

Purinerg moduláció és neuroinflammáció: a P2X7 receptor konvergens szerepe fejlődési és fertőzőses preklinikai modellekben

Doktori tézisek

dr. Szabó Dorottya

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Szentágothai János Idegtudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Sperlág Beáta, DSc., az MTA rendes tagja

Hivatalos bírálók:

Dr. Csölle Cecília Katalin PhD, kutató, Gedeon Richter Nyrt.

Dr. Zelles Tibor PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelles Tibor PhD, egyetemi docens

Tagok: Dr. Riba Pál PhD, egyetemi docens

Dr. Mikics Éva PhD, vezető kutató

Budapest, 2025

Bevezetés

A központi idegrendszeri (KIR) gyulladásos folyamatok és a hozzájuk társuló neuropszichiátriai zavarok egyre nagyobb figyelmet kapnak a modern idegtudományban. Az immunrendszer krónikus aktiválódása — például gyulladásos citokinek, mikrogliális aktiváció révén — jelentősen befolyásolhatja a neurofejlődést és a viselkedést. A purinerg P2X7 receptor kulcsszereplője lehet ennek a kapcsolatnak: nagymértékű aktivációja magas extracelluláris ATP-szint mellett történik, és a gyulladásos válasz, az NLRP3 inflammaszóma aktiváció, valamint az IL-1 β termelés révén hidat képez a sejtszintű immunválasz és a KIR hosszú távú működése között. Egyre több állatkísérletes és humán adat utal arra, hogy a P2X7–NLRP3–IL-1 β jelátviteli útvonal szerepet játszhat neurofejlődési és pszichiátriai zavarok kialakulásában, bár pontos mechanizmusai még további vizsgálatot igényelnek. A fejlődő agyban a P2X7 szabályozza a neurogenézist, a migrációt, a szinaptogenezist és az immun-homeosztázist. Kóros aktivációja — például anyai immunaktiváció (MIA) vagy fertőzések hatására — azonban rendellenes neuroinflammációhoz, dendritikus morfológiai eltérésekhez és viselkedéses zavarokhoz vezethet. Az anyai fertőzések, gyulladásos állapotok, illetve autoimmun folyamatok időablaktól függően növelhetik az autizmus spektrum zavar (ASD) és más fejlődési zavarok kockázatát. A gyulladás kiváltására alkalmas preklinikai modellek, például a Poly(I:C) egérmodell révén, a P2X7–NLRP3–IL-1 β kaszkád farmakológiai célpontként vizsgálható.

A COVID-19 világjárványt követően egyre több bizonyíték utalt arra, hogy a SARS-CoV-2 fertőzést követő posztakut tünetegyüttes (PASC) hosszan fennálló neuroinflammációval és neuropszichiátriai eltérésekkel járhat. Kutatásunk során azt

vizsgáltuk, hogy a P2X7-mediált gyulladásos mechanizmusok miként járulhatnak hozzá ezekhez a felnőttkori idegrendszeri következményekhez.

Célkitűzés

1. Az NLRP3 inflammaszóma és az IL-1 β gyulladásos mediátor szerepének feltárása az ASD-szerű fenotípus kialakulásában anyai immunaktivációs (MIA) modellben: farmakológiai és genetikai módszerekkel vizsgáltuk ezen gyulladásos mediátorok szerepét.
2. Az anyai immunaktivációt követő időfüggő citokinprofil vizsgálata: az anyai vérplazmában és a magzati agyban jelentkező citokinválaszok időbeli alakulásának és P2X7-függésének jellemzése.
3. A P2X7 gátlás posztnatális alkalmazhatóságának vizsgálata: meghatároztuk, hogy az utódok ismételt, alacsony dózsisú posztnatális kezelése képes-e reverzibilis hatást gyakorolni.
4. Új posztakut COVID modell felállítása és a P2X7 szerepének vizsgálata a PASC-hoz társuló tünetegyüttesben: feltérképeztük a P2X7 expresszió regionális változásait és a fertőzést követő neuroinflammációt, valamint elemeztük a P2X7 szelektív gátlásának viselkedéses és molekuláris hatásait.

Módszerek

A kísérleteket két eltérő gyulladásos eredetű preklinikai modellben végeztük: egy anyai immunaktivációval (MIA) kiváltott ASD-modellben és egy posztakut SARS-CoV-2 fertőzést követő PASC-modellben.

I. A P2X7-receptor szerepe az autizmus spektrum zavar modellezésében

Az ASD-modellhez vad típusú (P2rx7^{+/+}) és P2X7-receptor knockout (P2rx7^{-/-}) törzsű egereket alkalmaztunk, C57BL/6 genetikai háttéren. A vemhes nőstények immunaktiválását intraperitoneális poly(I:C) injekcióval (3 mg/kg E12.5 napon, majd 1,5 mg/kg E17.5 napon) végeztük. A gyulladásos útvonalak szerepének feltárására szelektív farmakológiai gátlókat alkalmaztunk: MCC950 (50 mg/kg, NLRP3 antagonistája), JNJ-47965567 (30 mg/kg, P2X7-antagonista), illetve anti-IL-1 β antitest (25 μ g/kg). A kezeléseket a poly(I:C) beadása előtt, vagy posztnatálisan, randomizált csoportbeosztással végeztük.

„Az ASD-kísérletek három különálló kísérletsorozatból álltak: (1) viselkedési és morfológiai vizsgálatok az utódokon; (2) gyulladásos mediátorok meghatározása anyai plazmából és magzati szövetekből különböző időpontokban; (3) az ismételt posztnatális JNJ-kezelés hatásának vizsgálata. A szociális preferencia, mosakodás, üveggolyó-ásás és rotarod tesztek segítségével értékeltük az utódok viselkedését. A tesztek után az állatok agyszöveteit morfológiai (immunhisztokémiai festés, elektronmikroszkópos szinaptoszóma-analízis) és biokémiai vizsgálatok céljára használtuk fel.

Az IL-1 β szintek ELISA-val kerültek meghatározásra anyai plazma, magzati agy és placenta mintákból, míg a főbb gyulladásos citokineket (pl. IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α) multiplex CBA-módszerrel mértük. Az adatok statisztikai feldolgozása egy- vagy kétutas ANOVA-val, illetve nonparametrikus Kruskal–Wallis-teszttel történt, Tukey vagy Dunn-féle post hoc korrekcióval.

II. A P2X7-receptor szerepe a poszt-akut COVID-19 szindróma idegrendszeri eltéréseiben

A PASC-modellhez nyolchetes BALB/c hím egereket használtunk, amelyeket intranazálisan fertőztünk SARS-CoV-2 MA10 vírustörzzsel (10^5 PFU). A fertőzött és kontroll egerek egy része viselkedésvizsgálatok előtt 30 mg/kg JNJ-47965567 P2X7-antagonista kezelést kapott. A fertőzést követő 10 napban az állatok állapotát szorosan monitoroztuk, majd a neuropszichiátriai értékelésre különféle teszteket végeztünk.

Viselkedésteszteket végeztünk a szorongás, depresszió és kognitív deficit vizsgálatára. Ezek közé tartozott az Open Field teszt (szorongás és általános aktivitás), a Splash teszt (önápolási motiváció), a Tail Suspension teszt (depresszió-szerű viselkedés), a T-labirintus teszt (térbeli memória) és az új tárgy preferencia teszt (tárgyfelismerés). Az elemzéseket EthoVision vagy Solomon Coder szoftverekkel végeztük.

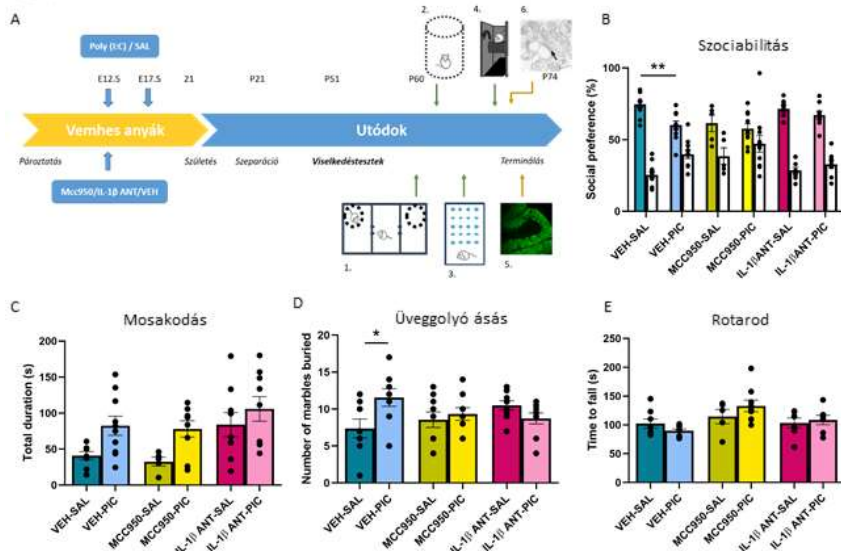
A viselkedéstesztek után az állatokat ketamin–xilazin anesztéziában termináltuk. Vérmintát, valamint prefrontális kéreg, hippocampus, striátum és tüdő szöveteket gyűjtöttünk. A P2X7 receptor szintjét ELISA-val határoztuk meg plazma- és agyszöveti mintákból. A gyulladásos citokinprofil (pl. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , CXCL1) áramlási citometrián alapuló CBA Flex Set rendszerrel került elemzésre. Az adatok értékelésére kétutas ANOVA-t alkalmaztunk, Sidak- vagy Tukey-féle post hoc teszttel.

Eredmények

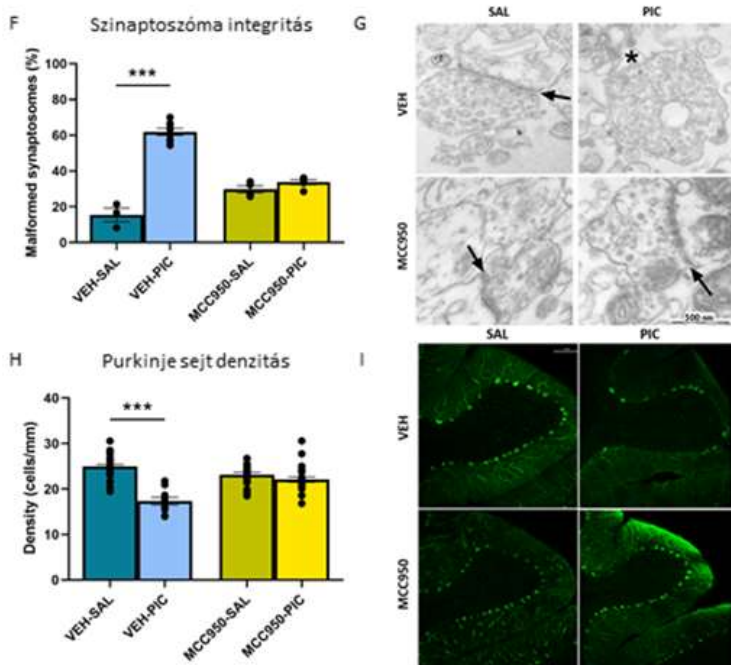
A P2X7-receptor szerepe az autizmus spektrum zavar egérmodellben

A Poly(I:C) által kiváltott anyai immunaktiváció ASD-re jellemző viselkedésbeli eltéréseket váltott ki az utódokban, szociális deficit és fokozott repetitív viselkedés formájában, miközben a szenzomotoros koordináció és mosakodási viselkedés nem változott. Mind az anyai NLRP3-gátlás (MCC950), mind az IL-1 β semlegesítés megelőzte ezen viselkedései eltérések kialakulását.

P2rx7^{+/+}



Morfológiailag a MIA csökkentette a szinaptoszómák integritását és kisagyi Purkinje-sejtvesztést okozott, amelyet az MCC950 előkezelés szintén megakadályozott.

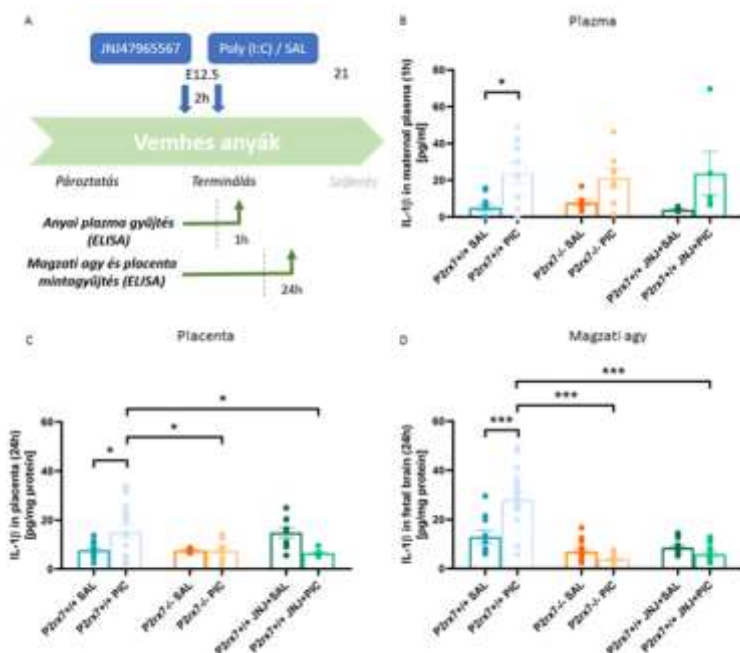


A $P2rx7^{-/-}$ genotípusú utódok viselkedésében és morfológiájában a poly(I:C) nem idézett elő eltérést, és az MCC950-kezelés sem befolyásolta őket, ami megerősíti a P2X7-mediált NLRP3–IL-1 β útvonal kulcsszerepét a MIA-indukált ASD-szerű fenotípus kialakulásában.

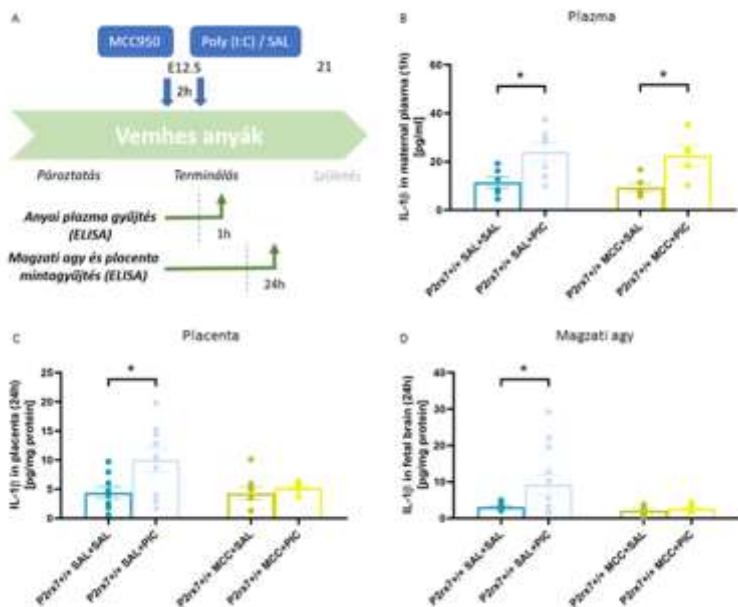
A P2X7-mediált IL-1 β -válasz és gyulladásos változások a MIA-modellben

A második kísérletsorozatban először a poly(I:C) anyai beadását követően az IL-1 β gyulladásos citokin koncentrációját vizsgáltuk három szövettípusban: anyai plazmában, placentában és magzati agyban. Vad típusú egerekben poly(I:C) beadását követően 1 órával az anyai plazmában, majd 24 órával később a

placentában és a magzati agyban is kimutatható volt a proinflammatorikus IL-1 β növekedés, míg a P2rx7 gén hiánya, valamint a JNJ47965567 szelektív P2X7-antagonista alkalmazása hatékonyan megelőzte ezen emelkedést.



Hasonló eredményeket kaptunk az NLRP3 gátlásával: az MCC950 előkezelés megelőzte az IL-1 β emelkedését a placenta- és a magzati agymintákban, de az anyai plazmában a poly(I:C)-válasz így is fennmaradt. Ez arra utal, hogy a poly(I:C) indukálta IL-1 β emelkedés P2X7/NLRP3-függő volt a placentában és magzati agyban, de nem jellemzően az anyai plazmában, ahol más útvonalak is közrejátszhatnak.



Poly(I:C)-indukált proinflammatorikus citokinváltozások az anyai plazmában és magzati agyban

A második kísérlet részeként a továbbiakban a poly(I:C) anyai beadását követően vizsgáltuk különböző gyulladásos citokin- és kemokinválaszokat P2rx7^{+/+} és P2rx7^{-/-} egerek plazma- és magzati agymintáiban, különböző időpontokban (0, 6, 24, 48 óra). Eredményeink szerint az anyai plazmában bizonyos gyulladásos mediátorok – különösen a RANTES szintemelkedése és az MCP-1 24 óránál P2X7-függő mintázatot mutatott, míg mások, például az IL-6, G-CSF, MCP-1 6 óránál P2X7-től függetlenül is jelentősen emelkedtek. Az antiinflammatorikus IL-4 alacsony bazális szintje P2X7-hiányban arra utalhat, hogy a receptorfüggő immunsejtek nem termelik, vagy a kompenzatorikus mechanizmusok nem

aktiválódnak. Mindez arra utal, hogy a purinerg jelátvitel szelektíven szabályozza a gyulladásos válasz egyes aspektusait, különösen a citokin- és kemokinprofil időbeli dinamikáját. A magzati agymintákban az IL-6 és IL-2 szintje csak vad típusú egerekben emelkedett jelentősen, P2rx7^{-/-} állatokban nem, vagy jóval kevésbé. Ez arra utal, hogy ezeknek a mediátoroknak a felszabadulása az IL-1 β -hoz hasonló módon P2X7-aktivációhoz kötött. Az MCP-1 esetében vad típusban poly(I:C) hatásra nőtt a szint, de a P2rx7^{-/-} állatokban már a kontrollcsoportban is emelkedett volt. Ez arra utal, hogy a P2X7 receptor hiánya önmagában is befolyásolja az MCP-1 bázisszintjét, de a poly(I:C)-hatás itt is P2X7-függő. A RANTES és az IL-4 szintje épp a P2rx7^{-/-} állatokban nőtt meg, utalva arra, hogy a P2X7 receptor normálisan gátolja ezen citokinek termelését a magzati agyban, és hiányában ez a fék kiesik, így valószínűleg kompenzatorikus vagy deregulált módon fokozódik a termelés. A táblázat az anyai plazma és a magzati agy citokinváltozásait foglalja össze, külön kiemelve a P2X7-függő eltéréseket. A citokinprofil elemzése alapján az anyai plazmában és a magzati agyban is megfigyelhetők voltak P2X7-függő és -független gyulladásos eltérések, a magzati agyban azonban több mediátor mutatott P2X7-dependenciát. Ez arra utal, hogy a fejlődő agy immunválasza célzottabb, konvergens mechanizmusokon keresztül zajlik, amelyekben a P2X7 receptor kulcsszabályozó szerepet tölthet be.

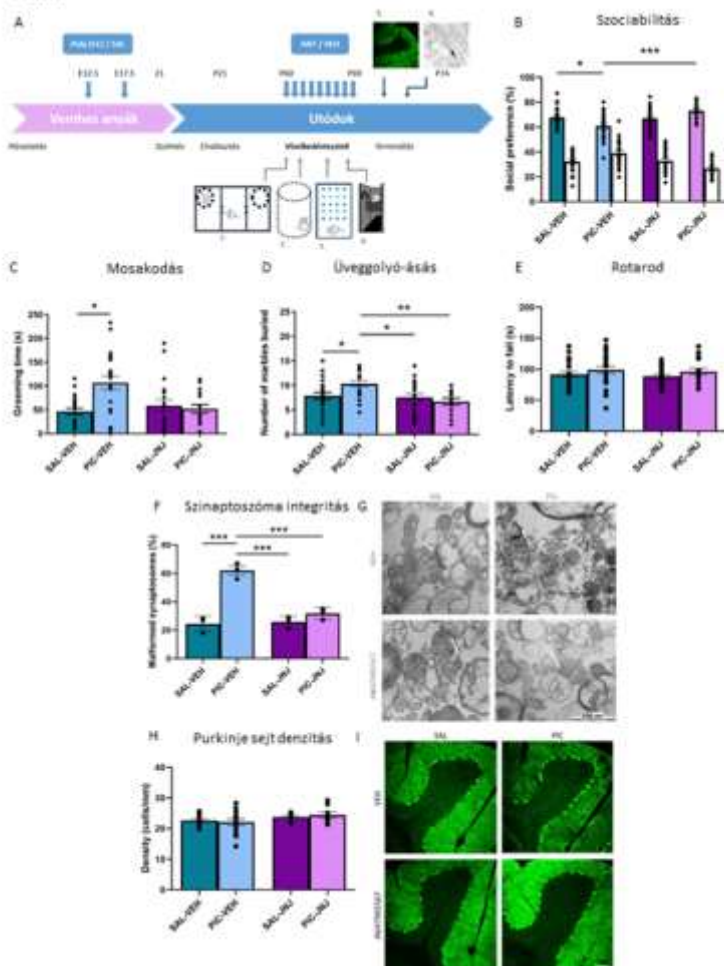
Citokin/ kemokin	Anyai plazma koncentrációváltozás Poly(I:C) hatására			
	P2rx7 ^{+/+}	P2rx7 ^{-/-}	Indukálódott-e MIA hatására	P2X7- dependencia fennáll-e
IL-6	emelkedett	emelkedett	igen	nem
IL-2	nem emelkedett	nem emelkedett	nem	nem
G-CSF	nem emelkedett	emelkedett	igen	nem
MCP-1	emelkedett	emelkedett, de mésékeltebben	igen	igen
RANTES	emelkedett	emelkedett, de mésékeltebben	nem	igen
IL-4	nem emelkedett	nem emelkedett	nem	nem
IL-1 β	emelkedett	nem emelkedett	igen	nem

Citokin/ kemokin	Magzati agy koncentrációváltozás Poly(I:C) hatására			
	P2rx7 ^{+/+}	P2rx7 ^{-/-}	Indukálódott-e MIA hatására	P2X7- dependencia fennáll-e
IL-6	emelkedett	nem emelkedett	igen	igen
IL-2	emelkedett	nem emelkedett	igen	igen
G-CSF	nem emelkedett	nem emelkedett	nem	nem
MCP-1	emelkedett	nem emelkedett	igen	igen
RANTES	nem emelkedett	emelkedett	nem	nem
IL-4	nem emelkedett	emelkedett	nem	igen
IL-1 β	emelkedett	nem emelkedett	igen	igen

P2X7 antagonistával (JNJ47965567) történő ismételt utódkezelés kivédte a MIA által kiváltott hatásokat P2rx7^{+/+} egerekben.

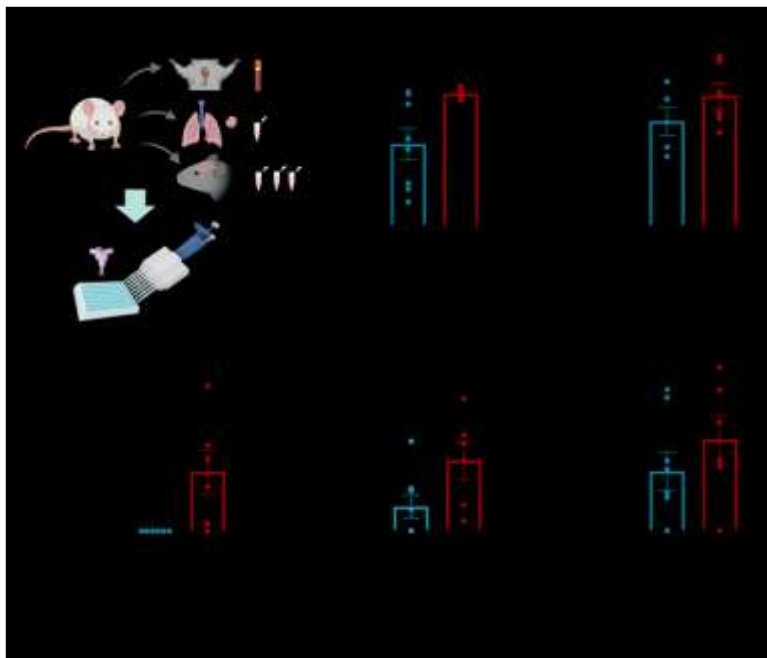
A harmadik kísérletsorozat célja annak vizsgálata volt, hogy a P2X7 receptor ismételt, alacsony dózisú posztnatális gátlása képes-e visszafordítani a poly(I:C) által kiváltott viselkedési és morfológiai eltéréseket vad típusú utódokban. Korábbi eredményeink alapján már ismert volt, hogy egyszeri posztnatális JNJ-kezelés is javítja a szociális viselkedést. Jelen kísérletben azt teszteltük, hogy ismételt, alacsony dózisú kezelés is kiváltja-e a hatást. A 20 mg/kg-os JNJ-t posztnatálisan, többszöri alkalommal adtunk, ami szignifikáns javulást eredményezett a szociális preferencia-, mosakodás- és üveggyótesztben, míg a motoros koordinációban (rotarod) nem volt eltérés. Morfológiailag a MIA növelte a kóros szinapszisok arányát, melyet a posztnatális P2X7-gátlás mérsékelte, a Purkinje sejt denzitásban a rotarod tesztnek megfelelően nem volt eltérés. Mindebből arra következtettünk, hogy ismételt, alacsony dózisú szubkrónikus P2X7-antagonista kezelés posztnatálisan is hatásosnak bizonyult – ezzel jobban modellezve egy potenciális humán terápiás lehetőséget.

P2rx7^{+/-}



A P2X7-receptor szerepe a poszt-akut COVID-19 (PASC) szindróma idegrendszeri eltéréseiben

Az autizmus modell mellett a P2X7 szerepét posztakut COVID-19 szindrómában (PASC) is vizsgáltuk, felnőtt hím egerek SARS-CoV-2 MA10 fertőzését követően. A fertőzés súlyos tüneteket és magas mortalitást váltott ki a hím egerekben. A túlélési arány a 10. napon 41,1% volt, a medián túlélési idő hat nap. A testtömeg-változások statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a kontroll (PBS) és a fertőzött egerek között a 3. és 9. nap között. Az átlag testtömeg legalacsonyabb értéket a 4. napon mutatott ($83,19 \pm 1,582$ %). A fertőzött egerek állapotromlásának külső jegyei (félleg csukott szem, csapzott szőrzet, gyengeség, mozgáshiány) az 5–8. nap között voltak a legmarkánsabbak. A P2X7 receptor szintjét ELISA-val mértük. A poszt-akut SARS-CoV-2 MA10 fertőzés fokozta a P2X7 receptor expresszióját plazma- és agymintákban. A plazmaszint a fertőzést követő 16. napon szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest, míg a tüdőszövetben nem volt kimutatható változás. Az agyban fokozott P2X7 expressziót észleltünk a prefrontális kéregben (PFC) és a hippocampusban (HIP), míg a striatumban (STR) nem történt változás.



A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés szorongás- és depresszió-szerű viselkedésbeli eltéréseket is okozott az egerekben. Az open field (OF) teszt alapján a SARS-CoV-2 MA10 fertőzés nem befolyásolta az állatok által megtett távolságot és a sebességüket, azonban a JNJ kezeléssel nőtt mindkettő érték. A fertőzés jelentősen csökkentette az aréna centrumában töltött időt, mely szorongásra utal, míg a JNJ kezelés ezt normalizálta. A splash teszt során a fertőzött egerek mosakodási ideje csökkent, ami depresszió-szerű eltérésre utal, ezt azonban a JNJ kezelés nem befolyásolta szignifikánsan. A farokfelfüggesztés tesztben nem volt kimutatható eltérés. Ebből megállapítható, hogy a fertőzés akut szakaszának lecsengését követően kialakuló viselkedéses zavarok részben P2X7-függő mechanizmusokon keresztül alakulhatnak ki. A fertőzés utáni 16. napon a viselkedéses eltérések gyulladásos háttérnek vizsgálatára perifériásan és a központi idegrendszer viselkedés szempontjából releváns területein (prefrontális kéreg,

Következtetések

A P2X7 receptor aktivációja kulcsszerepet játszik a MIA-modell által kiváltott neuroinflammáció és az ASD-szerű viselkedési eltérések kialakulásában. A P2X7–NLRP3–IL-1 β tengely célzott gátlása (farmakológiai és genetikai módszerekkel) hatékonyan csökkentette a gyulladásos válaszokat és részben megelőzte a szociális és repetitív viselkedési zavarokat, valamint egyes morfológiai eltéréseket. Eredményeink azt mutatják, hogy ez a jelátviteli útvonal központi szerepet tölt be az anyai immunaktiváció által kiváltott kóros idegrendszeri fejlődési folyamatokban, különös tekintettel az IL-1 β közvetítésével létrejövő eltérésekre. A placenta és a magzati agy gyulladásos válaszaiban megfigyelt P2X7-függő és -független eltérések alapján a P2X7 célzott modulációja a jövőben lehetőséget kínálhat a szelektív beavatkozásra. Ezen felül igazoltuk, hogy az ismételt, alacsony dózisú posztnatális P2X7 gátlás hatékonyan mérsékelheti a már kialakult viselkedési és morfológiai eltéréseket is, így potenciálisan terápiás lehetőségként szolgálhat humán kontextusban is.

A SARS-CoV-2 fertőzést követően kialakuló posztakut neuropszichiátriai tünetek kialakulásában a P2X7-mediált neuroinflammáció szintén meghatározó szerepet játszhat. Eredményeink alapján a fertőzést követő időszakban tartós P2X7 expressziónövekedés és regionális citokinelváltozások voltak megfigyelhetők, különösen a striatumban. A P2X7 antagonistá kezelés (JNJ-47965567) részben megelőzte a fertőzés utáni szorongásos és depresszió-szerű viselkedéses zavarokat, valamint mérsékelte az IFN- γ szintjének kóros emelkedését a striatumban. Mindez arra utal, hogy a P2X7 útvonal felnőttkori gyulladásos állapotokban is jelentős mértékben hozzájárulhat a neuropszichiátriai tünetek fenntartásához. A központi idegrendszeri gyulladás tartós

fennmaradása és a regionális citokinprofil-eltérések együttesen alátámasztják a P2X7 célzásának jelentőségét a PASC kezelésében.

A P2X7-mediált gyulladás tehát hasonló idegrendszeri folyamatokat érinthet eltérő életkori és kórélettani kontextusokban, utalva egy közös, konvergens patomechanizmusra. Ez a közös tengely potenciálisan univerzális célpontként szolgálhat a gyulladásos eredetű neuropszichiátriai zavarok kezelésében — függetlenül azok eredetétől vagy időzítésétől.

A jövőbeli terápiás célzásnak a túlműködő gyulladásos válasz finomhangolására, a homeosztázis helyreállítására kell törekednie kóros túlműködés esetén, a fiziológiás P2X7–NLRP3–IL-1 β funkciók megőrzésével.

Saját publikációk jegyzéke (A disszertációhoz kapcsolódó közlemények)

Szabó D, Tod P, Göloncsér F, Román V, Lendvai B, Otrókosi L, Sperlág B.
Maternal P2X7 receptor inhibition prevents autism-like phenotype in male mouse offspring through the NLRP3-IL-1 β pathway. *Brain Behav Immun* (2022). (IF 15,1)
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.01.015>

Kristóf Zs [†], **Szabó D** [†], Sperlág B, Török D, Gonda X.
From childhood woes to adult blues: Unmasking the role of early traumas, P2X7 receptor, and neuroinflammation in anxiety and depression. *Int J Mol Sci* (2025). Review. (IF 4,9)
<https://doi.org/10.3390/ijms26104687>

[†] A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a közlemény elkészítéséhez.

Szabó D [†], Tod P [†], Maác F, Göloncsér F, Iring-Varga B, Török B, Zsidei Gy, Pályi B, Kiss Z, Otrókosi L, Sperlág B.
Targeting P2X7 mitigates neurobehavioural alterations in a mouse model of post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection. *Neuropharmacology* (2025). (IF 4,6)
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2025.110566>

[†] A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a közlemény elkészítéséhez.

Szabó D, Otrókosi L, Sperlág B.
The role of maternal infections in neurodevelopmental psychiatric disorders: focus on the P2X7/NLRP3/IL-1 β signalling pathway. *J Neuroinflammation*. Review. (IF 10,1)
DOI: 10.1186/s12974-025-03509-0

Σ IF: 34,7