

Az intestinalis macrophagok és az enteralis idegrendszer szerepe a bél neuroimmunológiai kapcsolataiban

Alaputatás és klinikai vonatkozások

Dóra Dávid dr. ■ Kovács Tamás ■ Nagy Nándor dr.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest

Az emésztőrendszer megfelelő működése nélkülözhetetlen a tápanyagtranszportoz, a felszívódáshoz, az emésztéshez és a salakanyagok kiürítéséhez, de ezenfelül fontos feladata van a patogénekkal, allergénekkal és toxinokkal szembeni védelemben és a bélrendszer homeosztázisának fenntartásában. Ezeknek a feladatoknak a koordinációját a bél ideg- és immunrendszere szoros együttműködésben végzi a belső és külső környezethez való folyamatos alkalmazkodás révén. A bél élőhelyet és tápanyagokat szolgáltat a benne élő mikroorganizmusok számára, amelyek jelentős hatással vannak a tápcsatorna fejlődésére és annak funkcionális működésére. A bélcsatorna és a benne élő mikroorganizmusok közösen végzik el az emésztést, s látják el az immun-, neuroendokrin és ingerületátviteli funkciókat. Ezt az egymással morfofunkcionálisan együttműködő struktúrát hívjuk mikrobiom–bél–agy-tengelynek, melynek kiindulópontját az enteralis idegrendszer és a bél mononukleáris sejtjei között fennálló neuroimmunológiai interakciók szolgáltatják. Összefoglaló közleményünkben ennek a fellendülő tudományterületnek a legfontosabb és legfrissebb eredményeiről, aktuális kutatási témáiról számolunk be, kiegészítve azzal, hogy milyen klinikai vonatkozásai lehetnek a jövő orvoslásában a bél–agy–tengely patológiás működésének és a bélflóra megváltozásának. Orv Hetil. 2020; 161(19): 771–779.

Kulcsszavak: bélidegrendszer, macrophag, mikrobiom, bél–agy–tengely, bél-neuroimmunológia

The role of intestinal macrophages and the enteric nervous system in gut neuroimmunology

Basic science and clinical implications

A properly functioning gastrointestinal tract is essential for nutrient transport, absorption, digestion, and removal of metabolic waste, but protection from pathogens, allergens and toxins also belongs to its tasks, just as the constant homeostatic control and regulation of its internal microenvironment. The largest part of these functions is carried out by the continuously interacting enteric nervous and immune system, constantly adapting to internal and external stress. The intestines serve as a habitat for the microorganisms situated in their lumen, meanwhile the microbiota strongly influence the development, motility and immunological function of the gut. The gastrointestinal tract and its microbiota regulate digestion, immune, neuroendocrine and neural functions of the gut. These closely associated and cooperating structures are called together the microbiome–gut–brain axis. The basis of this interaction is considered to be the neuroimmunological crosstalk between the enteric nervous system and intestinal macrophages. In this review, we would like to summarize the most important and latest findings of this emerging field, including the possible clinical implications of pathological conditions caused by the elimination or radical change of commensal microbiota.

Keywords: enteric nervous system, macrophage, microbiome, gut–brain axis, neuroimmunology of the gut

Dóra D, Kovács T, Nagy N. [The role of intestinal macrophages and the enteric nervous system in gut neuroimmunology. Basic science and clinical implications]. Orv Hetil. 2020; 161(19): 771–779.

(Beérkezett: 2019. november 11.; elfogadva: 2020. január 7.)

Rövidítések

ADHD = (attention deficit hyperactivity disorder) figyelemhiányos hiperaktív rendellenesség; β 2AR = 2-es típusú béta-adrenerg receptor; BMP = (bone morphogenetic protein) csont morfogenetikus fehérje; CSF = (colony-stimulating factor) kolóniastimuláló faktor; DC = (dendritic cell) dendritikus sejt; ECM = extracelluláris mátrix; EGF = (epidermal growth factor) epidermalis növekedési faktor; EMP = (erythromyeloid precursor) erythromyeloid prekursor; ENS = (enteric nervous system) bélidegrendszer; FACS = (fluorescence-activated cell sorter) fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó; HPA axis = (hypothalamo–pituitary–adrenal axis) hypothalamus–hypophysis–mellékvese-tengely; IL = interleukin; IM = intraganglionaris macrophag; KIR = központi idegrendszer; KO = (knockout) génkiütéses; LpM = lamina propria macrophag; LPS = lipopoliszacharid; MALT = (mucosa-associated lymphoid tissue) nyálkahártyához társult nyirokszövet; MHC = (major histocompatibility complex) fő hisztokompatibilitási komplex; MM = muscularis macrophag; MRC1 = mannózeceptor-1; MyM = myentericus macrophag; SmM = submucosalis macrophag; TH = tirozin-hidroxiláz; TLR4 = (Toll-like receptor 4) Toll-szerű receptor-4; Treg = regulációs T-sejt

Az emésztőrendszer fiziológiás működésének és homeosztázisának fenntartásában közreműködő, szigorúan szabályozott folyamatoknak a legfontosabb szereplője a bélidegrendszer (ENS), mely az autonóm idegrendszer részeként a béltraktus mentén elhelyezkedő neuronok és gliasejtek kiterjedt és komplex hálózata. A központi idegrendszer (KIR) extrinuszik beidegzése befolyásolja a bélidegrendszer funkcióit, de a bél intrinuszik idegrendszere független működésre is képes. A központi és a perifériás idegrendszert, beleértve az ENS-t is, neuroectodermából származó neuronok és gliasejtek alkotják. A KIR gliasejtjei és neuronjai mellett a harmadik alkotóeleme a microglia, melyet először *del Rio-Hortega* írt le [1] mint egy rendkívül nyúlványos sejtípust. Az ENS-t az embriogenezis során az aktívan migráló ganglionlécsejtek hozzák létre, melyek az embrionális bélalba jutva neuronokká és gliasejteké differenciálódnak [2]. A központi idegrendszerrel ellentétben a bélidegrendszer microgliát nem tartalmaz. A myeloid sejtek mononukleáris vonalának szövetspecifikusan differenciálódó tagjai a macrophagok. Ez a legváltozatosabb haemopoeticus sejtcsoport, amely – phagocytafunkcióján kívül – a veleszületett immunitás központi irányítója. Az antigénprezentációban és a gyulladás patogenezisében kulcsfontosságú szerepet játszó macrophagprekursorokból differenciálódnak az első dendritikus sejtek (DC) is [3]. A bélhuzam mucosalis epitheliuma által végzett szekréciós és abszorptív működésén kívül jelentős immunológiai funkcióval is bír. Az intestinalis szekunder nyirokszerveken (appendix vermiformis, Peyer-plakkok) kívül a béltraktus nyálkahártyájának teljes hosszában azonosítható egy olyan nyirokszövet (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT), amely a szervezetben a fontos immunológiai barrier szerepét tölti be.

Az embrionalis bélcső mesenchymalis alapszövetét is nyúlványos CD45+ sejtek kolonizálják [4]. Ebből a korai haemopoeticus sejtpopulációból differenciálódnak az intestinalis macrophagok heterogén csoportja, a bél veleszületett immunitásának és antigénprezentációs működésének központi szereplői. Feltételezik, hogy az enterális neuronok és macrophagok között fennáll egy neuroimmunológiai kapcsolat, melynek fontos szerepe lehet a gastrointestinalis traktus motilitásának szabályozásában [5, 6]. Madár- és egérembrionokon végzett vizsgálataink alapján a myeloid sejtek a bélidegrendszer ganglionjaiban, valamint a vastagbélhez asszociált Remak-féle ganglionban is rendszeresen előfordulnak [7]. Ezek a megfigyelések felvetették annak lehetőségét, hogy az enterális ganglionokban a ganglionléc-eredetű neuronokon és gliasejteken kívül egy harmadik sejtpopuláció is létezik. Ezek a haemopoeticus eredetű nyúlványos sejtek az enterális neuronokat és gliát körbefonva, a ganglionokat a környezetüktől elhatároló extracelluláris mátrixban (ECM) gazdag tokon [8] belül helyezkednek el, és microgliára specifikus (MHCII, CSF1R, Iba1, CD11b, F4/80) sejt felszíni markereket expresszálnak [7, 9].

Macrophagpopulációk a bélben

A mononukleáris phagocyták egyik populációja a bélfalban, közvetlenül a mucosalis epithelium alatt fordul elő, és folyamatos kapcsolatban áll a lumen mikrobiális környezetével. A nyálkahártya területét kolonizáló lamina propria macrophagokon (LpM) kívül submucosalis macrophagokat (SmM) és muscularis macrophagokat (MM) különböztetünk meg [10]. A MM-oknak az ENS myentericus plexusával és ganglionjaival szoros kapcsolatban álló csoportját nevezzük myentericus macrophagoknak (MyM) [6, 10]. Amíg a nyálkahártya területén a macrophagok alapvető feladata a phagocytosison kívül a homeosztázis fenntartása, valamint a szöveti regeneráció és átépülés szabályozása, addig a DC-k a lumenális antigéneket prezentálják a T-sejteknek, és működésükkel folyamatos immunológiai „surveillance” funkciót töltenek be [11]. A T-sejtek aktivációja útján innen indul az adaptív immunválasz a patogén mikroorganizmusok eltávolítására, de a T-lymphocyták közvetítik az aktív immuntoleranciát is az ártalmatlan commensalis flóra védelme érdekében. Az intestinalis DC-eket a következőkben, ontogenezisük és immunfenotípusuk alapján, egy specializált macrophag-szubpopulációnak tekintjük.

A DC-k a többi macrophaghoz hasonlóan CD45+ haemopoeticus eredetű sejtek, melyekre az MHCII-molekula konstitutív expressziója jellemző, és kifejezik a CD11c integrint is [12]. A Peyer-plakkok, az appendix vermiformis és a mesenterialis nyirokcsomók follicularis DC-inek immunfenotípusa többnyire ismert [13], de a nyiroktüszőkön kívül elhelyezkedő, a bélnyálkahártyát átszövő DC-k hálózatáról kevesebbet tudunk. A mucosalis DC-k – az alapján, hogy az MHCII és a CD11c mellett kifejezik-e a fraktalkin kemokin receptorát, a

CX3CR1-et, illetve az alpha-E integrint (CD103) – két csoportra oszthatók: a vékonybélre jellemző CD11b+CD103+CX3CR1–, illetve a vastagbélben koncentrálódó CD11b+CD103–CX3CR1+ DC-kre [10, 14, 15].

Immunfenotípusuk alapján a bél mucosalis macrophagjait nehéz elkülöníteni a DC-ktől; a különbség annyi, hogy a macrophagok a CD11c pan-DC markert csak alacsony mértékben expresszálják, és kifejezik a DC-kre nem jellemző F4/80 (EGF-szerű modul tartalmazó mucinszerű hormon receptor-1) molekulát. A CX3CR1-expresszió általában hiányzik ezeken a sejteken, bár a mucosában a határvonal nem éles a DC-k és a macrophagok között: sok CX3CR1-F4/80 kettősen pozitív mucosalis DC ugyanis a macrophagokra jellemző citoplazmatikus vakuólumokkal rendelkezik, és *in vitro* erős phagocytoticus aktivitást mutat, ami a klasszikus DC-kre nem jellemző [10, 16]. Az aktív phagocytafunkció az intestinalis macrophagok olyan közös tulajdonsága, mely egyértelműen elkülöníti őket a DC-ktől, és ezt a különbséget phagocytosis-asszociált génjeik (MERTK, CD206, GAS6, ITGAV, ITGB5) magas expressziós szintje is alátámasztja [17]. A LpM közvetlen subepithelialis pozíciója képessé teszi őket a lumenális baktériumokból való mintavételre, melynek során ún. transepithelialis dendriteket képesek formálni az epithelsejteken keresztül, a köztük található 'tight junction'-ök és hámbARRIER megzavarása nélkül. A folyamat a CX3CR1–CX3CL1 receptor–ligand interakció és kémiai szignalizációs tengely útján történik [18]. A CX3CR1+ mucosalis macrophagoknak kiemelt szerep jut az orális tolerancia kialakításában, melynek során a felvett antigéneket connexin-43-dependens réskapcsolatokon (gap junction) keresztül transzportálják a CD11c+CD103+ DC-khez. Azokban a Cre-lox konstrukción alapuló transzgenikus egérmodellekben, melyekben a DC-k nem expresszálják a connexin-43 fehérjét, nem alakul ki orális tolerancia [19]. A MM-ok a közvetlen lumenális eredetű antigénektől távolabb, a körkörös és hosszanti simaizomrétegben ágyazva fordulnak elő. CD45- és MHCII-pozitivitásuk mellett magas CD11b- és F4/80-expressziót mutatnak [20], viszont nem fejezik ki a CD103 antigént. Magas CX3CR1-expressziójuk a LpM-októl, alacsony CD11c-expressziós szintjük pedig a mucosalis DC-ktől különíti el őket [10]. A MM-ok nyúlványai kiterjedtebb ramifikációval rendelkeznek, mint a LpM-ok, viszont életciklusuk folyamán alig változtatnak helyet. Morfológiailag kétféle MM létezik: bipoláris, két hosszú, sejttesttel párhuzamos nyúlvánnyal vagy csillag alakú (stellate MM), microgliára jellemző dendritikus arborizációval rendelkező sejt [6, 21]. Madár- [7] és emlősbélben [20] is megfigyelték, hogy a MM-sejtek rétegekben helyezkednek el a serosa és a hosszanti izomréteg, a hosszanti és a körkörös izomréteg, illetve a külső és a belső körkörös simaizomréteg között. Egy korábbi tanulmány MHCII-pozitivitásuk és nyúlványos morfológiájuk alapján még DC-ként utalt rájuk [22]. Feltételezik,

hogy embrionálisan az intestinalis macrophagok – a microgliához hasonlóan – szikhólyagi erythromyeloid prekursorokból (EMP-kból) differenciálódnak, a születés után azonban mikrobiális változások hatására lecserélődnek a vérben keringő, csontvelői eredetű monocytákra [23].

Fontos kiemelni, hogy a mucosalis és a muscularis macrophagok nemcsak morfológiájukban és immunofenotípusukban térnek el egymástól, hanem fiziológiás és gyulladásos állapotokban is eltérő génexpressziós profillal és funkcióval rendelkeznek. Transzkriptomszintű vizsgálatok kimutatták, hogy a LpM-ok főleg proinflammatorikus faktorok génjeit expresszálják és M1-fenotípust mutatnak, a MM-oknak pedig antiinflammatorikus, citoprotektív szerep jut, ami az alternatív macrophagaktivációra jellemző, M2-fenotípust jelenti [24]. A LpM-ok aktív barrierfenntartó és védelmi funkciójára utal konstitutív IL10-szekréciójuk, mely az alternatív macrophagaktiváció fő mediátora [25]. Nemrégiben további LpM-alpopulációkat is sikerült azonosítani: a mucosa Lieberkühn-cryptáinak bázisán, illetve az elszórt folliculusok közelében előforduló CD169+ phagocytasejteket, és a bélhuzam commensalis flórában gazdag területein akkumulálódó TIM4+CD4+ LpM-sejteket [26]. A TIM4 egy apoptózismediátorként működő foszfatidil-szerin-receptor, melyet olyan mononukleáris sejtpopulációk expresszálnak, mint a peritonealis macrophagok [23] vagy a DC-k [27]. Ezenfelül transzgenikus egerek sublethális besugárzását követő csontvelőkiméra-kísérletek és a kimerikus egerek FACS-analízise a bélfalban 3-féle macrophagpopulációt különített el a TIM4 és a CD4 sejtfelszíni molekulák expressziója alapján: 1) egy radiorezisztens, önfenntartó TIM4+CD4+ populációt, melynek tagjai egyáltalán nem cserélődnek le a donor vérképző őssejtjeire a csontvelő-transzplantáció után; 2) egy TIM4–CD4+ lassan megújuló, de a donormonocyták által részben lecserélődő sejtcsoportot; 3) és a TIM4–CD4– sejteket, melyek az irradiált recipiens állatokban teljesen lecserélődtek donor haemopoeticus sejtekre [26].

Továbbá *in vivo* sejt követéses és funkcionális vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a MM-ok egy-egy, a submucosalis és myentericus plexushoz szorosan asszociált populációja a microgliához hasonlóan [28] radiorezisztens, lokális önmegújulásra képes populációt képez, melynek szelektív blokkolása negatív hatással van a bélmotilitásra [9]. Ez az önfenntartó (self-maintaining) intestinalis macrophagpopuláció 5, anatómiailag jól elkülöníthető területet kolonizál a bélfalban: a muscularis externát, a plexus submucosust, a mucosalis erek és a Paneth-sejtek környékét, illetve a Peyer-plakkokat. A muscularis externában az összes ilyen típusú macrophag a MyM-ok populációjából kerül ki, és szoros kapcsolatban áll a plexus myentericus rostjaival és sejtes elemeivel. Az önfenntartó populáció szelektív genetikai depléciója a submucosalis érhálózat morfológiai abnormalitásait, a vascularis permeabilitás növekedését, valamint az enterális neuronok

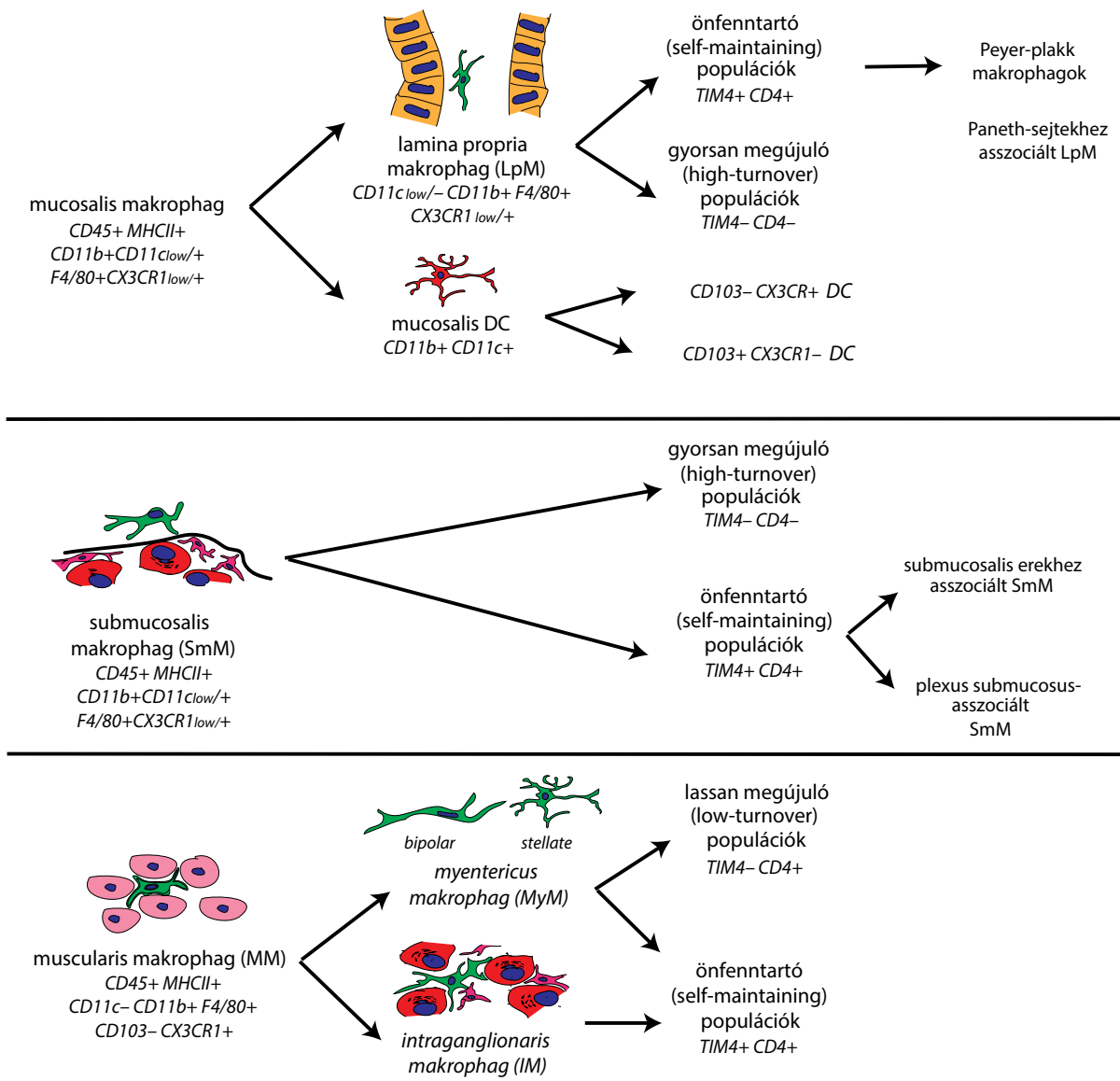
számának csökkenését és diszmotilitást okoz [9]. Ret-KO transzgenikus egereken és Hirschsprung-kóros humán biopsziákon végzett immuncitokémiai vizsgálatok alapján a MM-populáció az intestinalis traktust az ENS hiányában is kolonizálja [29]. A bélfal macrophagpopulációit az 1. ábra foglalja össze.

Macrophag–neuron párbeszéd a gastrointestinalis traktusban

A béltraktus simaizomrétegének (muscularis externa) alternáló, perisztaltikus összehúzódásai felelősek a tápanyagtranszportért és a salakanyag-ürítéshez nélkülözhetetlen gastrointestinalis motilitásért, melyet az ENS intrinuszik rendszere szabályoz. Az enterális ganglionok neuronjai, bár kapnak extrinuszik beidegzést az autonóm

idegrendszer szimpatikus és paraszimpatikus rostjai által, mégis képesek önálló egységként működni, ami miatt gyakran nevezik a bélidegrendszert a „második agynak” [2].

Míg a mucosalis macrophagoknak a bél immunitásában és a nyálkahártya szekunder nyirokszövetében betöltött szerepéről nagy mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésre, addig a muscularis externa macrophagjairól sokáig kevés szó esett. A mononukleáris sejtvonal két alapvető túlélési faktora az FLT3 és a CSF1. Az FLT3 a DC-k, míg a CSF1 a MM-ok túléléséhez szükséges, amit az is bizonyít, hogy a CSF1 receptorát érintő, CSF1R – KO egerekben, valamint CSF1R-blokkoló ellenanyag intraperitonealis alkalmazása után a muscularis externából eltűnnek a macrophagok [10]. Míg CSF1R-blokkoló ellenanyag hatására a MM-sejtek 80%-os depléciót



1. ábra | Macrophagpopulációk lokalizáció és immunofenotípus alapján az egérbélben (saját készítésű ábra)
DC = dendritikus sejt; + = erős expresszió; low = alacsony expresszió; - = nincs expresszió

mutatnak, addig a LpM-populációra nincsenek drasztikus hatással a depléciós kezelések [5].

A BMP típusú növekedési faktorok szintén szerepet játszanak a MM-ok és az ENS kölcsönhatásában. A BMP2 és receptora jól ismert molekulák az embrionális simaizom és ENS fejlődésében és organizációjában [30, 31]. A BMP2 expressziója specifikus a MM-okra a bél simaizomrétegében, illetve a BMP-jelátvitel dosomorphinnal való blokkolása, a CSF1R-blokkáddal elért MM-deplációhoz hasonlóan, diszmotilitást és elnyújtott intestinalis tranzitidőt idéz elő egerekben [5]. CSF1R-ellenes ellenanyaggal kezelt egerek *ex vivo* vastagbéltenyésztésében BMP2 hozzáadásával csökkenteni lehet a MM-depláció okozta motilitászavart [5]. A simaizomréteg MM-jai által termelt BMP2 az enterális neuronok BMPII-receptorára hat. A receptor ligandkötését követően egy SMAD foszforilációs kaskád indul el, ami a MM-ok enterális neuronokra gyakorolt, BMP2 által közvetített konstitutív aktivációjára utal [5]. Az idézett tanulmány szerint az ENS egy macrophag–neuron párbeszéd részeként „cserébe” CSF1-et termel, biztosítva a MM-populáció túlélését. Későbbi kutatások viszont arra vetettek fényt, hogy ENS hiányában is kolonizálják a beltet MM-ok, és a CSF1-et döntően nem az ENS neuronjai, hanem a nyálkahártya sejtjei termelik [29].

A béltraktus megfelelő motilitásához az intestinalis macrophagok és az ENS molekuláris kölcsönhatásán kívül a lumenális mikrobiális flóra jelenléte is szükséges, amit az is alátámaszt, hogy a csíramentes környezetben nevelt [32] és TLR4 (Toll-like receptor 4) génkiütött homozigóta egerekben súlyos intestinalis diszmotilitás alakul ki [33]. A csíramentes és antibiotikummal kezelt TLR4-KO mutáns egerekben a csökkent bélmozgás egyik okának a ganglionok neuralis fenotípusának megváltozását tartják, ami kiváltképpen a nitrerg idegsejtek számának csökkenésével jár [33]. Egerek antibiotikus kezelése *in vivo* egyértelműen csökkenti a BMP2 expressziós szintjét, aminek az oka a MM-populáció deplíciója. A BMP2 hiányának következményeképpen a pSMAD1/5/8-pozitív enterális neuronok száma is csökken a béltraktusban. A commensalis flóra, a macrophagok és az ENS direkt kapcsolatára utal az az eredmény is, mely szerint ha primer enterális neuronok sejt-kultúrájához lipopoliszacharidot (LPS, infekció folyamán szétteső baktériumokból felszabaduló, szisztémás gyulladási mediátor) adunk, az növeli a neuronok CSF1-szekrúcióját [5]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az egészséges bélmotilitás fenntartásához a MM-ok és az enterális neuronok commensalis flóra általi folyamatos immunológiai stimulációja szükséges.

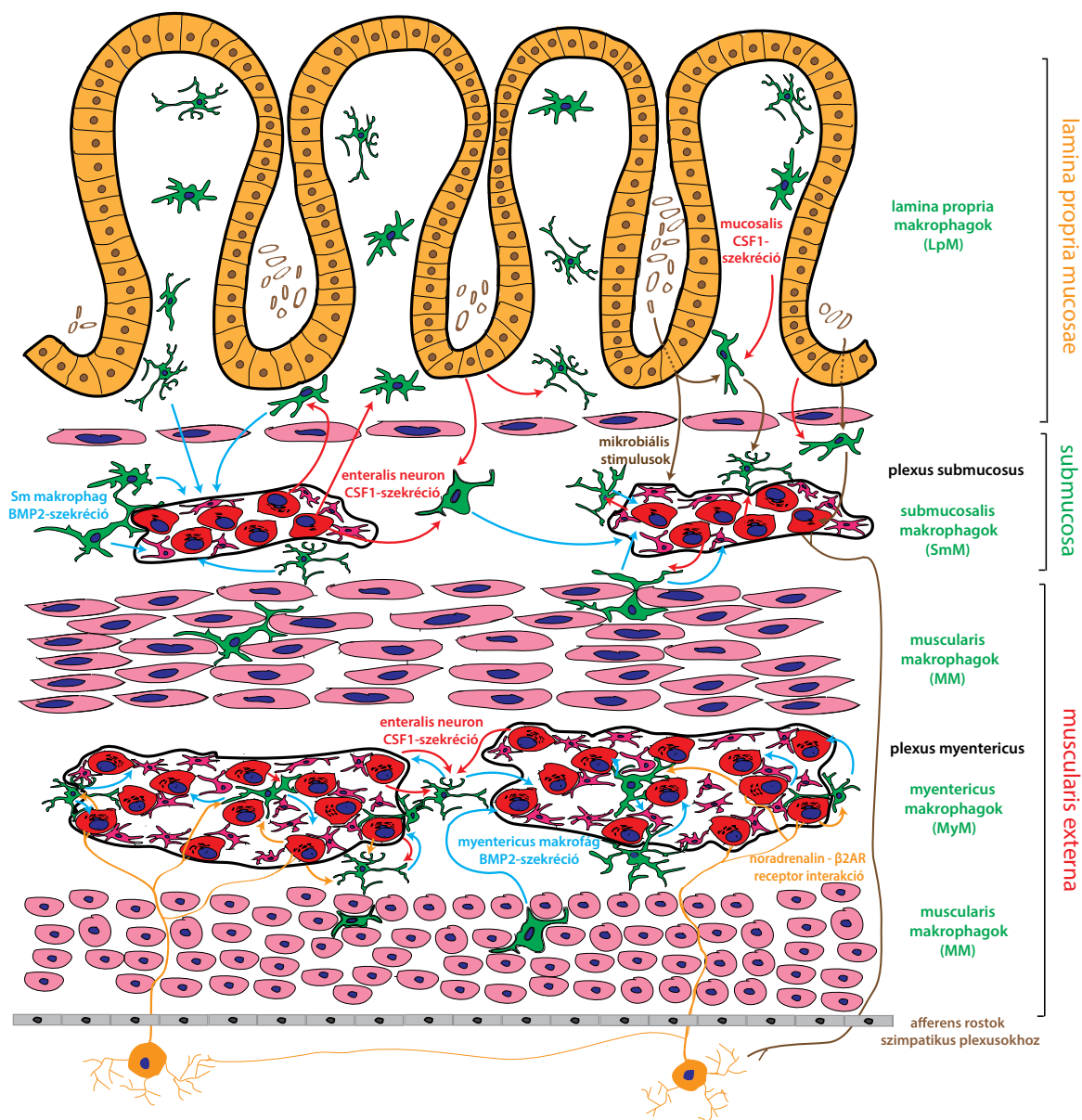
A MM-oknak egy, az ENS myentericus plexusával szoros kapcsolatban előforduló populációja, a MyM-ok a β 2-adrenerg receptor (β 2AR) magas expressziós szintjét mutatják. A receptor ligandjának, a noradrenalin fő forrásának tirozin-hidroxiláz- (TH, a noradrenalin szintézisét végző enzim) pozitív, extrinszik szimpatikus neuronok bizonyultak, melyeknek centrális nyúlványai a

muscularis rétegen kívülről, a serosán áthaladva kerülnek közelségbe az enterális neuronokkal és a MyM-okkal. A TH+ neuralis nyúlványok nem érnek el a lamina propria-ba [6]. A bélfal katecholaminerg aktivációja döntően a ganglion celiacum és a ganglion mesenterica superior területéről induló postganglionaris szimpatikus rostok által történik [6]. A bélfal noradrenerg szimpatikus aktivációja elsősorban a normális motilitáshoz szükséges simaizom-relaxációhoz járul hozzá, viszont enterocolitist kiváltó bakteriális faj (például *Salmonella typhimurium*) orális adminisztrációja következtében a muscularis externában erős noradrenerg aktiváció zajlik le, melynek forrása a ganglion celiacum és a ganglion mesenterica superior [34]. A felszabaduló noradrenalin – a MM-ok β 2AR-ára fejtvé ki hatását – közvetett módon képes szabályozni a bélmotilitást [6]. Intestinalis infekció vagy az adrenerg agonista szalbutamol hatására bekövetkező β 2AR-aktiváció a MM-ok génexpressziós profiljában is változásokat indukál, beindítva az alternatív macrophag-aktivációs útvonalat, melynek során a sejtek antiinflammatorikus, citoprotektív mediátorokat kezdenek felszabadítani, a proinflammatorikus faktorok pedig downregulálódnak [6]. Más vizsgálatok azt is megmutatták, hogy a bélfal extrinszik és intrinszik afferens rostok által beidegzett nociceptorai mikrobiális stimuláció hatására génexpressziós változások indukciójára képesek a Treg (regulatív T-sejtek) sejtekben [35]. Egy intestinalis *ex vivo* kísérleti rendszer *Clostridium ramosum* baktériummal történő fertőzése alapján azt feltételezik, hogy bizonyos mikrobák képesek közvetlen módon aktiválni a bél nociceptív szenzoros rostjait és ezzel beindítani a korai gyulladási és fájdalomi választ emésztőrendszeri infekciók esetében [35]. A béltraktusban zajló neuroimmunológiai interakciókat a 2. ábra foglalja össze.

A mikrobiom szerepe és a bél–agy–tengely

Bél–agy–tengelynek (gut–brain axis) nevezzük az intestinalis lumenben élő mikrobiális populációk összességének, illetve a bél immun- és idegrendszerének azon kapcsolatát, amely a központi idegrendszerrel folyamatos kommunikációban áll, és változást idézhet elő annak működésében. Tágabb értelemben idetartozik még a neuroendokrin és neuroimmun-rendszer is, így a hypothalamus–hypophysis–mellékvese-tengely (HPA axis); az autonóm idegrendszer szimpatikus és paraszimpatikus ága, beleértve a bélidegrendszert és a nervus vagust. A bél–agy–tengely kapcsolat létezésére utaló első kísérleteket már Pavlov elvégezte, melyek során arra jött rá, hogy bizonyos érzékszervi jelek, mint például az élelmszer szaga és látványa, még a falat szájüregbe való bejutása előtt megindítja a gyomor és hasnyálmirigy szekrúciós működését.

Egy 2004-es tanulmány mutatott rá arra, hogy csíramentes környezetben tartott egerek stresszre fokozott HPA-tengely-választ adnak [36]. A mikrobiom szerepét a bél–agy–tengelyen belül már különböző kísérleti



Jelmagyarázat:



2. ábra

Neuroimmunológiai interakciók a bélben (saját készítésű ábra)

A hosszanti és körkörös simaizomréteg (rózsaszín) területén és a közéjük ékelte myentericus ganglionokon belül és környezetükben a muscularis (MM), myentericus (MyM) és intraganglionaris (IM) makrophagok (zöld) bone morphogenetic protein 2-t (BMP2) termelnek (kék nyilak), mely az enterális neuronok (piros) BMP2-receptorain kifejtve hatását képes a bélfal kontrakcióját előidézni. Hasonló interakció zajlik a submucosában a submucosális makrophagok (SmM) és a plexus submucosus neuronjai között. Az enterális plexus neuronjai és a mucosa sejteji kolóniastimuláló faktor 1-et (CSF1) termelnek (piros nyíl), mely a makrophagok alapvető túlélési faktora. A nyálkahártya és a submucosa makrophagjai képesek a luminális antigén-ingerre hatására aktiválni (barna nyíl) a plexus submucosus és myentericus neuronjait, melyek afferens rostjaikkal (barna axon) az extrinszik szimpatikus neuronokkal (sárga) szinaptizálnak. Ezek a szimpatikus neuronok centrális nyúlványaikkal beidegzik (sárga axonok) a myentericus ganglionok idegsejtjeit, közvetve befolyásolva ezzel a bélmotilitást

β2AR = 2-es típusú béta-adrenerg receptor; BMP2 = csont morfogenetikus fehérje-2; CSF1 = kolóniastimuláló faktor-1

állatokban is igazolták, illetve számos neuroaktív anyagot is leírtak, melyet a bélflóra termel. Az embereken végzett vizsgálatok ekkor kezdtek az érdeklődés középpontjába kerülni. Többek között felvetődött a bélflóra összetételének szerepe is különböző pszichiátriai és neurológiai állapotú betegeknél [37], az azonban máig sem teljesen tisztázott, hogy a bélflóra megváltozása a betegségek következménye, okozója vagy esetleg – bizonyos visszacsatolásokon keresztül a bél–agy-tengely közvetítése által – mindkettő [36]. A *Lactobacillus*- és *Bifidobacterium*-fajok GABA-t termelnek; befolyásolni képesek a gazdaszervezet társas viselkedését, így emberben is hozzájárulnak például a szorongás, a stressz és a depresszió tüneteinek enyhüléséhez, a felborult oxitocin-háztartás helyreállításához [38]. Egyes baktériumok a dopamin és a noradrenalin prekursorait aktiválják a bélben, míg mások szerotonint, acetil-kolint vagy hisztamint termelnek. Mindazonáltal egyelőre nem tudni, hogy a bél lumenében termelődött neurotranszmitterek milyen mértékű hatást gyakorolnak az agyra.

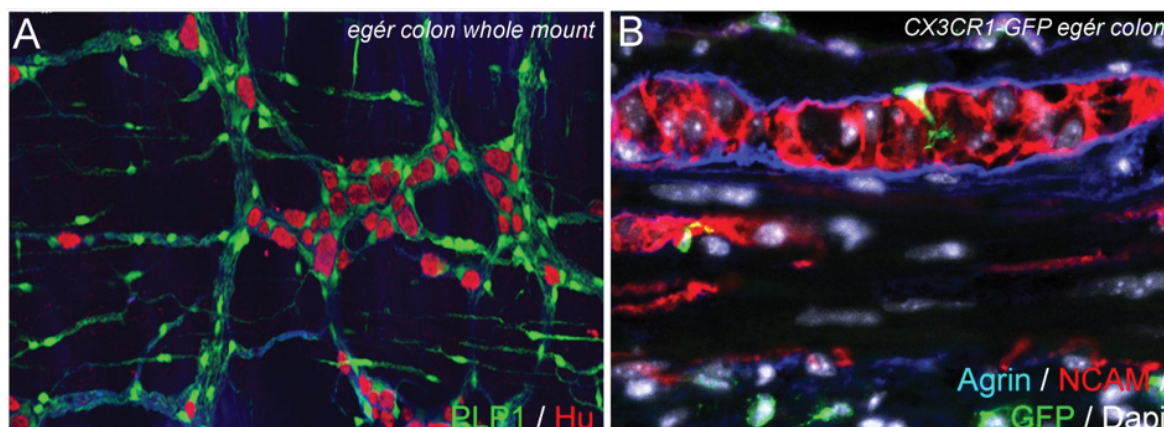
A bél–agy-tengely nemcsak a lokális funkciók ellátásában játszik fontos szerepet, hanem annál szélesebb körű hatásait is kezdjük egyre jobban megismerni. Egyre elfogadottabbá válik az a tény, hogy az emberi agy késői praenatalis, illetve korai postnatalis fejlődése és a mikrobiom változásai időben egybeesnek [39]. Az összefüggés azonban nem csak látszólagos: csíramentes egerekben agyi strukturális fejlődési rendellenességeket és abnormális mentális fejlődést egyaránt leírtak [40], mely akár a fetális microglia-populációk megváltozásának hatására is bekövetkezhet [41]. Az olyan környezeti hatások, amelyek megzavarják a normális bélflóra kialakulását (például maternális stressz, praenatalis fertőzések, antibiotikumhasználat) növelik az idegrendszeri és mentális fejlődési rendellenességek kockázatát [42]. Csíramentes egerek a zsigeri fájdalommal szemben érzékenyebbnak mutatkoztak, vad típusú egerekkel történő fekális transzplantáció után ez az érzékenyítés viszont megszűnt. Hasonló volt a helyzet antibiotikumkezelés vagy fertőzés hatására, mely állapotot probiotikumkezeléssel szintén sikerült helyreállítani [43]. A bélrendszert érintő fertőzések esetén hangulatváltozásokat is leírtak, gyakoribb lehet a szociális depriváció, a szorongás, illetve depressziós tünetek megjelenése, de ezek az eredmények a klinikai oldalról még megerősítésre várnak [44]. A mikrobiom, mely a bél–agy-tengelyen keresztül fejti ki hatását, a jövőben felvetődhet mint új terápiás célpont a mentális és neurológiai betegségekkel való közvetett kapcsolata miatt. Ezenkívül több pszichiátriai betegség és idegrendszeri fejlődési rendellenesség esetén mutatták már ki a bélflóra kóros megváltozását, így például bipoláris rendellenesség, skizofréria, autizmus és kóros figyelemhiányos tünetegyüttes (ADHD) esetében is [45].

A fent leírt betegségek és a mikrobiom kapcsolatának leírására számos hipotézis született, ezek közül a legfontosabbak az ún. „öreg barát” („old friend”) és „szivárgó bél” („leaky gut”) elmélet. Az előbbi – melyet „korai

immunkihívás” hipotézisnek is neveznek – kulcseleme a több tízezer éves koevolúció tápcsatornánk és a commensalis flóra elemei között [46]. A modern társadalomban végbement változások (egészségügy, életmód, táplálkozás) csökkentették kapcsolatunkat „öreg barátunkkal”, és ezáltal az immunológiai érési folyamatok is megváltoztak. Egyes szerzők szerint közvetett módon ez állhat az allergiás és autoimmun megbetegedések, valamint a krónikus gyulladós folyamatok megnövekedett száma mögött [47]. A „szivárgó bél” teória a barrierék (például a vér–agy-gát vagy akár az enterális ganglionokat határoló extracelluláris mátrix-kapszula) funkciójának csökkenésével kapcsolatos, mivel a megváltozó mikrobiom hatására a szoros kapcsolatok fellazulnak, és megváltozik az intestinalis permeabilitás is. Így a baktériumok transzlokációjának lehetősége megnő, emelkedik a keringő LPS és immunglobulin szintje, a vér–agy-gáton pedig akár ciklikus makromolekulák is átjuthatnak, ami idegrendszeri gyulladós folyamatokat generálhat [48]. Habár mindegyik elmélet kicsit máshova helyezi a fókuszot, de mindegyik felismeri az immunológiai diszfunkciót és a háttérben álló bél–agy-tengelybeli változásokat mint a betegségek közös hátterét. Ezek a változások pedig a bél–agy-tengely három fő útvonala közül (idegi, neuroendokrin és immunológiai) bármelyikén érvényesülhetnek.

Az intraganglionaris macrophagok és a microglia

A bevezetőben említett intraganglionaris macrophagok (IM) egy MM-populációt képeznek, és sejttestükkel a myentericus plexus enterális ganglionjait körülvevő extracelluláris mátrix tokján belül [8], a neuronok és a gliasejtek között helyezkednek el [7]. Habár a MyM-ok között jellemzőek olyan sejtek, melyek sejtteste a ganglionokon kívül fordul elő, de nyúlványaikkal beérnek az idegdúcok belsejébe (periganglionaris macrophagok), olyan haemopoeticus sejt, mely teljes egészében a ganglionok idegszöveti mikro környezetében helyezkedik el, eddig nem került leírásra. Korábbi immuncitokémiai vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a csirke-ENS-ben intraganglionarisan jelentős számú, nyúlványos CD45+MHCII+CSF1R+ChB6+ myeloid sejt fordul elő, melyek immunofenotípusa eltér a többi, extraganglionarisan előforduló macrophagétól. Az extraganglionaris macrophagok például nem fejezik ki a ChB6 felszíni molekulát, ami a sejttúlélésben, az apoptózisban és a sejttárhézióban játszhat szerepet a B-sejtek érési folyamán. Az IM-okon kívül a ChB6 antigén jelenlétét a belső fül érzékhamjának [49], a nagyagynak és a cerebellumnak a CD45+ microgliasejtjein egyaránt kimutatták [7]. Az ismeretlen citoplazmatikus molekulát jelölő 74.2 más márdár szöveti macrophagellenes antitestekhez – mint a lizoszómákat jelölő Lamp1 vagy a KUL-01 (MRC1 – mannózureceptor-1) – hasonlóan csak a ganglionokon



3. ábra

Plexus myentericus „whole mount” preparátumon és intraganglionaris macrophag az egérbélben (saját ábra). (A) A gliasejteket a sejt felszíni PLP1 (zöld), az enteralis neuronokat a citoplazmatikus Hu (piros) molekula jelöli. (B) Enteralis ganglion NCAM+ idegsejtjei (piros) közé belépő GFP+ intraganglionaris macrophag (zöld) áttöri az idegdűcöt körülvevő, agrin- (kék) expressziót mutató ECM-barriert CX3CR1^{GFP} egérvastagbélben

ECM = extracelluláris mátrix; GFP = zölden fluoreszkáló fehérje; NCAM = neurális sejtadhéziós molekula; PLP1 = myelin proteolipid protein 1

kívül található myentericus macrophagokat jelöli, az intraganglionarisakat nem [7].

Vizsgálatainkat emlősökre is kiterjesztettük: transzgenikus CX3CR1^{GFP} felnőtt egerekből izolált vékony- és vastagbél immuncitokémiai festéseivel kimutattuk, hogy a CX3CR1+ macrophagok egy része intraganglionaris fordul elő, ahol nyúlványaikkal „körbefonják” az enteralis neuronokat és gliasejteket, és kifejezetten a központi idegrendszeri microgliához hasonló markereket (CD45, CD11b, Iba1, CSF1R) expresszálják [7]. Feltételezik, hogy a ganglionok közelségében előforduló MHCII+ macrophagok az apoptotizáló ganglionsejteket fagocitálják [50]. Ez a tulajdonságuk emlékeztet a microgliának az ún. „scavenger” funkciójára. Fontos hangsúlyozni, hogy a génexpressziós vizsgálatok alapján a központi idegrendszer microgliájához az intestinalis macrophagok állnak a legközelebb [24]. Ilyen, a két sejtpopuláció expressziós profiljához tartozó gének: a CX3CR1, HMT, MTUS1, C3A1A, DAGLA, WRB, FKBP9 vagy a GAB1 [24]. A fraktalkin receptor (CX3CR1) azon kevés molekuláris marker közé tartozik, amelyek egyedülállóan jellemzőek az intestinalis macrophagokra és a microgliára, más szöveti macrophagok azonban nem expresszálják [23]. A 3. ábrán a plexus myentericus neurális és gliaelemi, illetve egy idegdűcbe belépő IM látható egérbélben.

Következtetések

Eredményeink és az utóbbi évtized intestinalis macrophagokat célzó vizsgálatait azt mutatták meg, hogy a MM-okkal mutatott morfológiai hasonlóság mellett az IM-ok microgliára emlékeztető sejt felszíni molekulákat expresszálják. Arra a kérdésre viszont, hogy vajon microgliához hasonló funkciót is betöltenek-e az enteralis idegrendszerben, még nem tudunk választ adni. A bélben zajló neuroimmunológiai interakciók részletesebb feltérképezéséhez elengedhetetlen lesz a jövőben az intraganglionaris macrophagok funkciójának pontos megismerése fiziológiai és patológiai állapotokban egyaránt.

Anyagi támogatás: A publikációhoz az anyagi támogatást az NKFI-K17. (124740.) számú kutatói pályázat biztosította.

Szerzői munkamegosztás: A kéziratot D. D. írta N. N. szakmai útmutatása alapján, K. T. hozzájárulásával. Az ábrákat D. D. készítette. A kéziratot N. N. ellenőrizte, és D. D. véglegesítette. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és elfogadta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] del Rio-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. Bol Soc Esp Biol. 1919; 9: 69–120.
- [2] Nagy N, Goldstein AM. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. Semin Cell Dev Biol. 2017; 66: 94–106.
- [3] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 1973; 137: 1142–1162.
- [4] Dóra D, Fejszák N, Goldstein AM, et al. Ontogeny of ramified CD45 cells in chicken embryo and their contribution to bursal secretory dendritic cells. Cell Tissue Res. 2017; 368: 353–370.
- [5] Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. Cell 2014; 158: 300–313. [Correction: Cell 2014; 158: 1210.]
- [6] Gabanyi I, Muller PA, Feighery L, et al. Neuro-immune interactions drive tissue programming in intestinal macrophages. Cell 2016; 164: 378–391.
- [7] Dora D, Arciero E, Hotta R, et al. Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia. J Anat. 2018; 233: 401–410.
- [8] Nagy N, Barad C, Hotta R, et al. Collagen 18 and agrin are secreted by neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during enteric nervous system development. Development 2018; 145: dev160317.
- [9] De Schepper S, Verheijden S, Aguilera-Lizarraga J, et al. Self-maintaining gut macrophages are essential for intestinal homeostasis. Cell 2018; 175: 400–415.e13. [Correction: Cell 2019; 176: 676.]

- [10] Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 2009; 31: 513–525.
- [11] Lemos MP, Fan L, Lo D, et al. CD8 α + and CD11b+ dendritic cell-restricted MHC class II controls Th1 CD4+ T cell immunity. *J Immunol.* 2003; 171: 5077–5084. [Correction: *J Immunol.* 2004; 172: 717.]
- [12] Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M, et al. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol Rev.* 2010; 234: 55–75.
- [13] Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 381–418.
- [14] Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med.* 2008; 205: 2139–2149.
- [15] Denning TL, Norris BA, Medina-Contreras O, et al. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol.* 2011; 187: 733–747.
- [16] Rivollier A, He J, Kole A, et al. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from anti-inflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med.* 2012; 209: 139–155.
- [17] Schridde A, Bain CC, Mayer JU, et al. Tissue-specific differentiation of colonic macrophages requires TGF β receptor-mediated signaling. *Mucosal Immunol.* 2017; 10: 1387–1399.
- [18] Niess JH, Brand S, Gu X, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307: 254–258.
- [19] Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, et al. Oral tolerance can be established *via* gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. *Immunity* 2014; 40: 248–261.
- [20] Mikkelsen HB. Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature: morphology, distribution, spatial and possible functional interactions. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 818–832.
- [21] Phillips RJ, Powley TL. Macrophages associated with the intrinsic and extrinsic autonomic innervation of the rat gastrointestinal tract. *Auton Neurosci.* 2012; 169: 12–27.
- [22] Flores-Langarica A, Meza-Perez S, Calderon-Amador J, et al. Network of dendritic cells within the muscular layer of the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 19039–19044.
- [23] Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 2013; 6: 498–510.
- [24] Gautier EL, Shay T, Miller J, et al.; Immunological Genome Consortium. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2013; 13: 1118–1128.
- [25] Zsigmond E, Bernshtein B, Friedlander G, et al. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 2014; 40: 720–733.
- [26] Shaw TN, Houston SA, Wemyss K, et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J Exp Med.* 2018; 215: 1507–1518.
- [27] Yang B, Li LJ, Xu LZ, et al. Histone acetyltransferase p300 modulates TIM4 expression in dendritic cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 21336.
- [28] Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014; 17: 131–143. [Correction: *Nat Neurosci.* 2014; 17: 1286.]
- [29] Avetisyan M, Rood JE, Huerta Lopez S, et al. Muscularis macrophage development in the absence of an enteric nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115: 4696–4701.
- [30] Goldstein AM, Brewer KC, Doyle AM, et al. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev.* 2005; 122: 821–833.
- [31] Fu M, Vohra BP, Wind D, et al. BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning *via* altered Ncam1 polysialic acid addition. *Dev Biol.* 2006; 299: 137–150.
- [32] Abrams GD, Bishop JE. Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967; 126: 301–304.
- [33] Anitha M, Vijay-Kumar M, Sitaraman SV, et al. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility *via* Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* 2012; 143: 1006–1016.e4.
- [34] Pullinger GD, van Diemen PM, Carnell SC, et al. 6-Hydroxydopamine-mediated release of norepinephrine increases faecal excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in pigs. *Vet Res.* 2010; 41: 68.
- [35] Yissachar N, Zhou Y, Ung L, et al. An intestinal organ culture system uncovers a role for the nervous system in microbe-immune crosstalk. *Cell* 2017; 168: 1135–1148.e12.
- [36] Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun.* 2014; 38: 1–12.
- [37] Wang H, Lee IS, Braun C, et al. Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: a systematic review. *J Neurogastroenterol Motil.* 2016; 22: 589–605.
- [38] Johnson KV, Foster KR. Why does the microbiome affect behaviour? *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16: 647–655.
- [39] Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, et al. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 146–148.
- [40] Heijtz RD, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 3047–3052.
- [41] Thion MS, Low D, Silvin A, et al. Microbiome influences prenatal and adult microglia in a sex-specific manner. *Cell* 2018; 172: 500–516.e16.
- [42] Slykerman RF, Thompson J, Waldie KE, et al. Antibiotics in the first year of life and subsequent neurocognitive outcomes. *Acta Paediatr.* 2017; 106: 87–94.
- [43] Luczynski P, Tramullas M, Viola M, et al. Microbiota regulates visceral pain in the mouse. *eLife* 2017; 6: e25887.
- [44] Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota–brain communication. *Brain Behav Immun.* 2016; 56: 140–155.
- [45] Dickerson F, Severance E, Yolken R. The microbiome, immunity, and schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Behav Immun.* 2017; 62: 46–52.
- [46] Rook GA. Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: an ecosystem service essential to health. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 18360–18367.
- [47] Kramer A, Bekeschus S, Bröker BM, et al. Maintaining health by balancing microbial exposure and prevention of infection: the hygiene hypothesis *versus* the hypothesis of early immune challenge. *J Hosp Infect.* 2013; 83(Suppl 1): S29–S34.
- [48] Slyepchenko A, Maes M, Jacka FN, et al. Gut microbiota, bacterial translocation, and interactions with diet: pathophysiological links between major depressive disorder and non-communicable medical comorbidities. *Psychother Psychosom.* 2017; 86: 31–46.
- [49] Bird JE, Daudet N, Warchol ME, et al. Supporting cells eliminate dying sensory hair cells to maintain epithelial integrity in the avian inner ear. *J Neurosci.* 2010; 30: 12545–12556.
- [50] Kulkarni S, Micci MA, Leser J, et al. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: E3709–E718.

(Dóra Dávid dr.,

Budapest, Tűzoltó u. 58., 1094

e-mail: dora.david@med.semmelweis-univ.hu)