuláris mintázat (PAMP). Az LPS a TLR4 archetipikus aktivátora. A mikrogliaán a TLR4 a célpontja az endogén károsodás-asszociált molekuláris mintázatnak (DAMP) is. A DAMP-ról ismert, hogy agyi sérülésekben neuroinflammációt vált ki. Mindezek alapján a TLR4-et célzó mikroglia aktiválás LPS-sel érvényes megközelítés az agysérülésekre jellemző mikroglia aktiváció vizsgálatára. Ezt igazolja, hogy a mikroglia TLR4 alapú aktivációja döntő szerepet játszik a kísérletes iszkémiás stroke-okozta sérülés progressziójában (Parada et al., 2019) vagy szubarachnoideális vérzést követően (Islam et al., 2022). Végül a kísérleteinkben tanulmányozott végpontok, mint a sejtalakváltozás, a fagocitotikus aktivitás, illetve a megváltozott proteomikai mintázat megbízható indikátorai a mikroglia aktivációnak (Szabo and Gulya, 2013; Flowers et al., 2017; Maguire et al., 2022).

Eredményeink szerint, aktivált mikroglia kultúrákhoz adva, a DMT 20 és 50 μM koncentrációban nyúlványozottabb sejtalakot eredményezett. A nyugvó mikroglia általában gazdagon elágazó, az aktivált mikroglia pedig amőboid alakot vesz fel. A DMT ugyancsak 20 és 50 μM koncentrációban csökkentette a kultúrában azon sejtek arányát, amelyek fagocitózist folytattak, amit fluoreszcens szintetikus polimer mikrogyöngyökkel tettünk láthatóvá. Az eredmények összességében arra utalnak, hogy a DMT a mikroglia aktivációt csökkenti. A mikroglia aktiváció itt megfigyelt gátlása megfelel azon korábbi eredményeknek, amelyek szerint a DMT védő hatású volt hipoxiának kitett monocita eredetű makrofág kultúrákon (Szabo et al., 2016). A DMT célpontjaként számon tartott Sig-1R agonizmusa más szintetikus hatóanyagokkal (SKF10047) szintén gátolta a mikroglia aktivációját és M1-es polarizációját (Ooi et al., 2021). A mikroglia károsító mértékű hipoxiának kitett kultúrákban a Sig-1R agonizmusa pentazocinnel kivédte a mikroglia pusztulást (Heiss et al., 2016). A Sig-1R agonizmusa DMT-vel tehát a mikroglia sejtekre nézve letális körülmények között protektív lehet mikroglia aktivációt kiváltó stimulus jelenlétében, ahogy a jelen kísérletek is szemléltetik, a DMT a mikroglia aktivációját gátolhatja. Végül *in vivo* nyert eredményekkel összevetve, fokális agyi iszkémia rágsáló modelljében a DMT gátolta a pro-inflammatorikus citokinek, köztük a TNF- α mRNS-ének átíródását, így anti-neuroinflammatorikus hatásról számoltak be (Nardai et al., 2020). Eredményeink alapján elképzelhető, hogy a DMT neuroinflammáció elleni védő hatása kísérletes stroke-ban a mikroglia sejteken, a mikroglia aktiváció gátlásával direkt érvényesült.

Az átfogó proteomikai analízisünk eredményei jelzik azt, hogy a DMT a mikroglia sejtek fehérje-kifejeződését potensen megváltoztatja. Eredményeink ezen a téren egyediek, és úttörő jellegűek. Azon fehérjék közül, amelyek kifejeződése LPS hatására emelkedik, majd ezt a DMT gátolja, többek között az iNOS-t és a PLA2-t azonosítottuk. Az iNOS a nitrogén-monoxid (NO) bioaktív szabad gyök termelődését katalizálja. Élettani körülmények között a mikroglia nem expresszál iNOS-t, de gyulladásos körülmények között az aktivált mikroglia kifejezi iNOS-t egerben, patkányban és az emberben is (Galea et al., 1992). Az iNOS fehérje átírásának gátlása aktivált mikrogliaiban DMT-vel eddig nem volt ismert. A PLA2 upregulációja az iNOS-hoz hasonlóan ugyancsak a gyulladásos állapotokra jellemző. A PLA2 katalizálja az arachidonsav felszabadulását a gyulladásos lipidmediátorok, így a prosztanoidok előállításához, és kulcsfontosságú a különböző gyulladásos folyamatokban. Mikroglia sejtekben a PLA2 farmakológiai gátlása megakadályozta a ROS termelést és a pro-inflammatorikus citokinek szekrécióját (Yang et al., 2009). A PLD3 5'-3' exonukleáz a lizoszomális nukleinsavbontás enzime, amelyet autoimmun gyulladásos betegségekkel hoztak

összefüggésbe. A PLD3 a nukleinsavak hasítása révén gátolja az autoimmun gyulladásos reakciókat (Gavin et al., 2021). Mikroglia kultúráinkon LPS hatására a PLD3 fehérje mennyisége csökkent, majd DMT hozzáadása emelte a PLD3 szintjét. Ez az eredményünk szintén eredeti. A szelektív fehérjékre vonatkozó megfigyeléseink is igazolják, hogy a DMT kezelés a gyulladásos folyamatokban résztvevő fehérjék szintjét szabályozva hat a mikroglia aktiváció ellen.

Összefoglalva, a mikroglia aktiváció morfológiai és funkcionális jellemzésével, illetve proteomikai analízissel bizonyítottuk, hogy az LPS-sel aktivált primer mikroglia kultúrákon a DMT gátolta a mikroglia aktivációt. Ezek a megfigyelések a gyógyszerhatóanyagfejlesztésben hasznosulhatnak olyan betegségek gyógyítására, amelyekben a neuroinflammáció rontja a felépülés esélyeit. A DMT a közelmúltban a gyógyszergyártó cégek figyelmét is felkeltette, a kanadai Algernon Pharmaceuticals (<https://www.algernonpharmaceuticals.com/about>) a stroke gyógyításában teszteli a DMT-t (<https://www.algernonpharmaceuticals.com/pipeline/ap-188-dmt>), a DMT alkalmazásának felmérése jelenleg a klinikai 1-es fázisában tart. Kísérleti eredményeink így klinikai potenciállal bírnak, és hozzájárulnak a DMT hatásmechanizmusának pontosabb megértéséhez.

7. Irodalomjegyzék

Appireddy RM, Demchuk AM, Goyal M, Menon BK, Eesa M, Choi P, Hill MD. Endovascular therapy for ischemic stroke. *J Clin Neurol*. 2015 Jan;11(1):1-8. doi: 10.3988/jcn.2015.11.1.1. Epub 2015 Jan 2. PMID: 25628731; PMCID: PMC4302170.

Balbi M, Bonanno G, Bonifacino T, Milanese M. The Physio-Pathological Role of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Expressed by Microglia in Health and Disease with a Focus on Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 9;24(6):5240. doi: 10.3390/ijms24065240. PMID: 36982315; PMCID: PMC10048889.

Barker SA. N, N-Dimethyltryptamine (DMT), an Endogenous Hallucinogen: Past, Present, and Future Research to Determine Its Role and Function. *Front Neurosci*. 2018 Aug 6;12:536. doi: 10.3389/fnins.2018.00536. PMID: 30127713; PMCID: PMC6088236.

Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Oct 10;5(1):70. doi: 10.1038/s41572-019-0118-8. PMID: 31601801.

Carbonaro TM, Gatch MB. Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. *Brain Res Bull*. 2016 Sep;126(Pt 1):74-88. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.016. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27126737; PMCID: PMC5048497.

Chao, C.C., Hu, S., Close, K., Choi, C.S., Molitor, T.W., Novick, W.J., Peterson, P.K., 1992. Cytokine release from microglia: differential inhibition by pentoxifylline and dexamethasone. *J. Infect. Dis.* 166 (4), 847–853. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.4.847>.

Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35:441-468. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28226226; PMCID: PMC8167938.

Domínguez-Clavé E, Soler J, Elices M, Pascual JC, Álvarez E, de la Fuente Revenga M, Friedlander P, Feilding A, Riba J. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Res Bull*. 2016 Sep;126(Pt 1):89-101. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.002. Epub 2016 Mar 11. PMID: 26976063.

Eichhoff G, Brawek B, Garaschuk O. Microglial calcium signal acts as a rapid sensor of single neuron damage in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):1014-24. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.018. Epub 2010 Nov 5. PMID: 21056596.

Flowers, A., Bell-Temin, H., Jalloh, A., Stevens, S.M., Jr, Bickford, P.C., 2017. Proteomic analysis of aged microglia: shifts in transcription, bioenergetics, and nutrient response. *J. Neuroinflamm.* 14 (1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0840-7>.

Fontanilla, D., Johannessen, M., Hajipour, A.R., Cozzi, N.V., Jackson, M.B., et al., 2009. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science* 323 (5916), 934–937. <https://doi.org/10.1126/science.1166127>.

Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014 Jun;49(3):1422-34. doi: 10.1007/s12035-013-8620-6. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24395130; PMCID: PMC4012154.

Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15;89(22):10945-9. doi: 10.1073/pnas.89.22.10945. PMID: 1279698; PMCID: PMC50459.

Gavin AL, Huang D, Blane TR, Thinnes TC, Murakami Y, Fukui R, Miyake K, Nemazee D. Cleavage of DNA and RNA by PLD3 and PLD4 limits autoinflammatory triggering by multiple sensors. *Nat Commun*. 2021 Oct 7;12(1):5874. doi: 10.1038/s41467-021-26150-w. PMID: 34620855; PMCID: PMC8497607.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):918-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.016. PMID: 20303880; PMCID: PMC2873093.

GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol*. 2021 Oct;20(10):795-820. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34487721; PMCID: PMC8443449.

Hanani M, Verkhatsky A. Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochem Res.* 2021 Oct;46(10):2525-2537. doi: 10.1007/s11064-021-03255-8. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33523395.

Hayashi, T., 2015. Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotherapeutic drugs. *J. Pharmacol. Sci.* 127 (1), 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.07.001>.

Heiss K, Vanella L, Murabito P, Prezzavento O, Marrazzo A, Castruccio Castracani C, Barbagallo I, Zappalà A, Arena E, Astuto M, Giarratano A, Li Volti G. (+)-Pentazocine reduces oxidative stress and apoptosis in microglia following hypoxia/reoxygenation injury. *Neurosci Lett.* 2016 Jul 28;626:142-8. doi: 10.1016/j.neulet.2016.05.025. Epub 2016 May 18. Erratum in: *Neurosci Lett.* 2023 Jun 11;807:137247. PMID: 27208832.

Islam, R., Vrionis, F., Hanafy, K.A., 2022. Microglial TLR4 is critical for neuronal injury and cognitive dysfunction in subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit. Care.* 37 (3), 761–769. <https://doi.org/10.1007/s12028-022-01552-w>.

Kaplan-Arabaci O, Acari A, Ciftci P, Gozuacik D. Glutamate Scavenging as a Neuroreparative Strategy in Ischemic Stroke. *Front Pharmacol.* 2022 Mar 23;13:866738. doi: 10.3389/fphar.2022.866738. PMID: 35401202; PMCID: PMC8984161.

Kata D, Földesi I, Feher LZ, Hackler L Jr, Puskas LG, Gulya K. A novel pleiotropic effect of aspirin: Beneficial regulation of pro- and anti-inflammatory mechanisms in microglial cells. *Brain Res Bull.* 2017 Jun;132:61-74. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.009. Epub 2017 May 18. PMID: 28528204.

Kata D, Földesi I, Feher LZ, Hackler L Jr, Puskas LG, Gulya K. Rosuvastatin enhances anti-inflammatory and inhibits pro-inflammatory functions in cultured microglial cells. *Neuroscience.* 2016 Feb 9;314:47-63. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.053. Epub 2015 Nov 26. PMID: 26633263.

Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020 Nov 26;9(1):42. doi: 10.1186/s40035-020-00221-2. PMID: 33239064; PMCID: PMC7689983.

Luna, L.E., 2011. Indigenous and mestizo use of ayahuasca: an overview. In: Dos Santos, R.G. (Ed.), *The Ethnopharmacology of Ayahuasca*. Transworld Research Network, Kerala, pp. 1–21.

Maguire, E., Connor-Robson, N., Shaw, B., O'Donoghue, R., Stoberl, N., Hall-Roberts, H., 2022. Assaying microglia functions in vitro. *Cells* 11 (21), 3414. <https://doi.org/10.3390/cells11213414>.

McKee, C.G., Hoffos, M., Vecchiarelli, H.A., Tremblay, M.E., 2023. Microglia: A pharmacological target for the treatment of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 14, 1125982 <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1125982>.

Nardai, S., Laszlo, M., Szabo, A., Alpar, A., Hanics, J., et al., 2020. N,N-dimethyltryptamine reduces infarct size and improves functional recovery following transient focal brain ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 327, 113245. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113245>

Ooi K, Hu L, Feng Y, Han C, Ren X, Qian X, Huang H, Chen S, Shi Q, Lin H, Wang J, Zhu D, Wang R, Xia C. Sigma-1 Receptor Activation Suppresses Microglia M1 Polarization via Regulating Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact and Mitochondrial Functions in Stress-Induced Hypertension Rats. *Mol Neurobiol.* 2021 Dec;58(12):6625-6646. doi: 10.1007/s12035-021-02488-6. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34601668.

Parada, E., Casas, A.I., Palomino-Antolin, A., Gomez-Rangel, V., Rubio-Navarro, A., Farré-Alins, V., Narros-Fernandez, P., Guerrero-Hue, M., Moreno, J.A., Rosa, J.M., Roda, J.M., Hernandez-García, B.J., Egea, J., 2019. Early toll-like receptor 4 blockade reduces ROS and inflammation triggered by microglial pro-inflammatory phenotype in rodent and human brain ischaemia models. *Br. J. Pharmacol.* 176 (15), 2764–2779. <https://doi.org/10.1111/bph.14703>.

Penke, B., Fulop, L., Szucs, M., Frecska, E., 2018. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.* 16 (1), 97–116. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170529104323>.

Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, Zhou LQ, Chen M, Tian DS, Wang W. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jul 6;7(1):215. doi: 10.1038/s41392-022-01064-1. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Aug 12;7(1):278. PMID: 35794095; PMCID: PMC9259607

Ren P, Wang J, Li N, Li G, Ma H, Zhao Y, Li Y. Sigma-1 Receptors in Depression: Mechanism and Therapeutic Development. *Front Pharmacol.* 2022 Jun 16;13:925879. doi: 10.3389/fphar.2022.925879. PMID: 35784746; PMCID: PMC9243434.

Suzumura, A., Ito, A., Yoshikawa, M., Sawada, M., 1999. Ibutilast suppresses TNF α production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS. *Brain Res.* 837 (1-2), 203–212. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01666-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01666-2).

Szabo A, Kovacs A, Riba J, Djurovic S, Rajnavolgyi E, Frecska E. The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary iPSC-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells. *Front Neurosci.* 2016 Sep 14;10:423. doi: 10.3389/fnins.2016.00423. PMID: 27683542; PMCID: PMC5021697.

Szabó Í, Varga VÉ, Dvorácskó S, Farkas AE, Körmöczy T, Berkecz R, Kecskés S, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Cozzi NV, Frecska E, Tömböly C, Krizbai IA, Bari F, Farkas E. N,N-Dimethyltryptamine attenuates spreading depolarization and restrains neurodegeneration by sigma-1 receptor activation in the ischemic rat brain. *Neuropharmacology.* 2021 Jul 1;192:108612. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108612. Epub 2021 May 21. PMID: 34023338.

Szabo, M., Gulya, K., 2013. Development of the microglial phenotype in culture. *Neuroscience* 241, 280–295. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.033>

Szabo, M., Lajkó, N., Dulka, K., Barczánfalvi, G., Lőrinczi B., Szatmári, I., Mihály, A., Vécsei, L., Gulya, K., 2023. The kynurenic acid analog SZR104 induces cytomorphological changes associated with the anti-inflammatory phenotype in cultured microglia. *Sci. Rep.* 13 (1), 11328 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38107-8>.

Uhlemann R, Gertz K, Boehmerle W, Schwarz T, Nolte C, Freyer D, Kettenmann H, Endres M, Kronenberg G. Actin dynamics shape microglia effector functions. *Brain Struct Funct*. 2016 Jun;221(5):2717-34. doi: 10.1007/s00429-015-1067-y. Epub 2015 May 20. PMID: 25989853.

Wendimu MY, Hooks SB. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022 Jun 30;11(13):2091. doi: 10.3390/cells11132091. PMID: 35805174; PMCID: PMC9266143.

Witting, A., Moller, " T., 2011. Microglia cell culture: a primer for the novice. *Methods Mol. Biol.* 758, 49–66. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3_4.

Yang CS, Yuk JM, Shin DM, Kang J, Lee SJ, Jo EK. Secretory phospholipase A2 plays an essential role in microglial inflammatory responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Glia*. 2009 Aug 1;57(10):1091-103. doi: 10.1002/glia.20832. PMID: 19115385.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Farkas Eszter professzorasszonynak és Pesti Istvánnak a szaktudásuk átadását, valamint a labormunka folyamán nyújtott technikai segítségeket, hasznos tanácsokat.

**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

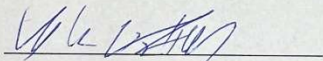
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Vinga Krisztián** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **A DMT hatásának vizsgálata kortikális mikroglia tenyészeteken** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat ^{1*}	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán [#] jellemezve)
A pályamunkában leírt sejtenyésztés elvégzése és kezelése	5
A pályamunkában leírt immunocitokémia elvégzése és az eredmények kiértékelése	5
Mikroszkóp használata	5
Fehérje mennyiségének meghatározása és az eredmények kiértékelése	4
A pályamunkában leírt western-blot reakciók elvégzése és az eredmények kiértékelése ³	2
Az adatok statisztikai feldolgozása ⁴	3
Az adatokhoz tartozó ábrák elkészítése	5

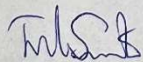
Kelt: 2024. 04. 16.

(Kérjük a dőlttel jelölt részeket értelemszerűen adják meg. A táblázat szükség szerint értelemszerűen módosítható).



Pályamunkát benyújtó hallgató (Vinga Krisztián)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Prof. Dr. Farkas Eszter, Sejtbiológia és
Molekuláris Medicina Tanszék)
aláírása

^{1*} Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható / bővíthető.