

SEMMELWEIS EGYETEM DOKTORI
ISKOLA

Ph.D. értekezések

3265.

SZABÓ DOROTTYA

Funkcionális idegtudományok
című program

Programvezető: Dr. Sperlág Beáta, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Sperlág Beáta, egyetemi tanár

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

Doktori értekezés

dr. Szabó Dorottya

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Szentágotthai János Idegtudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Sperlágth 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

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2	ELŐSZÓ	8
3	BEVEZETÉS	9
3.1	A jelátviteli útvonal és a neuroinflammáció molekuláris mechanizmusai	9
3.1.1	A P2X7 szerepe a gyulladásos ATP-jelátvitelben	9
3.1.2	A P2X7 és a pannexin-1 kölcsönhatása a gyulladás során	10
3.1.3	TLR-indukált priming és az NLRP3 inflammaszóma P2X7-mediált aktiválása	11
3.1.4	IL-1 β felszabadulás és jelátvitel a KIR-ben	12
3.1.5	Sejttípus-specifikus jelátvitel és az IL-1 β hatásának összetett szerepe a KIR-ben ...	14
3.1.6	A mikroglia sejtek szerepe és sejtközi kölcsönhatásai a P2X7-mediált neuroinflammáció fenntartásában.....	14
3.2	A P2X7/NLRP3/IL-1 β jelátviteli útvonal szerepe a fejlődő idegrendszerben	17
3.2.1	A P2X7 receptorok szerepe a neuronális fejlődésre	17
3.2.2	Az NLRP3 funkciója és szerepe az idegsejtek fejlődésében	18
3.2.3	Az IL-1 β működése és szerepe a normál neuronális fejlődésben.....	19
3.3	A prenatális gyulladásos környezet és az idegrendszeri fejlődés kapcsolata	20
3.3.1	Anyai fertőzések és a fejlődő agy sérülékenysége, fejlődési ablakok	20
3.3.2	Fertőzések állatmodelljei (pl. poly(I:C), LPS)	28
3.3.3	Autoimmun állapotok és endogén gyulladás a terhesség során	30
3.4	A méhen belüli gyulladásos környezet, a neuroinflammáció és a neuropszichiátriai zavarok összefüggései	31
3.5	Prenatális gyulladás és viselkedéses eltérések (állatmodellek)	31
3.6	Autizmus spektrum zavar általános jellemzői	32
3.6.1	ASD definíciója és tünettani jellemzői	32
3.6.2	Az ASD prevalenciája és etiológiai tényezői	35
3.7	Humán bizonyítékok IL-1 β , P2X7 expresszióról ASD-ben	36
3.8	A P2X7/NLRP3/IL-1 β útvonal központi szerepe a zavarok kialakulásában	36

3.9	A P2X7 receptor szerepe neuroinflammáció közvetítésében és hosszú távú idegrendszeri eltérések kialakulásában posztakut COVID-19 szindrómában (PASC)	38
3.9.1	A P2X7-mediált gyulladás szerepe a PASC kialakulásában	38
3.9.2	A P2X7-receptor közvetítő szerepe a gyulladás és a neuropszichiátriai tünetek között	39
3.9.3	A P2X7 receptor mint potenciális terápiás célpont gyulladásos eredetű idegrendszeri eltérésekben	39
4	CÉLKITŰZÉSEK	40
5	MÓDSZERTAN	42
5.1	I. A P2X7-receptor szerepe az autizmus spektrum zavar modellezésében	42
5.1.1	Kísérleti állatok	42
5.1.2	Kezelések	43
5.1.3	Kísérleti elrendezés	44
5.1.4	Viselkedésteszték	45
5.1.5	Morfológiai vizsgálatok	47
5.1.6	Biokémiai vizsgálatok	48
5.1.7	Statisztika I.	49
5.2	II. A P2X7-receptor szerepe a poszt-akut COVID-19 szindróma (PASC) idegrendszeri eltéréseiben	50
5.2.1	Kísérleti elrendezés	50
5.2.2	Viselkedésteszték	51
5.2.3	Mintakezelés, ELISA és áramlási citometriás CBA analízis	52
5.2.4	Statisztika II.	53
6	EREDMÉNYEK	54
6.1	I. A P2X7-receptor szerepe az autizmus spektrum zavar egérmodellben	54
6.1.1	Az NLRP3 és IL-1 β gátlása mérsékelte a MIA által kiváltott autizmus-szerű fenotípus kialakulását	54
6.1.2	A P2rx7 hiánya és az NLRP3 gátlása megakadályozta a poly(I:C) által kiváltott IL-1 β -szint emelkedését mind a placenta, mind a magzati agymintákban.	58

6.1.3	A poly(I:C) által kiváltott proinflammatorikus változások a citokin- és kemokinszintekben az anyai plazmában és a magzati agymintákban	61
6.1.4	P2X7 antagonistával (JNJ47965567) történő ismételt utódkezelés kivédte a MIA által kiváltott hatásokat P2rx7 ^{+/+} egerekben.	66
6.2	II. A P2X7-receptor szerepe a poszt-akut COVID-19 (PASC) szindróma idegrendszeri eltéréseiben	68
6.2.1	A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés súlyos tüneteket és magas mortalitást váltott ki a hím egerekben.....	68
6.2.2	A poszt-akut SARS-CoV-2 MA10 fertőzés fokozta a P2X7 receptor expresszióját plazma- és agymintákban	69
6.2.3	A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés szorongás- és depresszió-szerű viselkedésbeli eltéréseket okozott egerekben.....	70
6.2.4	A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés nem befolyásolta a munkamemóriát.....	72
6.2.5	A plazma és tüdő mintákban jelentős citokinszint-elváltozás nem volt detektálható	72
6.2.6	A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés IFN- γ emelkedést okozott a striatumban.....	74
6.2.7	Összefoglaló grafikus ábra a poszt-akut SARS-CoV-2 MA10-modell főbb viselkedéses és molekuláris eltéréseiről	75
7	MEGBESZÉLÉS	76
8	KÖVETKEZTETÉSEK.....	88
8.1	A kutatás célja és újdonsága.....	88
8.1.1	A P2X7–NLRP3–IL-1 β tengely szerepe az ASD kialakulásában.....	88
8.1.2	Az anyai citokinprofil és a placentáris szerep új megközelítése	88
8.1.3	A P2X7/NLRP3/IL-1 β mint új terápiás célpont	89
8.1.4	A P2X7 receptor szerepe a SARS-CoV-2 fertőzést követő neuroinflammációban ..	89
8.1.5	A P2X7 receptor gátlásának terápiás potenciálja COVID-19 utáni neurológiai zavarokban.....	89
8.2	Jövőbeli irányok	90
9	ÖSSZEFOGLALÁS	91
10	SUMMARY	93
11	IRODALOMJEGYZÉK	95

12	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	119
12.1	Az értekezés témájában megjelent publikációk.....	119
13	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	120
14	Függelék	121

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	adenozin-trifoszfát
BDNF	brain-derived neurotrophic factor (agyi növekedési faktor)
KIR	központi idegrendszer
Cx43	connexin-43
DAMP	damage-associated molecular pattern (veszélyjelző molekuláris mintázat)
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5. kiadás
ELISA	enzimhez kötött immunoszorbens assay
Glu	glutamát
IFN	interferon
IL	interleukin
IL-1β	interleukin-1 beta
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonista
iNOS	indukálható nitrogén-oxid-szintáz
IRF	interferon regulatory factor (interferon regulator)
JNJ	JNJ-47965567 (P2X7 receptor antagonista)
KO	knockout (génkiütött)
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz

MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1
MIA	maternal immune activation (anyai immunaktiváció)
NF-κB	nukleáris faktor kappa B
NLRP3	NOD-like receptor pyrin domain containing 3
PAMP	pathogen-associated molecular pattern (patogénnel társuló molekuláris mintázat)
Panx1	pannexin-1
PASC	post-acute COVID-19 syndrome (poszt-akut COVID-19) szindróma
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejtek
PCR	polimeráz láncreakció
Poly(I:C)	poliriboinozinsav-poliribocitozinsav
ROS	reaktív oxigén származékok
SCD	szociális kommunikációs zavar
sP2X7	szolubilis P2X7 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrosis faktor
TRAF	TNF receptor-associated factor
VRAC	volume regulated anion channel (térfogatszabályozott anioncsatorna)
ZIKV	Zika vírus

2 ELŐSZÓ

A disszertációban bemutatott kísérletes munka során két különböző modellrendszert vizsgáltam – közös nevezőjük, hogy mindkettő az idegrendszeri gyulladás és a purinerg szabályozás kapcsolódására világít rá. A kutatás folyamán számos tudományos és gyakorlati kihívással kellett szembenézni. Az autizmus spektrumzavar vizsgálata során különösen szembetűnő volt, hogy ez a kórkép – még a többi neuropszichiátriai zavarhoz képest is – rendkívül komplex és nehezen megragadható. Nem áll rendelkezésre olyan egyértelmű és konzisztens neuromorfológiai, genetikai vagy molekuláris elváltozás, amely minden érintettre jellemző lenne. Genetikai és fenotípusos sokfélesége miatt az állatmodelleken végzett kutatás is óhatatlanul korlátokba ütközik, ami megnehezíti a terápiás célpontok egyértelmű azonosítását. Azonban a P2X7 receptor központi szerepének feltérképezése segíthet a gyulladásos és idegrendszeri folyamatok közötti bonyolult összefüggések megismerésében.

A SARS-CoV-2 MA10 vírussal végzett post-COVID modell esetében a kutatási körülmények jelentették a fő kihívást. A viselkedéses kísérleteket magas biológiai biztonsági szintet igénylő (BSL-3) laboratóriumban kellett elvégezni, a kísérletekhez szükséges vírust az Amerikai Egyesült Államokból szállítottuk be, a világjárvány idején fennálló szigorú biztonsági protokollok betartásával. A modellt bonyolította, hogy az akut fertőzést követő idegrendszeri hatásokat egy olyan rendszeren kellett vizsgálni, amelynek fiziológiai és immunológiai jellemzőit csak részben ismertük.

Ezen nehézségek ellenére bízom benne, hogy a munka során sikerült olyan összefüggéseket feltárni, amelyek új szempontokat kínálnak a neuroinflammáció és a viselkedéses zavarok kapcsolatának értelmezéséhez – és ezzel hozzájárulhatnak a jövőbeli terápiás célpontok azonosításához is.

3 BEVEZETÉS

A központi idegrendszeri gyulladásos folyamatok és az ezekhez társuló viselkedéses, illetve neuropszichiátriai zavarok kialakulása egyre nagyobb figyelmet kap az idegtudományi kutatásokban. Az elmúlt évtizedben számos eredmény utalt arra, hogy az immunrendszer aktivitása nem csupán a klasszikus fertőző vagy autoimmun folyamatokban játszik szerepet, hanem finomabb, krónikus mechanizmusokon keresztül is képes befolyásolni az agyi működést és a viselkedést – például a mikroglialis aktivitás, a gyulladásos citokinek, illetve a neuroimmun kölcsönhatások révén, amelyeket egyre több kutatás hoz összefüggésbe pszichiátriai kórképekkel [1, 2]. Ennek fényében fokozott érdeklődés övezi azokat a molekuláris útvonalakat, amelyek az immunjelátvitelt az idegrendszeri funkciókhoz kapcsolhatják. A purinerg jelátvitel egyik fontos eleme, a P2X7 receptor, számos tanulmány szerint részt vehet az immunválasz és a gyulladásos folyamatok szabályozásában [3, 4]. Az immunválasz, a sejtpusztulás és a gyulladásos citokin-képződés szabályozásán keresztül potenciálisan hidat képezhetnek a sejtszintű gyulladásos aktivitás és a hosszútávú idegrendszeri eltérések között. Jelen disszertáció célja annak vizsgálata, hogy e receptor szerepe hogyan értelmezhető fejlődési és fertőzéses eredetű gyulladásos modellrendszerekben, különös tekintettel a P2X7–NLRP3–IL-1 β útvonalra, annak immunológiai és viselkedésbeli változások közötti lehetséges kapcsolataira.

3.1 A jelátviteli útvonal és a neuroinflammáció molekuláris mechanizmusai

3.1.1 A P2X7 szerepe a gyulladásos ATP-jelátvitelben

A szinaptikus vezikulákban és az asztrociták vezikuláiban különböző neurotranszmitterekkel együttesen ATP is tárolódik, és többféle mechanizmuson keresztül szabadulhat fel az idegvégződésekből, dendritekből és axonokból [5], asztrocitákból [6] és mikrogliaiból [7, 8]. A fiziológiás neuronális aktiváció során ATP szabadul fel, amely neurotranszmitterként és modulátorként részt vesz a szinaptikus transzmisszióban, a környező sejteken lévő P2X7 receptorokat aktiválva pedig befolyásolja a sejtek közötti jelátvitelt, hozzájárulva a fiziológiás idegi működésekhez [9]. Gyulladásakor, vagy hipoxia esetén az extracelluláris ATP-szint jelentősen megemelkedhet a sérült, apoptotikus sejtekből történő aktív

felszabadulás és passzív szivárgás miatt, ilyenkor az ektonukleotidázok szintje pedig csökken [10] (*1. ábra*). Az ATP-felszabadulásban számos ioncsatorna, mint a konnexin félcsatorna, a pannexin 1 (Panx1), a térfogatszabályozott anioncsatornák (VRAC), a maxi-anioncsatornák és a kalcium homeosztázis modulátor 1 (CALHM1) vesz részt [11]. Az extracelluláris ATP-koncentráció növekedése aktiválja a sejtfelszíni P2X és P2Y receptorokat. A purinerg P2X receptorok homo- (P2X7) vagy heteromer nem-szelektív ligand-aktivált membránkötött kationcsatornák, melyeket a P2X1-7 altípusok három alegysége alkot. Az idegrendszerben széleskörben expresszálódnak, mind a központi, mind a perifériás idegek és gliasejtek révén [12]. A P2X-receptorok ATP-kötésre nyílnak, ami kationbeáramláshoz, membrándepolarizációhoz vagy kalciumfüggő enzimatisus jelátvitelhez vezet [13]. A P2X7-nek a többi P2X receptorhoz képest egyedülálló módon alacsonyabb az ATP-hez való affinitása (0,1-1 mM), ezáltal főként fokozott extracelluláris ATP-szinttel járó patológiás körülmények között aktiválódnak [14, 15]. Ilyen körülmény a gyulladásos környezet, vagy a környező sejtek trauma, hipoxia vagy egyéb káros események hatására létrejött pusztulása. A P2X7 másik jellemzője, hogy hosszútávú, magas extracelluláris ATP-koncentráció hatására hosszantartó P2X7-aktiváció alakul ki, mely gyors Ca^{2+} és Na^{+} beáramlást és K^{+} kiáramlást eredményez létrehozva egy nagy, ~900 Da-ig terjedő molekulákat áteresztő, nem szelektív transzmembrán pórust a sejtfelszínen, mely létrejötté sejtlyzist/nekrózist vagy apoptózist indukál [16]. A P2X7 jelátviteli útvonalának alapvető szerepe van a gyulladás fenntartásában és felerősítésében, és egy ATP-visszacsatolási hurok révén hozzájárulhat hosszútávú gyulladásos állapotok kialakulásához.

3.1.2 A P2X7 és a pannexin-1 kölcsönhatása a gyulladás során

A P2X7 által indukált intracelluláris kalciumszint-emelkedés a veleszületett immunitás korai szakaszában a pannexin-1-et aktiválhatja, ami a membránpermeabilitás növekedéshez és makromolekulák felszabadulásához vezet [17]. A pannexinek a plazmamembránban, az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-membránban jelen lévő hemicsatornák, melyek önálló transzmembrán csatornákat képezhetnek 1000 Da-nál kisebb molekulák szállítására. Bár általánosan elfogadott, hogy a pannexin-1 citotoxikus hatású [18], ugyanakkor egyes tanulmányok sejthalállal szembeni védő funkcióról is beszámolnak [17, 19], valamint azt is

leírják, hogy a Panx1 és a P2X7R egymásra szabályozó hatással lehetnek egymásra a lokalizációjuk, fizikai kölcsönhatásaik és konvergens tevékenységekben való részvételük alapján [17, 20]. A pannexin-1 ATP-vezetési és -felszabadítási tulajdonságai azonban nem meghatározottak [21], és a pannexin-1 megnyílásának mechanizmusa sem teljesen ismert [22]. Összességében a kérdés erősen ellentmondásos, de az aktiválási idő növelése, akár a P2X7 receptor ionos pórusának tágulásával, akár a nagy konduktanciájú kiegészítő fehérjék, például a hemicsatornák megnyílásával [23], lehetővé teszi a nagy kationok felvételét és az ATP további felszabadulását a sejtekből, így hozzájárulva a P2X7 és egyéb purinerg receptorok aktivációjához. Valószínű, hogy mind a P2X7, mind a pannexin-1 kiemelkedő szerepet játszik a központi idegrendszer (KIR) nem-szinaptikus kommunikációjában, különösen gyulladásos állapotokban.

3.1.3 TLR-indukált priming és az NLRP3 inflammaszóma P2X7-mediált aktiválása

Fertőzés esetén olyan válaszok váltódnak ki a szervezetben, ahol a külső veszélyt jelentő ingerek, mint a vírus RNS vagy a bakteriális lipopoliszacharid szekvencia, kölcsönhatásba lépnek a Toll-szerű receptorokkal (TLR) [24]. A TLR-ek a központi és perifériás idegrendszer immun-, gliális és neuronális sejtjeiben kifejeződő veleszületett immunreceptorok [25]. A TLR-ek részt vesznek fertőző és nem-fertőző folyamatokban is a központi idegrendszerben. Modulálhatják a gliális és neuronális funkciókat, illetve a veleszületett immunitást és a neuroinflammációt, mind fiziológiás, mind patofiziológiás körülmények között, mint például fertőzések, a központi idegrendszeri autoimmunitás, neurodegeneráció, tartós stresszhatás és szöveti sérülések esetén [25-27]. A specifikus TLR-ek különböző PAMP-okat ismernek fel: a TLR3 felismeri a kettős szálú RNS-t, a TLR4 a bakteriális lipopoliszacharidot (LPS), a TLR5 kölcsönhatásba lép a bakteriális flagellinnel [28], a TLR7 és a TLR8 felismeri az intracelluláris egyszálú RNS-t, például a vírusligandumokat, nukleozidokat és oligoribonukleotidokat [29, 30], a TLR9 pedig bakteriális vagy virális CpG DNS-motívumokat ismer fel [31]. A TLR-receptorok ligandhoz kötődése a gyulladásos citokin prekursorok, például a pro-IL-1 β , pro-IL-18 és NLRP3 NF- κ B-függő transzkripció expressziójához vezet [32]. Egyes tanulmányok szerint az NLRP3 poszttranszlációs módosításai, mint például a foszforiláció és az ubikvitináció, szintén

hozzájárulhatnak ehhez a priming fázishoz [33, 34]. Az aktív IL-1 β előállításához és szekréciójához azonban a priming fázisban lévő indukált sejtek egy újabb PAMP- vagy DAMP (pathogen- or damage-associated molecular patterns) -hatás alá kell esnie. Egy második, DAMP-ok által indukált aktivációs lépés részeként az extracelluláris ATP növekedése aktiválja a P2X7-et, ami az NLRP3 inflammaszóma kialakulásához vezet [35] (1. ábra). Bár az NLRP3 aktiváció pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, fontos szerepet játszik benne a K⁺ kiáramlás, a Ca²⁺ jelátvitel, a Na⁺ beáramlás és a Cl⁻ kiáramlás, amelyek közül a celluláris K⁺ kiáramlás a legfontosabb és legjobban azonosított lépés az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában [32, 33, 36, 37]. Bár az intracelluláris K⁺ kiürülés fontos elem, egyes tanulmányok szerint a reaktív oxigéngyökök termelődése K⁺-kiáramlástól függetlenül is aktiválhatja az NLRP3 inflammaszóma kialakulását [38]. A P2X7 az intracelluláris K⁺ csökkenését, az intracelluláris Ca²⁺ növekedését, a ROS-termelés indukcióját, a mitokondriumok depolarizációját és a lizoszómák destabilizációját magában foglaló mechanizmusok kombinációján keresztül járulhat hozzá az NLRP3 aktivációjához [33, 36, 37, 39, 40]. Az NLRP3 inflammaszóma komplex az NLRP3-szenzorból, az ASC adaptor fehérjéből és a pro-kaspáz-1-ből áll össze. Aktiváláskor az NLRP3 kölcsönhatásba lép az ASC-vel, amely ezután magához vonja a pro-kaspáz-1-et, kialakítva az NLRP3 inflammaszómát. Ezt követően a komplex dimerizáció és hasításos folyamatok révén aktiválja a kaspáz-1-et [41]. Az aktív kaspáz-1 egy cisztein-proteáz, amely a pro-IL-1 β -t proteolízissal alakítja biológiailag aktív formájává, amely készen áll az extracelluláris térbe való kibocsátásra [42]. Érdekes módon egy nemrégiben végzett vizsgálat során ATP-indukált P2X7-mediált IL-1 β felszabadulást mértek primer makrofágokban farmakológiai és genetikai NLRP3-depléción jelenlétében, ami arra utal, hogy a P2X7 képes NLRP3-független IL-1 β felszabadulást is kiváltani [43]. További kutatások szükségesek ennek az aktivációs mechanizmusnak bizonyításához.

3.1.4 IL-1 β felszabadulás és jelátvitel a KIR-ben

Az aktív IL-1 β sejtekből való felszabadulásának számos lehetséges mechanizmusát leírták. Ide tartozik a lizoszómák szabályozott szekréciója [44], a mikrovezikulák leválása a plazmamembránról [45], az exoszómákból a kaspáz-1-gyel és más inflammaszóma-

komponensekkel együttes felszabadulás [46], a sejthalál során a hiperpermeábilis plazmamembránon keresztül történő közvetlen felszabadulás [47] vagy piroptózis [48]. Ismeretes ma már, hogy az IL-1 β -t közvetlenül a KIR sejtei is termelik beleértve a mikroglia sejteket, asztrocitákat, oligodendrocitákat, neuronokat, továbbá ezen sejttípusok mindegyike képes reagálni is a citokinre. Az IL-1 β pleiotróp hatással rendelkezik a KIR-ben: az egészséges agyban neuromodulátorként részt vesz a szinaptikus plaszticitásban, valamint számos KIR-betegség patogén folyamatában játszik szerepet [49]. Továbbá serkentheti az IL-6 termelődését az asztrocitákban és a neuronokban, valamint az indukálható nitrogén-oxid-szintáz (iNOS) aktivitását az asztrocitákban hozzájárulva a gyulladásos válaszokhoz [50, 51]. Az IL-1 β az IL-1R1 receptorhoz kötődve fejt ki jól ismert pro-inflammatorikus hatását, míg az IL-1R2 receptorhoz kötődve gyulladáscsökkentő hatással bír. Az IL-1R3 társreceptorként működik, trimer jelátviteli komplexet alkotva az IL-1 β -vel és az IL-1R1-gyel. Fiziológias körülmények között az IL-1R1 és az IL-1R3 a sejtmembránon vannak jelen, és mátrix metalloproteázok hasítása által szolubilis, keringő formává is válhatnak. Mind a membránhoz kötött, mind az oldható forma biológiailag aktív [52]. Az IL-1 β kötődése az IL-1R1-hez konformációs változást indukál, amely lehetővé teszi az IL-1R3 kötődését [52]. Az így létrejövő komplex a TIR-domén dimerizációjához vezet, rekrutálja a MyD88-at és elindít egy IRAK-okat és a TRAF6-ot magában foglaló szignáltranszdukciót. Ezt követően több intracelluláris foszforilációs és ubikvitinációs lépés vezet a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) p38, a c-Jun N-terminális kináz (JNK) és a nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) aktivációjához [53]. Ezen változások végül számos gyulladással kapcsolatos gén, többek között az IL-6, IL-8, iNOS, monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1), ciklooxygenáz-2, I κ B α , IL-1 α , IL-1 β és MAPK-foszfataz 1, mRNS-átíródásához vezet [54]. Az endogén interleukin-1 receptor antagonista (IL-1Ra) képes ellensúlyozni az IL-1R1-et azáltal, hogy gátolja az IL-1R1 és az IL-1R3 asszociációját, így kompetitíven blokkolja az IL-1 β jelátvitelt [53]. Az IL-1R2 membránhoz kötött és szolubilis formában is létezik, szerkezetileg hasonlít az IL-1R1-re, azonban csonka citoplazmatikus doménje és a TIR-régió hiánya miatt az IL-1R2 képtelen transzmembrán jelátvitelre, azaz kötődni és szekvesztrálni képes az IL-1 β -t, de jelátvitelt nem indukál. A szolubilis IL-1R2 az extracelluláris térben megköti az IL-1 β -t és

az IL-1 β aktivitásának semlegesítését nagymértékben fokozza, ha szolubilis IL-1R3-mal komplexet alkot [52].

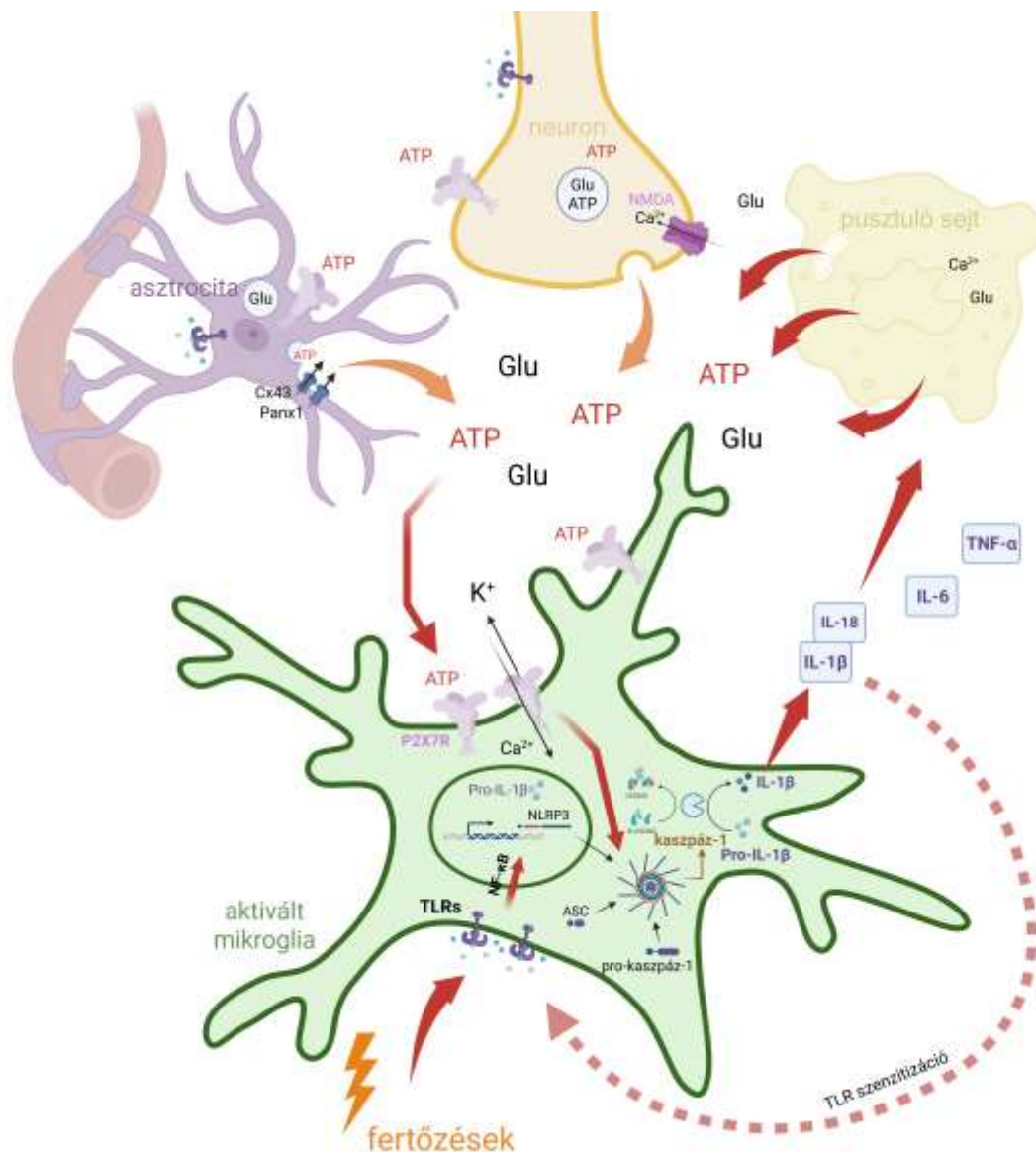
3.1.5 Sejtípus-specifikus jelátvitel és az IL-1 β hatásának összetett szerepe a KIR-ben

Az idegrendszerben az IL-1R1 expresszióját több sejtípus-specifikus promóter irányítja, ami lehetővé teszi az IL-1R1 expresszió sejtípus-specifikus szabályozását [55]. Így az agyban az IL-1 β változatos hatásai valószínűleg különböző sejtípus-specifikus IL-1R1 jelátviteli útvonalakból (pl. p38 MAPK, NF- κ B) erednek, amelyek szövet- vagy sejtípustól függően külön-külön vagy kombinációban aktiválódhatnak [53, 56]. A sejtípus-specifikus IL-1 β -expresszió és -szignalizáció vizsgálata, illetve az IL-1 β -hatás központi idegrendszeri célpontjainak azonosítása azonban továbbra is kihívást jelentenek, és egyes tanulmányok ellentmondásos adatokat mutatnak [55]. Régóta feltételezik, hogy az IL-1 β képes átjutni a vér-agy gáton [57]. Neuronális gyulladás során az IL-1 β ismerten serkenti az adhézións molekulák expresszióját az endotélsejteken, amelyek megkönnyítik az immunsejtek kitapadását és vér-agy gáton való átjutását [58]. Azonban az endoteliális IL-1R1 szerepe a vér-agy gátnál és szerepe a hatások közvetítésében és az átjutás mechanizmusában továbbra is bizonytalanok [55].

3.1.6 A mikroglia sejtek szerepe és sejtközötti kölcsönhatásai a P2X7-mediált neuroinflammáció fenntartásában

Az IL-1 β sejtípus-specifikus hatásai különösen fontosak az agyi immunválasz szempontjából, mivel a mikroglia – mint az idegrendszer rezidens immunsejtje – egyszerre forrása és célpontja is e citokinnek. Ez a kétirányú kapcsolat lehetővé teszi a gyulladásos válasz lokalizált, de hosszú távon is fennmaradó szabályozását. A P2X7 receptor a központi idegrendszer immunhomeosztázisának kulcsszereplője, különösen a mikroglia sejtekben betöltött szerepe révén. A mikroglia aktivációja során két egymással összefonódó, önfenntartó gyulladásos visszacsatolási hurok alakulhat ki, melyek központi elemei a P2X7 receptor és a gyulladásos citokinek. A fertőzések hatására létrejött TLR-mediált NF- κ B aktiváció fokozza a pro-IL-1 β transzkripcióját, mely IL-1 β felszabaduláshoz vezet. Az aktivált IL-1 β tovább érzékenyíti a TLR-jelátvitelt [59], és fokozza a mikroglia reaktivitását.

Ezzel párhuzamosan a pro-inflammatorikus környezet hatására extracelluláris ATP és glutamát (Glu) szabadul fel neuronokból, asztrocitákból (Cx43 és Panx1 hemicsatornákon keresztül), valamint károsodott sejtekből. A felszabadult ATP fiziológias körülmények között az idegi sejtek közötti kommunikáció szabályozásában vesz részt, azonban kóros vagy stresszhelyzetekben a magas ingerküszöbű P2X7 aktivációját idézi elő többek között a mikroglia felszínén, amely kálium effluxot és kalcium influxot eredményez, előidézve a NLRP3 inflammaszóma összeszerelődését, a kaspáz-1 aktivációját, majd a pro-IL-1 β hasítását érett IL-1 β -vá a korábbi leírásnak megfelelően. Ez a folyamat gyulladásos citokinek felszabadulásához vezet, és egy második visszacsatolási kört indít el, amelyben a citokinjelátvitel, a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődése, valamint a gyulladás következtében felszabaduló ATP tovább fokozzák a mikroglia aktivációt és fenntartják a neuroinflammáció állapotát. Ez a két egymással összefonódó visszacsatolási kör – a TLR–NF- κ B útvonalon történő gyulladásos priming, valamint az ATP–P2X7R–inflammaszóma aktiváció központi elemeknél találkozik, mint a pro-IL-1 β transzkripció és az inflammaszóma-aktiváció. Ezek konvergenciája hosszan fennálló mikroglia reaktivitást, szinaptikus plaszticitási zavarokat és krónikus gyulladásos állapotot eredményezhet az agyban (*1. ábra*).



1. ábra Két egymásra ható visszacsatolási hurok fenntartja a krónikus mikroglia-eredetű neuroinflammációt. A fertőzések hatására létrejött TLR-mediált NF- κ B aktiváció fokozza a pro-IL-1 β transzkripcióját, mely IL-1 β felszabaduláshoz vezet. Az aktivált IL-1 β tovább érzékenyíti a TLR-jelátvitelt, és fokozza a mikroglia reaktivitását. Ezzel párhuzamosan a pro-inflammatorikus környezet hatására extracelluláris ATP és glutamát (Glu) szabadul fel neuronokból, asztrocitákból (Cx43 és Panx1 hemicsatornákon keresztül), valamint károsodott sejtekből. A felszabadult ATP a magas ingerküszöbű P2X7 aktivációját idézi elő, többek között a mikroglia felszínén, amely kálium effluxot és kalcium influxot eredményez, előidézve a NLRP3 inflammaszoma összeszerelődését, a kaspáz-1 aktivációját, majd a pro-IL-1 β hasítását érett IL-1 β -vá a korábbi leírásnak megfelelően. Ez a folyamat gyulladásos citokinek felszabadulásához vezet, és egy második

visszacsatolási kört indít el, amelyben a citokin-jelátvitel, a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődése, valamint a gyulladás következtében felszabaduló ATP tovább fokozza a mikroglia aktivációt és fenntartják a neuroinflammáció állapotát, amely rontja a neuroplaszticitást és hosszú távon fokozza a pszichiátriai zavarok iránti sérülékenységet. Ez a két egymástól függő visszacsatolási hurok közös kulcspontokban, például a pro-IL-1 β termelésben és az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában konvergál. Szerkesztett saját ábra, módosítva: Kristóf et al., 2025 alapján [60].

3.2 A P2X7/NLRP3/IL-1 β jelátviteli útvonal szerepe a fejlődő idegrendszerben

A P2X7 receptorok szerepe ugyanakkor nem korlátozódik a mikroglia által mediált gyulladásos válaszokra. A következőkben azt vizsgáljuk meg, hogy a P2X7/NLRP3/IL-1 β jelátviteli útvonal milyen specifikus szerepet játszik a fejlődő idegrendszerben fiziológias fejlődési állapotok esetében.

3.2.1 A P2X7 receptorok szerepe a neuronális fejlődésre

Prenatális fejlődés: Állatkísérletek alapján a P2X7 alegység expressziója az embrionális neurogenesis során E14-15 napon kezdődik patkányok agyában [61-63] és a posztnatális fejlődésig (P16) tart [64]. A P2X7 vezető szerepet játszik a sejtfunciók megváltozásában az aktuális fejlődési kornak megfelelően egészen a felnőttkori neurogenesisig. A P2X7 szabályozza az axonális megnyúlást, a szinapszisok kialakulását és a neuroprotektiót, valamint modulálja a neuroinflammációt [65, 66]. A felnőttkori neurogenesishez hasonlóan a P2X7 az embrionális fejlődési folyamatokban is szabályozza a proliferációt és módosítja a sejtciklus progresszióját, de nem okoz sejthalált [63]. A P2X7 fokozott expressziója és aktivitása embrionális sejtekben hozzájárul az embrionális őssejtek proliferációjának fenntartásához, míg a neuronális differenciálódás megindulásakor expressziója és aktivitása visszaszorul, indikálva a neuroektodermális differenciálódás és a neuronális sorsmeghatározás kezdetét [67]. Immunfluoreszcens festési eljárás során bizonyították, hogy a P2X7 mind a sejtek szómájában, mind a neuronális nyúlványokban kifejeződik 3 napos újszülött patkányok agymintáiban. Ez a vizsgálat azt is kimutatta, hogy a P2X7 széles körben kifejeződik a prefrontális kéreg minden rétegében újszülött patkányokban [68]. Sebastián-Serrano és munkatársai in-utero agykérgi elektroporációt végeztek, hogy meghatározzák a P2X7 részvételét a neurológiai rendellenességekhez társuló axon megnyúlási zavarokban

[66]. Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatáa során megállapították, hogy, a P2X7 szabályozza a dendritikus növekedést és elágazódást is a fejlődés korai szakaszában [69]. A fiziológiás agyfejlődést károsító prenatális és korai életkori tényezők a purinerg rendszer megváltoztatásával hozzájárulnak a felnőttkori viselkedésbeli és neurokémiai változásokhoz [70]. Felnőttkori neurogenesis: A korai fejlődésen túl a P2X7-receptorok a felnőttkori neurogenesisben és neuroregenerációban is döntő szerepet játszanak. A posztnatális agyban a P2X7-nek vezető szerepe van a neuronális fiziológia fenntartásában, beleértve az axonális megnyúlást, elágazást és neurotranszmitter felszabadulást [71]. A neurális progenitor sejtek neuronokká, asztrocitákká és oligodendrocitákká differenciálódhatnak. A P2X7 receptorok expresszióját a progenitor sejteken már régóta bizonyították [72]. A P2X7 receptorok szerepet játszanak a neurális őssejtkészlet folyamatos fenntartásában és mennyiségi szabályozásában [73]. A felnőtt emlős hippokampuszban a neurogenesis tartós és alapvető funkció, amelyben a P2X7-nek változatos szabályozó funkciói vannak, nevezetesen a transzmembrán pórusképződésen keresztül a sejthalált indukálja [74], modulálja a glutamát felszabadulását és a neurotrofikus faktorok, például a BDNF jelátvitelét [75], valamint a mikroglia scavenger receptoraiként is működhetnek. Továbbá a neurális progenitorok és neuroblasztok is P2X7-mediált fagocitózison keresztül eliminálják a sejtörmelékét. A receptornak a proliferáció, a differenciálódás és az axonnövekedés szabályozásában is potenciális szerepe lehet [74]. A fent említett pórusképződés, melyet az extracelluláris ATP-koncentráció növekedése indukál, az inger természetétől, az inger időtartamától és a sejtípustól függően sejtízist/necrosist vagy apoptózist eredményez [16]. Így a KIR-hez kapcsolódó, nagyfokú gyulladással és ATP-felszabadulással járó káros események során a P2X7-receptorok késleltethetik a regenerációt és a sejtek megújulását.

3.2.2 Az NLRP3 funkciója és szerepe az idegsejtek fejlődésében

Az NLRP3 szerepét széles körben leírták a központi idegrendszeri rendellenességekben, de nagyon kevés adat áll rendelkezésre a fiziológiás agyfejlődésben betöltött szerepéről. A gyors neuronális sejtproliferáció következtében az idegsejtek fejlődése során sok neuron elhal. Lammert és munkatársai egyedülálló módon kimutatták, hogy normálisan fejlődő idegrendszerben a veleszületett immunrendszer döntő szerepet játszik a sérült sejtek

eliminálásában és piroptózis révén ATP, sérült mitokondriumok és ROS-ok extracelluláris térbe való kibocsátásában [76]. Piroptózisnak a lítikus sejthalál szabályozott formáját nevezzük, amely a megfelelő KIR fejlődéshez és működéshez elengedhetetlenül szükséges [77]. Lammert és munkatársai emellett az ASC adapter fehérje erős festődését írták le az egész agyban az 5. posztnatális napon, ami megerősíti az inflammaszóma komplex jelenlétét ezen időpontban. Ugyanakkor azt találták, hogy míg az AIM2 inflammaszóma (citoszolikus DNS által aktivált) és a kaspáz-1 hiánya egérkísérletekben szorongásszerű viselkedést eredményezett az emelt keresztpalló labirintusban és a nyílt tér tesztben, addig az NLRP3 hiánya nem befolyásolta az állatok viselkedését [76]. Ezzel összhangban az ASC és a kaspáz-1 transzkriptjei, amelyek mindketten az NLRP3 leszálló mediátorai, normális idegfejlődési körülmények között kimutathatónak tűnnek a korai emberi magzati neuronokban, asztrocitákban és BMC-kben (Brain Macrophage-like Cells), míg az NLRP3 mRNS-e csak akkor jelenik meg, ha a sejt priming stimulációban részesül [78]. Az NLRP3 fiziológiás agyfejlődésben betöltött szerepének tisztázásához vagy kizárásához további vizsgálatokra van szükség.

3.2.3 Az IL-1 β működése és szerepe a normál neuronális fejlődésben

Az IL-1 β a prenatális és posztnatális fejlődés során nagymértékben expresszálódik az agyban, majd felnőttkorban alacsony szintre csökken, ami arra utal, hogy alapvető szerepet játszik az agy fejlődésében [79]. Humán embrionális előagyi sejtekben az 5. héttől kezdve kimutatható volt a konstitutív IL-1 β expresszió, amely a 7. héten körülbelül 50%-kal nőtt, és a 10. héten volt a legmagasabb [80]. Hasonlóképpen, az IL-1-et patkányembriókban is kimutatták E14-től egészen a felnőttkorig, a legmagasabb expresszióval E18-nál [81]. In vitro állatkísérletek alapján az IL-1 β dózisfüggő módon fontos szerepet játszik az agykérgi neuronok migrációjában [79] és az asztrocita progenitor sejtek migrációjában a kalcium jelátvitel modulálásával [82] a KIR fejlődés korai szakaszában. Az IL-1 β részt vesz a migráló neuronok vezető végződéseinek, az úgynevezett növekedési kúpok az irányításában, hozzájárulva a migráció irányának szabályozásához [79]. Továbbá in vitro vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az IL-1 β részt vesz a neurit kinövések szabályozásában, ami meghatározó eleme a korai neuronális fejlődésnek. Részletesebben, az IL-1 β szinergikusan hat a

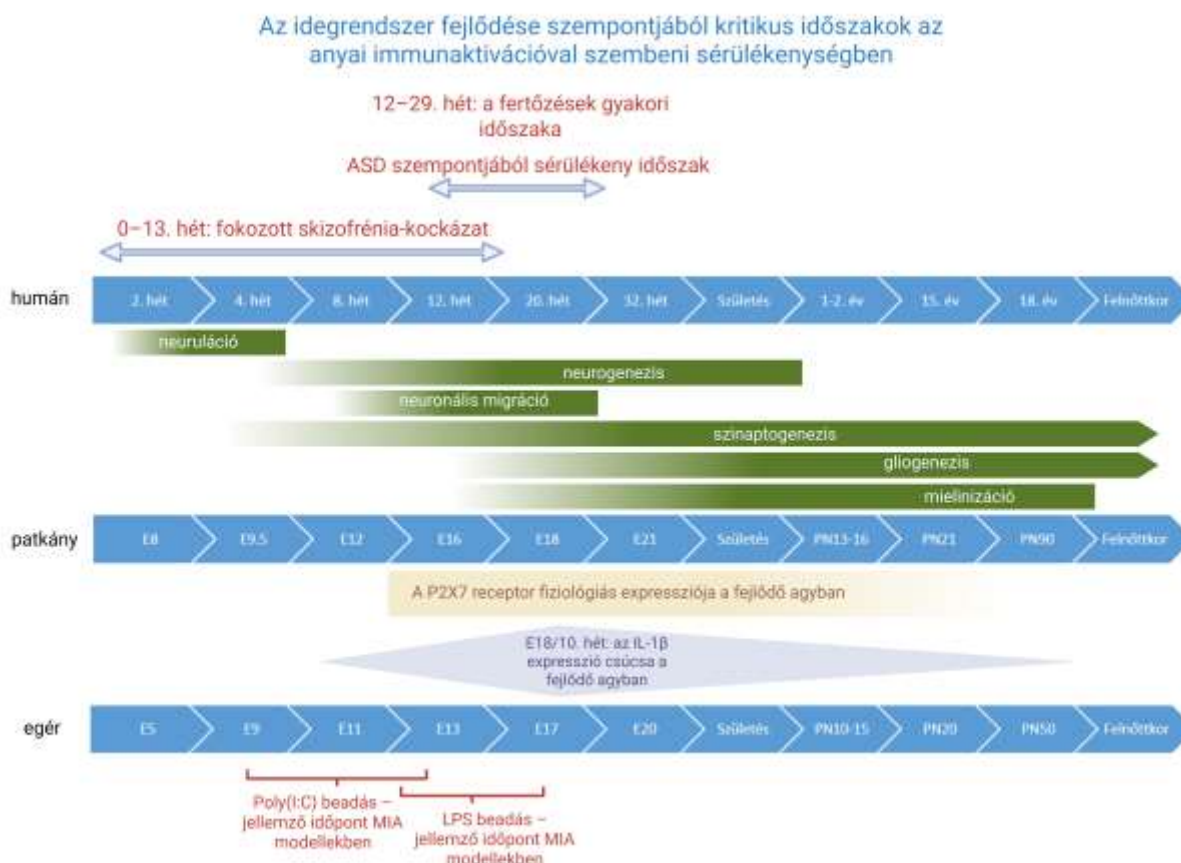
neurotrofin-3-mal, és mindkettő stimulálja a neuritok sűrűségét és hosszát, potenciálisan a Wnt5a/RhoA/JNK útvonalon keresztül [83]. Az agykérgi neuronok in vitro és in vivo is expresszálják az IL-1R1-et [79]. Mind a sejtmigráció, mind a neuritok kinövésének diszregulációja autizmus spektrumzavarhoz (ASD) és más idegfejlődési zavarokhoz vezethet [84].

3.3 A prenatális gyulladásos környezet és az idegrendszeri fejlődés kapcsolata

3.3.1 Anyai fertőzések és a fejlődő agy sérülékenysége, fejlődési ablakok

Bár a terhes nők több mint fele legalább egy fertőzésen átesik [85], a legtöbb esetben a magzatban nem alakul ki agyi fejlődési rendellenesség. Azonban számos klinikai vizsgálat egyre inkább azt mutatja, hogy a terhesség alatti különböző fertőzések nagyobb kockázatot jelentenek a gyermek- és serdülőkorban kialakuló idegrendszeri fejlődési zavarok kialakulására [86], melyek halmozott környezeti expozíció hatására összeadódnak. A fertőzés hatása az idegi fejlődésre számos tényezőtől függ, többek között a fertőzés típusától, a fertőzés időpontjától, a súlyosságától és a fertőzés helyétől. A járványok és a skizofrénia fokozott előfordulása közötti kapcsolat egyértelműen kimutatott [87]. Mindazonáltal még számos ismeretlen tényezőt kell feltárni a kockázati tényezők és a fertőzés időpontja közötti összefüggések megértéséhez. A terhesség első trimeszterében (0-13. hét) az ektoderma behajlik és fuzionál miáltal a második és harmadik hét során kialakul a neuroncső (neuruláció) [88, 89] (2. ábra). A negyedik héten a neuroncső rostrális része három hólyagocskát képez, amelyekből az előagy, a középagy és a hátsóagy fejlődik ki. Az 5-6. hétre a neuronális prekursorok gyors proliferáción mennek keresztül, amely genetikailag meghatározott és epigenetikusan a környezet által szabályozott [88]. A 8. hétre a neuroblasztok specifikus neuronális sejttípusokká vagy makrogliákká differenciálódnak (neurogenézis). Ezek a neuronok a késői első és a második trimeszter (12-29. hét) során vándorolnak a kérgi rétegbe, és végül szinapszisokat képeznek [90]. A harmadik trimeszter során a gliális prekursorok neuronális axonokká és gliákká, például asztrocitákká és oligodendrocitákká alakulnak (gliogenezis) [91]. Az agy morfológiája és plaszticitása a születés után is tovább fejlődik [88]. A terhesség alatti fertőzések többsége a második trimeszterben fordul elő [85], ami összefüggésbe hozható az immunológiai változásokkal

vagy a második trimeszterben zajló aktívabb életmóddal. Az első és a második trimeszter a legvesélyeztetettebb a hosszú távú neuronális változásokat okozó prenatális vonatkozásában [92]. Elsősorban az első trimesztert hozták összefüggésbe a skizofrénia magasabb kockázatával [93-95], míg az ASD kialakulásának kockázata nagyobb a második trimeszterben, amikor a magzati agy jelentős növekedésen és differenciálódáson megy keresztül, de az első trimeszterben nem [96-98]. A harmadik trimeszteri fertőzés enyhe mértékben, de szintén összefüggésbe hozható az ASD fokozott kockázatával [98]. A legújabb vizsgálatok azt mutatták, hogy a harmadik trimeszteri fertőzések növelik a kognitív károsodások, különösen a teljesítmény-IQ kockázatát [85, 99]. A harmadik trimeszterben bekövetkezett bakteriális fertőzések és a kora gyermekkori kognitív károsodások közötti összefüggések a jelek szerint a férfiak körében és a súlyosabb fertőzések vagy a többszervi fertőzések esetében a legerősebbek [99]. Egy tanulmány szerint az anyai fertőzés a harmadik trimeszterben látens hatást gyakorolhat a kognitív fejlődésre, amely csak akkor jelentkezik, amikor a kognitív terhelés idővel növekszik [85]. Ez jó példa arra is, hogy a korai gyermekkori hatásai megváltoztathatják az agyi diszfunkciók megnyilvánulását.



2. ábra. A fejlődő idegrendszer kritikus időszakai az anyai immunaktivációval szemben. A fejlődő idegrendszer a gesztáció során különböző érzékenységet mutat az anyai immunaktivációval szemben. Az első trimeszteri fertőzések a skizofrénia nagyobb kockázatával, míg a második trimeszteri fertőzések az ASD fokozott kockázatával hozhatók összefüggésbe. A harmadik trimeszteri fertőzések enyhe összefüggést mutatnak az ASD fokozott kockázatával. A P2X7 expressziója, amely a patkányok agyában E14-15-ben kezdődik és a posztnatális fejlődés során folytatódik, valamint az IL-1 β magas prenatális és posztnatális expressziója (amely E14-től kimutatható, E18-ban tetőzik, és alacsony felnőttkori szintre csökken) arra utal, hogy ezekben a veszélyeztetett időszakokban döntő szerepet játszanak az agy fejlődésében. Az anyai immunrendszer aktiválása ezekben a szakaszokban megzavarhatja ezeket a kritikus folyamatokat, ami potenciálisan hozzájárulhat az idegrendszeri fejlődési rendellenességek kialakulásához. Saját szerkesztésű ábra.

3.3.1.1 Vírusfertőzések és idegrendszeri fejlődési zavarok

Számos vírust, mint például az influenzát, a herpes simplex 1-es és 2-es típusát, a citomegalovírust, az Epstein-Barr vírust, a retrovírust, a koronavírus, a Zika vírust és a rubeolát hoztak összefüggésbe a közelmúltban az idegrendszeri fejlődési rendellenességek kialakulásával [100-104], de további vizsgálatokra van szükség ezen eredmények megerősítéséhez és az érintett mechanizmusok feltárásához. A vírusok közvetlen módon, vagy közvetetten, immunmediátorokon, például citokineken vagy kemokineken keresztül hatva zavarják meg a normális agyi érést. Egy eset-kontroll humán vizsgálatban kimutatták, hogy a terhesség alatti többszörös vírusfertőzések ASD-érintett gyermek születésének fokozott kockázatával járt. Az ASD kockázata statisztikailag hasonló volt azoknál az anyáknál, akik kaptak kezelést fertőzésükre, és azoknál, akik nem kezelték fertőzésüket, ami hangsúlyozza a megelőzés fontosságát [105]. Állatkísérleteknél a fokozott anyai immunaktiváció [106, 107], amelyet a központi idegrendszer fejlődése során egy adott időpontban bekövetkező vírusfertőzés indukál, növeli mind az ASD-, mind a skizofréniaszerű tünetek prevalenciáját az utódoknál. 2012-ben Lee és munkatársai kimutatták, hogy a P2X7 receptor kulcsszerepet játszik a vírusfertőzés indukálta veleszületett immunsejtek gyulladásos válaszában a fertőzés korai szakaszában. A P2X7-hiányos, P2X7-gátlóval kezelt, kaszpáz-1-hiányos vagy ATP-hiányos egerek nagyobb túlélést mutattak egy vírus által kiváltott, magas mortalitású légzési distressz szindrómában [108].

3.3.1.1.1 A SARS-CoV-2 fertőzés hatása a neurodevelopmentális folyamatokra

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a P2X7R/NLRP3/IL-1 β tengely szerepet játszhat a 2019-ben kitört pandémia okozta SARS-CoV-2 fertőzés kiváltotta immunszabályozási zavarokban is [90, 109], melyek neurológiai és neuropszichiátriai következményeket vonnak maguk után. Egy részletes humán vizsgálatban Lécuyer és munkatársai kimutatták, hogy a P2X7-NLRP3 jelátviteli útvonal a gyulladás mellett jelentős szerepet játszhat a vírusreplikációban is [90]. Fokozott, P2X7-független NLRP3 expressziót találtak a súlyos koronavírus-betegségben szenvedő betegek tüdőautopsziáiból származó SARS-CoV-2 gazdasejtjeiben. Ez a NLRP3 inflammaszóma aktiváció biztosítja az epiteliális sejtek SARS-

CoV-2 fertőzéssel szembeni permeabilitását. Ugyanakkor a P2X7 az NLRP3 inflammaszóma aktivációján keresztül modulálja a SARS-CoV-2 replikációt [90]. A COVID-19 betegek plazmájában a megemelkedett szolubilis P2X7 (sP2X7) koncentráció korrelál a betegség súlyosságával, valamint a CRP-szinttel [109]. Hasonlóképpen, a korai COVID-19-ben a megemelkedett szérumban P2X7 a kedvezőtlen klinikai kimenetelt jelzi előre, ami arra utal, hogy a sP2X7 hasznos betegségprogressziós marker lehet [110]. A COVID-19 morbiditása és mortalitása részben a gyulladásos válasznak köszönhető [111]. A terhes nők megbetegedése súlyosabb [112], és a fertőzött terhes nőknél mindmáig nagyobb a koraszülés valószínűsége, újszülöttjeiknél pedig nagyobb a halvaszületés vagy az újszülöttsztyára való felvétel kockázata [113, 114]. Számos vizsgálat arra utal, hogy vertikális átvitel lehetséges [115, 116], különösképpen a harmadik trimeszteri fertőzések esetén bizonyított, míg az első két trimeszterről továbbra is kevés adat áll rendelkezésre [117, 118]. A magzati fejlődés során a fertőzéssel összefüggő gyulladásos állapotok potenciálisan hosszú távú rendellenességekhez vezethetnek az utódoknál [119]. Gyulladásos és trombotikus elváltozásokat figyeltek meg a fertőzött anyák placentájában [120]. Shuffrey és munkatársai kimutatták, hogy a világjárvány alatti születés, de nem feltétlenül az anyaméhben történő SARS-CoV-2 expozíció, neurodevelopmentális eltérésekhez vezetett hat hónapos korban [121]. Ennek a vizsgálatnak azonban vannak korlátai, és csak hat hónapos korig terjed, amikor még jellemzően kevés neurodevelopmentális rendellenességet azonosítanak. Egy prospektív kohorszvizsgálatban Ayed és munkatársai azt találták, hogy a terhesség alatt SARS-CoV-2 fertőzésben szenvedő anyáktól született csecsemők 90%-ánál kedvező volt a kimenetel, és csak 10%-uknál mutatkozott fejlődési késés, ami hasonló az átlagpopulációhoz, de a pontos definíció hiánya megnehezíti az összehasonlítást [122]. Míg ebben a vizsgálatban a legtöbb terhes nő a harmadik trimeszterben fertőződött meg, a fejlődési késések (különösen a motoros készségek terén) kockázata 10-12 hónap körül nagyobb volt, ha a fertőzés az első vagy a második trimeszterben következett be [122]. Egy friss metaanalízis szerint a prenatális vagy neonatális SARS-CoV-2 fertőzésnek való kitettség korai csecsemő fejlődési kimenetelére gyakorolt potenciális hatásáról szóló bizonyítékok korlátozottak és ellentmondásosak. Nagyobb kohorszokra van szükség az egy évnél idősebb korosztályok vizsgálatához [123]. Mivel a fejlődési rendellenességek jelei gyakran 2-3 éves kor után

jelentkeznek, az anyai COVID és az utódok neurodevelopmentális rendellenességeinek nagyszabású humán vizsgálatából még kevés fellelhető. Erdogan és munkatársai egy friss vizsgálata kimutatta, hogy a SARS-CoV-2 tüskefehérjének kitett hím patkányoknál nagyobb arányban fordultak elő autizmus-szerű viselkedések, gliaaktiváció, neuronális sejthalál a hippocampusban és a kisagyban, valamint megváltozott MDA-, TNF- α -, IL-17-, NF- κ B-, laktát- és BDNF-szintek. Ezek az eredmények potenciális összefüggésre utalnak a COVID-19 tüskefehérjének való prenatális kitettség és a neurodevelopmentális zavarok között [124].

3.3.1.1.2 A Zika vírusfertőzés hatása az idegrendszeri fejlődésre

A ZIKV egy egyszálú RNS-vírus, amely a Flaviviridae családba tartozik, és sajátossága, hogy megzavarja a normális agyi fejlődést. A várandós anyák ZIKV-fertőzésének legismertebb következménye a magzat mikrocefáliája [125], amelyet a sejtreplicációban és az apoptózisban részt vevő gének károsodott expressziója okoz [126]. Az érintett esetekben a vírusgenom és az antitestek jelen vannak az újszülöttek cerebrospinális folyadékában [127], és hisztopatológiai elváltozásokat, többek között meszesedést, nekrozist, neuronofágiát, gliózist és gyulladásos infiltrátumokat figyeltek meg a halálos mikrocefália eseteiből származó agymintákban [128]. Állatmodellekben a ZIKV-vel kezelt anyák utódaiban az agykéregben a neuronális elrendeződés különbségeit és rendezetlen neuronális rétegződést [129], a hippocampus diszpláziáját, az alfa motoneuronok elvesztését, a kisagy fejlődési rendellenességeit és a felnőttkori neurogenesis károsodását figyelték meg [130]. Ezen agyi rendellenességek szorosan összefüggnek a neurodevelopmentális rendellenességekben észlelt elváltozásokkal [131], mint például a neuronális érés késése és az agyi kapcsolatok megváltozása, ami ok-okozati összefüggésre utal a prenatális Zika-fertőzés és az ASD [103, 132] vagy a skizofrénia [100] későbbi kialakulása között. Egy tanulmányban a P2X7 receptor expressziója megnövekedett a Zika vírussal fertőzött egerek agyában a kontrollcsoportéhoz képest [133]. A P2X7 fokozta a hippocampus károsodását a CA1/CA2 és CA3 régiókban, és összefüggésbe hozták a fokozott neurodegenerációval, neuroinflammációval és a motoros teljesítmény károsodásával a fertőzött egerekben. Érdekes módon a vad típusú egerek hatékonyabban kontrollálták a vírusterhelését a P2X7 receptorhiányos egerekhez képest [133]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ATP-P2X7 receptor jelátvitel hozzájárul a

neuronális veszteséghez, a neuroinflammációhoz és a kapcsolódó agyi rendellenességekhez, ugyanakkor részt vesz az antivirális válaszban a ZIKV-vel fertőzött egerek agyában.

3.3.1.2 Anyai bakteriális megbetegedések hatása

A magzati agy szerkezetében és működésében is hosszútávú elváltozásokat okozhatnak a terhesség alatti anyai bakteriális fertőzések [95, 99]. Előfordulásukat összefüggésbe hozták pszichés zavarokkal, különösen férfiaknál, illetve a fertőzés súlyosságával és kiterjedtségével arányos mértékben. A multiszisztémás bakteriális fertőzések hatásai majdnem kétszeresnek bizonyultak a kevésbé súlyos lokális bakteriális fertőzésekéhez képest [134]. A bakteriális fertőzéseket, különösképpen a tünetmentes húgyúti fertőzéseket, gyakran kezeletlenül hagyják a prenatális ellátás során, ami potenciális veszélyt jelent az egészséges magzati fejlődésre nézve. Állatkísérletek azt mutatják, hogy a prenatális lipopoliszacharid (LPS)-expozíció, amely a Gram-negatív bakteriális fertőzéseket célzott utánozni, autisztikus viselkedést indukál [135, 136]. Az LPS a TLR4 receptoron keresztül hat, ami egy dimerizált TLR4-ből és MD-2-ből álló receptor komplex kialakulásához vezet. Ez két jelátviteli útvonalat aktivál: egy MyD88/Mal-függő útvonalat, mely korai NF- κ B aktivációhoz vezet, és egy TRIF/TRAM-függő útvonalat, mely késői NF- κ B és IRF3 aktivációhoz vezet, amelyeken keresztül az inflammaszóma, a citokinek, a kemokinek és más transzkripciós faktorok indukálódnak [137].

Terhesség során az anyai húgyúti fertőzések előfordulása viszonylag magas a terhesség alatti immun-, hormonális, anatómiai és szokásbeli változásoknak köszönhetően. Az antibiotikummal kezeletlen fertőzések fokozott kockázatot jelentenek mentális retardáció vagy fejlődési késés kialakulására a csecsemőkben [138]. Az újszülöttkori szepszis a koraszülött és az időre született gyermekeknél egyaránt fokozott kockázatot jelent autizmus spektrum zavar kialakulására nézve [139]. A P2X7 aktivációja a vér-agy gát károsodásához, mikroglia sejtek aktiválódásához, neuronális apoptózishoz, gyulladásos sejtek toborzásához vezet az agyi érrendszerben és más káros folyamatokhoz, amelyek diffúz agykárosodáshoz vezethetnek a szervezet más részein fellépő másodlagos fertőzés következtében [140, 141]. Ugyanakkor a P2X7 receptor szükséges a szepszishoz társuló gyulladásos válasz kialakulásához az egész szervezetben [142]. Martínez-García és munkatársai kimutatták,

hogy a P2X7, az ismertebb hatásai mellett, szepszis során szerepet játszhat a mitokondriális diszfunkció kialakulásában is, ami károsodott NLRP3 és IL-1 β aktivációhoz vezet, mely részese lehet a szepszisben szenvedő betegek immunhiányos állapotának kialakulásában és az ezzel járó mortalitásban. A P2X7 gátlása protektívnek tűnik a szepszis patogenezisével [143, 144] és a velejáró szervi diszfunkcióval szemben [145-147]. A P2X7 receptor farmakológiai gátlása vagy genetikai delécioja csökkenti az IL-1 β termelését, csökkenti a neuroinflammációt és megakadályozza a kognitív károsodást a szepszist túlélő állatokban [148]. Meglepő módon azonban vannak olyan tanulmányok, amelyek a P2X7 védő szerepéről számolnak be a bakteriális terjedés csökkentésén keresztül, valamint a P2rx7^{-/-} egerek fokozott mortalitását írják le [149, 150]. Fialho és munkatársai felhívják a figyelmet a P2X7 lehetséges védő hatására az újszülöttkori szepszisben, és arra, hogy a purinerg receptorok terápiás célzása során tiszteletben kell tartani a P2X7 kórokozó-szabályozó jótékony hatásait a túlzott gyulladásos válaszreakciót kiváltó hatásai mellett [142]. A vonatkozó szakirodalmi adatokat figyelembe véve tehát megállapítható, hogy a P2X7 szepszisben betöltött szerepe, a P2X7 antagonisták gyulladáscsökkentő tulajdonsága és az újszülöttkori immunválaszok hipo-inflammatorikus jellege miatt a P2X7 potenciális célpont lehet az újszülöttkori szepszisben az antibiotikus terápia kiegészítéseként, feltéve, hogy a kórokozók eliminációját az antibiotikumos kezelés eredményeként megfelelően alátámasztják laboratóriumi vizsgálatok. Mivel az újszülöttkori szepszis túlélése számos neurokognitív károsodást okozhat, a P2X7 gátlás sikeres klinikai alkalmazása csökkentheti a neurodevelopmentális rendellenességek kialakulását az érintett gyermekeknél.

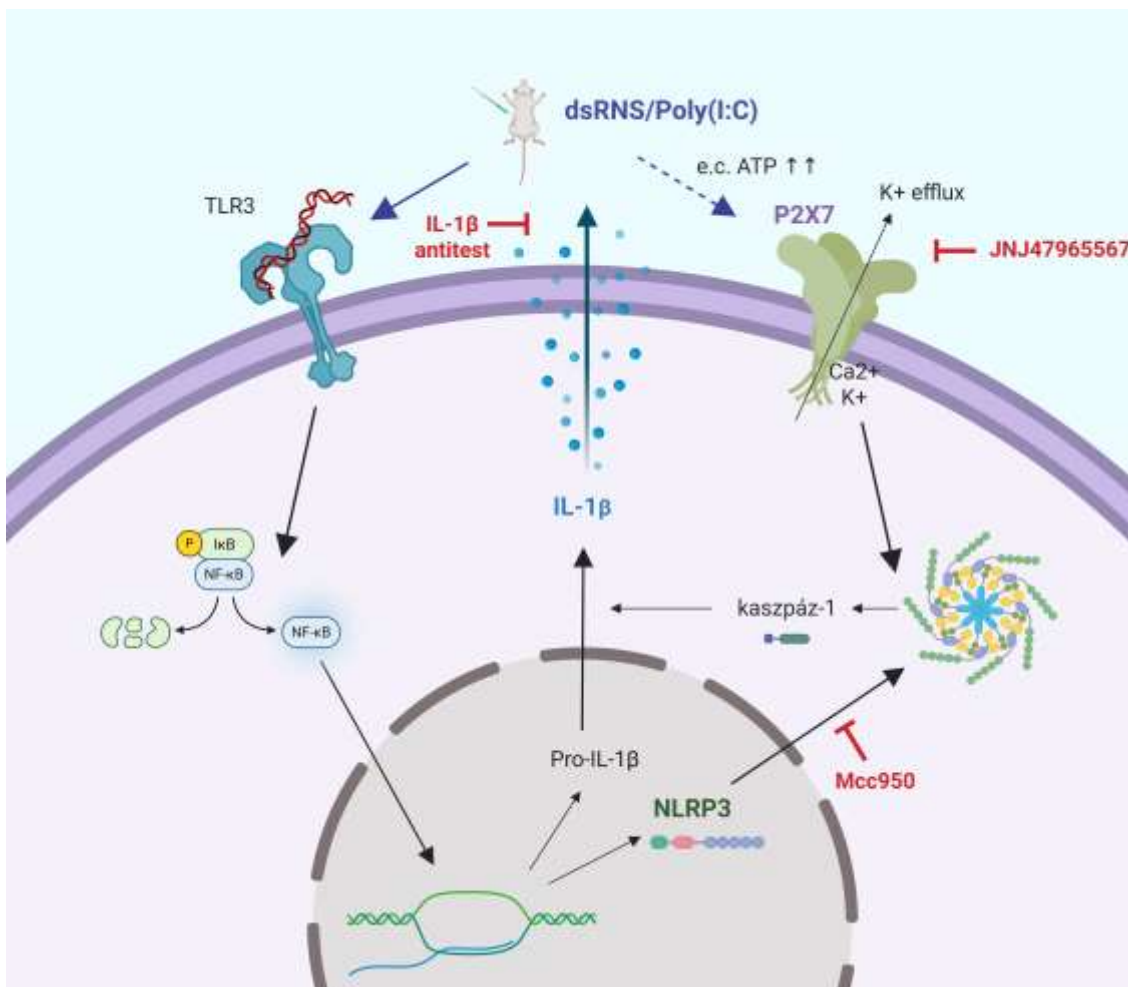
3.3.1.3 Prenatális Toxoplasma gondii fertőzés

A Toxoplasma gondii, mely az emberi spontán abortuszok egyik fő oka [151], elsősorban az agyat fertőzi meg, célpontjai a neuronok. A parazita megkerüli az immunválaszokat a tartós fertőzés érdekében [152]. A méhen belüli fertőzés magzati agyi károsodásokat és későbbi neuropszichiátriai rendellenességeket kockáztat [153, 154]. A fertőzött egerek neurális progenitor sejtjeiben a P2X7 expressziója megnő, megváltozott ektonukleotidáz aktivitás mellett, serkentve az ATP/ADP hidrolízist. Ez arra utal, hogy az extracelluláris ATP aktiválja a P2X7-et a mikrogliaikon, és a P2X7 receptorok ATP-általi folyamatos aktiválását a T.

gondii eliminációjának egyik fő mechanizmusaként határozták meg krónikus fertőzés során [155]. Moreira-Souza és Coutinho-Silva összefoglaló cikke leírja a purinerg jelátvitel szerepét a *T. gondii*-fertőzésben, kiemelve a nem-fagocita sejtekben a P2X7-aktiváció mikrobicid hatásának parazita- és fagocita-kontrollban betöltött szerepét bizonyító in vitro vizsgálatokat [156].

3.3.2 Fertőzések állatmodelljei (pl. poly(I:C), LPS)

A vírusfertőzés imitálására, az anyai immunaktiváció kiváltásához széles körben ismert és alkalmazott módszer a vemhes egerek és patkányok poly(I:C)-vel való kezelése. Ezek a preklinikai modellrendszerek segítenek a mögöttes patofiziológiai mechanizmusok molekuláris, sejtes és viselkedési szintű vizsgálatában. A poly(I:C) a vírus kétszálú RNS szintetikus analógja, és a TLR3 receptor agonistájaként működik. A TLR3 egy TRIF-függő választ generál azáltal, hogy a TRIF-et a citoplazmatikus doménhez toborozza, amely kölcsönhatásba lép a RIP1-gyel, a TRAF6-tal, a TBK1-gyel és a TRAF3-mal, ami a MAP kinázok és az IKK komplex aktiválódásához vezet [157]. Ezen folyamatok a továbbiakban az ERK, a JNK, az IRF3, a p38 és az NF- κ B aktiválódását okozzák. Az ERK, a JNK és a p38 nukleáris transzlokációja következik be, ami aktiválja az AP-1 transzkripciós faktort, ami további transzlokációkhoz (NF- κ B, IRF-3 és IRF-7) vezet a sejtmagba. Az AP-1 és az NF- κ B a citokin gének promoterjeihez kötődik, míg az IRF-3, az IRF-7 és az NF- κ B a kemokin gének promoterjeit célozza meg, indukálva azok transzkripcióját [157]. Az anyai citokinek és kemokinek ezután immunaktivációt indukálnak, ami szisztémás gyulladásához vezet. A fent leírt gyulladásos mechanizmusban központi szerepet betöltő P2X7 receptor farmakológiai gátlása, különösen szelektív antagonisták, mint a JNJ-47965567 alkalmazása, lehetőséget teremtett a neuroinflammáció és az ehhez társuló viselkedési eltérések célzott vizsgálatára állatmodellekben. Emellett a gyulladásos kaszkád további kulcspontjain alkalmazható NLRP3-gátló MCC950, valamint az IL-1 β -receptor antagonista célzott beavatkozási lehetőségeket nyújtanak. E farmakológiai eszközök révén modellezhető és befolyásolható a TLR–P2X7–NLRP3–IL-1 β útvonal működése, elősegítve a gyulladásos folyamatok és azok idegrendszeri következményeinek pontosabb megértését (3. ábra).



3. ábra A P2X7/NLRP3/IL-1 β jelátviteli útvonal aktiválódása anyai immunaktivációs (MIA) állatmodellekben, farmakológiai beavatkozási pontokkal. A TLR3 felismeri a kettős szálú RNS-t, például a Poly(I:C)-t, ami a gyulladásos citokin prekursorok és az NLRP3 komponensek NF- κ B-függő kifejeződéséhez vezet. A megnövekedett extracelluláris ATP ezután aktiválja a P2X7-et, ami az NLRP3 inflammaszóma kialakulásához vezet. Ez a komplex dimerizáció és önhasadás révén aktiválja a kaszpáz-1-et. Az aktív kaszpáz-1 proteolízis útján a pro-IL-1 β -t biológiailag aktív formájává alakítja, amely így készen áll az extracelluláris térbe való kibocsátásra. A gyulladásos kaszkád több pontján is lehetséges célzott farmakológiai beavatkozás: JNJ-47965567 (P2X7-antagonista), MCC950 (NLRP3-gátló), illetve IL-1 β receptor antitestek alkalmazásával, amelyek hozzájárulhatnak a mechanizmusok pontosabb megértéséhez és a neuroimmun folyamatok vizsgálatához állatmodellekben.

Egyes anyai kemokinek és citokinek közvetlenül hatnak a magzati agyra. Bizonyos esetekben pedig az anyai citokintermelő sejtek (pl. Th-sejtek) maguk is átjutnak a placentán, vagy olyan

effektorokat aktiválnak, amelyek a placentafunkció befolyásán keresztül közvetve befolyásolhatják a magzati fejlődést, vagy további mediátorok termelését indukálják, amelyek a magzatba szállítódnak, vagy közvetlenül a magzatban hatnak. Az anyai citokinek transzplacentáris jelátviteli útvonalak indukálásával akár fokozhatják a magzat saját citokintermelését is, ami hatással van a fejlődő agyra. A placentát követően a magzati vér-agy gát a második gát, mely már a terhesség 8. hetében működőképes és a teljesen kifejlett felnőtt agyban található vér-agy gátra jellemző gátló tulajdonságok nagy részét már mutatja [158].

A bakteriális fertőzések anyai immunaktivációs modelljére a lipopoliszacharid (LPS) expozíció terjedt el széles körben, amely a Gram-negatív baktériumok sejtfalának fő komponense [159]. Az LPS a TLR4 receptoron keresztül aktiválja az anyai immunválaszt, amelynek során proinflammatorikus citokinek – például IL-6, TNF- α és IL-1 β – szabadulnak fel [160]. E modellekben az anyai LPS-kezelés – különösen a terhesség középső szakaszában – viselkedési eltéréseket eredményezhet az utódokban, többek között csökkent szociális viselkedést és fokozott repetitív aktivitást, melyek az ASD-re jellemző fenotípusokhoz hasonlítanak [161]. Kimutatták, hogy az ilyen módon kezelt vemhes állatok utódainál megváltozik az interneuronok migrációja és oxidatív stressz alakul ki, anélkül, hogy közvetlen magzati immunválasz lenne jelen [162]. Az LPS-modellek kiegészítik a poly(I:C)-alapú rendszerek által feltárt mechanizmusokat azáltal, hogy lehetővé teszik a bakteriális gyulladás idegrendszeri következményeinek vizsgálatát, és hozzájárulnak a P2X7-receptor szerepének értelmezéséhez is az anyai immunaktiváció neurobiológiai hatásaiban.

3.3.3 Autoimmun állapotok és endogén gyulladás a terhesség során

Bizonyítékok alapján feltételezhető, hogy a gyulladásos környezetet terhesekben a külső ingerek mellett a belső mechanizmusok károsodása is kiválthatja, ami hasonló gyulladásos környezetet hoz létre, és olyan jelátviteli utakat indukál, amelyek idegrendszeri fejlődési rendellenesség kialakulásához vezethetnek [163]. Az autoimmunitás során specifikus adaptív immunválasz alakul ki a saját antigének ellen, és a kóros IgG-k átjuthatnak a placentán [164], ami potenciálisan magzati problémákat okozhat. Az anyai autoimmun betegségek összefüggésbe hozhatók a fejlődési rendellenességekkel [165, 166], és az anyai

autoantitestek növelik az ASD kockázatát [167, 168]. Az anyai hipotireózis a neuronális migráció befolyásolásán keresztül szintén összefüggésbe hozható az ASD-vel, különösen az első trimeszterben [169]. Még egy mérsékelt, átmeneti első trimeszteri anyai hypothyroxinémia, amely nem feltétlenül jár együtt TSH-emelkedéssel, megzavarja a neuronok kérgi rétegekbe történő migrációját a neurogenesis kezdetén patkánykísérletek alapján [170]. Autoimmun encephalitisben az immunrendszer az agy idegsejtjeit támadja meg, gyulladást okozva, amely autizmus-szerű idegrendszeri elváltozásokhoz vezet [171]. Rágcsálókban a vemhesség alatt beadott anyai autoantitestek a kérgi parenchimába vándoroltak, megzavarva a kéreg fejlődését és a neurogenesis, különösen a dendritnyúlványok kialakulását és a szinaptikus kapcsolatok fejlődését [172, 173], illetve fokozott repetitív viselkedésformákat és csökkent szociális interakciót eredményezett [174]. A P2X7-t az autoimmun encephalitisben is a központi idegrendszeri gyulladás korai súlyosbítójaként jellemezték [175], amely az autoimmunitást táplálja proinflammatorikus citokin-felszabadításon keresztül [176]. A P2X7-gátlók fázis II. klinikai vizsgálatokban szerepeltek egyes autoimmun betegségek kezelésében [177, 178], ezért fontos lenne tovább vizsgálni a P2X7 terhesség alatti autoimmunitásban betöltött szerepét és lehetséges külső modulációját ebben a kritikus időszakban.

3.4 A méhen belüli gyulladásos környezet, a neuroinflammáció és a neuropszichiátriai zavarok összefüggései

3.5 Prenatális gyulladás és viselkedéses eltérések (állatmodellek)

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az anyai gyulladás a korábban említett környezeti faktorokhoz kapcsolódó fejlődési rendellenességek fokozott kockázatának kulcsfontosságú közvetítője. Számos nemrég megjelent tanulmány széleskörben vizsgálja, hogy a terhesség alatti fokozott immunaktiváció hogyan kapcsolódik a neurológiai rendellenességekhez, állatkísérletek felhasználásával vizsgálva az agy fejlődésére gyakorolt hatásait. Az aktivált anyai immunitás megemeli az extracelluláris ATP-t a fejlődő idegi struktúrákban [179, 180]. Beamer és mtsai. megállapították, hogy a megnövekedett extracelluláris ATP a P2X7 receptorokon keresztül megváltoztatja az akciós potenciál küszöbértékét és a maximális tüzelési frekvenciát, ezáltal modulálva az újszülöttkori subplate neuronok aktivitását [68].

Az IL-1 receptor antagonista LPS-sel együttes adása enyhítette az LPS által kiváltott placentáris gyulladást és a magzati agykárosodást (az előagy fehérállományának és motoros viselkedéseknek elváltozása) az utódpatkányokban [181]. A prenatális poly(I:C) expozíció megemelte a P2X7/NLRP3/IL-1 β útvonal aktivitását nőstény fiatal korú patkányok nucleus accumbensében [182]. Mind az LPS, mind a poly(I:C) kezelés az NLRP3 és az IL-1 β expresszióját és aktiválódását indukálta az utódpatkányok agyában, amelyek skizofréniaszerű viselkedést mutattak [183]. Ezt a kapcsolatot erősíti Horváth és munkatársainak tanulmánya is, amely elsőként igazolta, hogy a P2X7 receptor aktivációja elengedhetetlen az anyai immunaktiváció autizmus-szerű fenotípusba való átfordításához, és hogy annak gátlása mind az anyában, mind az utódban képes enyhíteni a viselkedési és morfológiai eltéréseket [180]. A prenatális gyulladás és az idegrendszer kölcsönhatásai különösen markánsan jelenhetnek meg azokban a kórképekben, ahol a fejlődési folyamatok sérülése már korai életkorban meghatározza a viselkedés alakulását - ilyen állapot lehet például az autizmus spectrum zavar is. A következőkben ennek klinikai jellemzőit és hátterét ismertetjük.

3.6 Autizmus spektrum zavar általános jellemzői

Az autizmus spektrum zavar legfontosabb jellemzői a társas kommunikáció zavara és a beszűkült, ismétlődő elemek a viselkedésben, érdeklődésben és aktivitásban. A rendellenességek mintázata rendkívül sokféle és bonyolult.

3.6.1 ASD definíciója és tünettani jellemzői

Az autizmus spektrum zavar tünettana szerteágazó, spektrum-jellegéből adódóan a különböző tünetcsoportok eltérő erősségű tünetei kombinálódnak egyéni variációban, azonban három terület minden esetben érintett. Ezek a szociális interakciók zavara, a kommunikációs készségek elmaradása és a viselkedés, rugalmas gondolkodás eltérései. A 2013-ban bevezetett DSM 5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) az autisztikus triász tüneteit két kategóriába tömörítette két fő tünetcsoportot megjelölve. Ezek:

- a társas kommunikáció és szociális interakciók zavara és
- a korlátozott, ismétlődő viselkedésmintázatok, érdeklődés és tevékenységek.

A diagnózis felállításához a tüneteknek a korai fejlődési időszakban jelen kell lenniük és a tünetek klinikailag jelentős károsodást kell okozzanak a jelenlegi funkcionalitásnak megfelelő helyen (foglalkozás, tanulás, szociális területek), illetve ezeket a zavarokat értelmi fogyatékos, vagy globális fejlődési késés kizárható legyen [184]. Értelmi fogyatékos gyakran együtt fordul elő autizmus spektrum zavarral. Ahhoz, hogy az ASD és értelmi fogyatékos komorbid diagnózisa megállapításra kerüljön, a szociális kommunikáció a várható fejlettségi szintnél alacsonyabb szinten kell legyen. Az ASD nem mindig manifesztálódik a korai időszakban, amennyiben nincsenek meg a megfelelő szociális elvárások, vagy a későbbi életkorban a tanult stratégiák a tüneteket elfedik. Az első tünetcsoporthoz, a kommunikáció zavarához tartozik a szociális és érzelmi kölcsönösség zavara (mint például a rendellenes szociális közeledés a többiek felé, az oda- vissza kommunikáció zavartsága, az érzelmek és érdeklődés megosztásának hiánya és a szociális interakciókra való adekvát reakcióknak hiánya). Ilyen tünetek már csecsemőkorban felfedezhetőek, mint például a másik arc figyelésének hiánya, a ritka mosoly. Később hiányzik az öröm megosztása, a tárgyak megmutatása, gyakori a kortársaktól való elhúzódás, közös tevékenységbe nehéz bevonhatóság. Problémák megoldására kívülálló keresésének hiánya, segítségnyújtás hiánya, más nehézségeire látszólagos közömbösség, többi ember érzései érzékelésének látszólagos hiánya. Szintén a kommunikáció zavarához tartoznak a nonverbális kommunikációs minták zavara, vagy rendellenessége (mint a rosszul integrált verbális és nonverbális kommunikáció, a szemkontaktus és a testbeszéd zavara, a gesztusok megértésének és kifejezésének zavara, egészen az arckifejezések és a nonverbális kommunikáció teljes hiányáig). Jellemző a szemkontaktus kerülése, vagy inadekvát felvétele. Gyakran a gesztusok, hangadás, szemkontaktus nem megfelelően összehangolt, szokatlan ritmussal, hangszínnel, hangerővel járhat. Enyhe formában neologizmusok, túlzottan pedáns beszéd, saját érdeklődés szerinti monológok, szociális csevegés hiánya fordulhat elő. Mások non-verbális jelzéseinek félreértése. Első tünetcsoport része továbbá a kapcsolatok fejlesztésének, fenntartásának és megértésének zavara (például a különböző szociális kontextusoknak nem adekvát viselkedés, nehézségek a szerepjátékokban, barátságok kialakításában, és a társak iránti érdeklődés hiánya). Zárkózott jellem a védekezés a világ kaotikusságával szemben, szociális elvárásoknak való megfelelés nehézsége jellemző.

Előfordulhat túlzott nyitottság is a kapcsolatteremtés eszközeinek nem megfelelő használata. Az ASD érintetteket eltérő ingerfeldolgozás jellemzi, melynek köszönhetően válaszaik, viselkedésük eltérő. A DSM 5 szerinti második fő tünetcsoporthoz tartozik az alábbiak közül legalább kettő: –Sztereotíp, repetitív motoros tevékenységek. Kisgyermekkorban sokszor jellegzetes a kézzel repdesés, indok nélküli nevetés, sírás, hangoskodás. –Ragaszkodás a megszokotthoz és a verbális és nonverbális rituálékhoz, valamint rugalmatlanság a rutintól való eltérésben (például szorongás és feszültség a megszokottól való eltérés esetén, változásokkal szembeni megküzdési nehézségek, merev gondolkodási minták, napi rutintól, étkezési időpontoktól való eltérés képtelensége). A játékok jellemzően különböznek a társakétól. A rutin és a kiszámíthatóság biztonságérzetet nyújt az ASD érintett egyének számára. Értelmetlen, rituális viselkedésmintázatokhoz való ragaszkodás gyakran figyelhető meg. – Korlátozott, fix érdeklődési körök, amelyek intenzitása és fókusza abnormális szinteken mozog. A beérkező ingerek apró részingerekké esnek szét. Előfordul a zajok figyelmen kívül hagyása, de azok iránti fokozott érzékenység is, ami szokatlan viselkedéseket magyarázhat. Mindehhez gyakran erős vizuális memória társul, ritkán kiemelkedő képességekkel (pl.: telefonkönyv, menetrend megjegyzése). – Hyper-, vagy hypoaktivitás az érzékelésben, vagy szokatlan érdeklődés a környezet bizonyos érzékszervi vonatkozásai iránt (például közömbösség a fájdalomra, hőmérsékletre, rendellenes, vagy fokozott érzékenység a hangok, szaglás és tapintási ingerek iránt, tárgyak gyakori szagolgatása, tapintása, vagy a vizuális és fényingerek iránt mutatott fokozott figyelem). Szinte minden érintettnél jelentkezik a fokozott szorongás, főleg különböző szociális helyzetekben, tömegben, zajos helyeken. Egyéb viselkedészavarokkal is gyakran társul a kórállapot, ezek lehetnek táplálkozási zavarok, alvászavar, fokozott agresszivitás, dührohamok, önsértő magatartás, depresszió (CDC, Autism Spectrum Disorder (ASD) - Signs and Symptoms), [185-187]. A DSM 5 három súlyossági szintet különít el mind a szociális viselkedés terén, mind az ismétlődő viselkedésmintázatok terén: (Nagyon jelentős támogatást igényel / Jelentős támogatást igényel / Támogatást igényel). Továbbá külön specifikálja az értelmi zavarral és anélkül, illetve nyelvi zavarral és anélkül előforduló eseteket, valamint a meghatározott genetikai, vagy környezeti kiváltó tényezőkhöz köthető megbetegedéseket. Emellett külön pontba foglalja a katatóniával járó megbetegedéseknél

előforduló komorbid ASD-t. A DSM 5 által megjelölt ASD csoportba több, korábban (a DSM IV szerint) önálló kategória tartozik bele: a gyermekkori autizmus, az Asperger-szindróma, a Rett-szindróma, a gyermekkori dezintegrációs zavar, és az egyéb pervazív fejlődési zavar. A DSM-5 az első tünetcsoportba tartozó és a második tünetcsoportból tüneteket nem mutató egyéneknek egy új kategóriát is alkotott, amelyet szociális kommunikációs zavarnak (SCD) nevez, s amelybe azok a személyek tartoznak, akiknek verbális és nonverbális kommunikációs nehézségeik vannak, de az autizmus egyéb jellemzői nem találhatók meg náluk [184, 188].

3.6.2 Az ASD prevalenciája és etiológiai tényezői

A CDC Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network becslései szerint 36 gyermekből egynél állapítanak meg autizmus spektrumzavart (ASD) [189]. Fiúkban előfordulása négyszer gyakoribb [189]. Az ASD a jelentések szerint minden faji, etnikai és társadalmi-gazdasági csoportban előfordul [190]. Az európai vizsgálatok eredményei az évek során a diagnosztikai kritériumok eltérései miatt változóak, 4,76-31,3/1000fő között mozog a prevalencia a 7-9 évesek között egy átfogó európai vizsgálat szerint [191, 192]. Az autizmus spektrum zavar etiológiája multifaktoriális, amelyben genetikai és nem genetikai tényezők egyaránt szerepet játszanak. Jellemzői, hogy az összesített populációs gyakoriságuk viszonylag magas, családi halmozódást mutatnak, a betegségek változó súlyosságúak családon belül is, és nem hat rá szelekciós tényező. Valamely szindrómához köthető ASD gyakran kromoszóma-rendellenességekhez vagy monogén elváltozásokhoz társul, ilyen például a Rett-szindróma, a fragilis X-szindróma és a MECP2-duplikáció szindróma. A nem szindrómákhoz társuló ASD etiológiája még mindig viszonylag ismeretlen a genetikai heterogenitás miatt. A de novo mutációk és a pre- és posztnatális környezeti tényezők együttműködése játszik szerepet [192]. Ikerkutatások során azt találták, hogy egypetjűeknél egy gyerek betegsége esetén 36-95%-ban érintett a másik gyerek is. Ez az arány kétpetjűeknél 0-31% [193-195], míg testvérek esetében 2-18% [196, 197]. Az ASD előfordulásával 10%-ban jár együtt Down-szindróma, Fragilis X-szindróma, sclerosis tuberosa, vagy egyéb genetikai, illetve kromoszómális eltérés, ami jelentősen meghaladja az ASD-ben nem szenvedő populációban való előfordulását [198, 199]. ASD

gyermekekben 10%-ban jár együtt egyéb pszichiátriai megbetegedéssel. Az ASD-val együtt járó depresszió, szorongásos kórképek sokszor az ASD dekompenzációjának tekinthetők, míg valós gyakori komorbiditás az ADHD, epilepszia, értelmi fogyatékoság [200]. Kutatások azt mutatják, hogy ASD-ben érintett egyének között több átlag feletti IQ-val rendelkező és kevesebb átlag alatti IQ-val rendelkező egyén található [201]. A viselkedési és idegrendszeri jellemzők sokfélesége mellett egyre több adat támasztja alá, hogy az autizmus spektrumzavar hátterében többféle immunológiai komponensek is szerepet játszanak. Ennek egyik legfontosabb bizonyítéka a különböző gyulladásos biomarkerek jelenléte ASD-ben.

3.7 Humán bizonyítékok IL-1 β , P2X7 expresszióról ASD-ben

In vitro vizsgálatok magasabb alapszintű és LPS-indukált kaspáz-1, NLRP3 és szekretált IL-1 β szintet mutattak ASD-s egyének PBMC-jeiben [202] (Szabo et al., 2024). Az NLRP3 gátlása MCC950-el blokkolta mind az NLRP3 által közvetített, mind az alapszintű IL-1 β termelést és csökkentette a kaspáz-1 aktivitást PBMC sejtkultúrákban [202]. A posztnatális humán vizsgálatok azt mutatják, hogy az ASD-ben szenvedő gyermekek és felnőttek plazmájában megnövekedett az IL-1 β szint [203]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az emelkedett IL-1 β expresszió az agyban a tartós gyulladás hosszú távú terméke lehet. Bár az eredmények ígéretesek, a hosszú távú összefüggések tisztázásához azonban még kevés adat áll rendelkezésre.

3.8 A P2X7/NLRP3/IL-1 β útvonal központi szerepe a zavarok kialakulásában

Egy humán tanulmányban röviddel a koraszülést követően a keringésben lévő emelkedett IL-1 β összefüggött az idegrendszeri fejlődési zavarok fokozott kockázatával 24 hónapos korban [204]. A terminusra született/terminus közeli újszülötteknél az élet első napjaiban megemelkedett szisztémás és cerebrospinalis IL-1 β -t összefüggésben találták az agyi anyagcsere károsodásával és 30 hónapos korban jelentkező fejlődési késéssel [205, 206]. Kelly és munkatársai javasolják az interleukin-1 receptor antagonisták klinikai felhasználását a perinatális gyulladás és az idegrendszeri fejlődési zavarok szempontjából leginkább veszélyeztetett csecsemők esetében [207]. Bár a P2X7/NLRP3/IL-1 β útvonal

aktiválódásának pontos mechanizmusai a kóros agyfejlődésben továbbra is tisztázatlanok, néhány morfológiai különbséget leírtak. Kóros körülmények között a P2X7 aktiválása a poly(I:C) egérmodellel végzett ex vivo vizsgálat alapján a dendritmorfológia rendellenességeit és a dendritikus kinövés hiányosságait is okozta, valamint a poly(I:C) kezelés viselkedési rendellenességeket eredményezett a fiatal utódokon [69]. Fetsko és munkatársai kimutatták, hogy az IL-1 β KIR-specifikus expressziója a neurovaszkuláris fejlődés során az agyi endotélsejtekben a Wnt/ β -katenin jelátviteli úton keresztül károsan befolyásolja a vér-agy gát fejlődését, ami a KIR angiogenezis és a gátfunkció jelentős csökkenéséhez vezet [58]. A P2X7/NLRP3/IL-1 β útvonal jelentőségét az anyai immunaktiváció által kiváltott neurofejlődési zavarokban munkacsoportunk korábbi vizsgálata is megerősítette, amely elsőként igazolta, hogy a P2X7 receptor aktiválása szükséges és elégséges az autizmus-szerű viselkedéses és morfológiai eltérések kialakulásához a poly(I:C)-alapú MIA egérmodellben [180]. A jelen disszertációban bemutatott kísérletsorozat ezen eredményekre épül, és célja a P2X7-hez kapcsolódó downstream jelátviteli utak – különösen az NLRP3 és az IL-1 β – időbeli dinamikájának vizsgálata, valamint a posztnatálisan alkalmazott P2X7-antagonista kezelés hatásainak elemzése volt, potenciális terápiás lehetőségek azonosítása céljából.

Mindezek alapján felmerül az a kérdés is, hogy a P2X7 receptor szerepe más, nem fejlődési eredetű, de szintén gyulladásos eredetű idegrendszeri eltérésekben is kimutatható-e. A disszertáció korábbi fejezeteiben bemutatott kísérletes és elméleti háttér alapján egyre erőteljesebben körvonalazódik a P2X7 receptor központi szerepe az idegrendszeri immunaktiváció és a hosszú távú neuropszichiátriai eltérések kialakulása között. Ehhez kapcsolódóan az elmúlt években egy másik kóros gyulladásos állapot, a SARS-CoV-2 fertőzést követő szindróma (PASC) állatmodelljén is vizsgálatokat végeztünk, amelyben szintén a P2X7 receptor szerepét tártuk fel a poszt-akut idegrendszeri eltérések kialakulásában. Bár ez a modell nem az idegrendszeri fejlődéshez, hanem felnőttkori gyulladásos állapothoz kapcsolódik, a P2X7 receptor szerepének vizsgálata olyan mechanizmusokra is rávilágíthat, amelyek más, gyulladásos eredetű neuropszichiátriai eltérések hátterében is relevánsak lehetnek. A következő alfejezetek ezen kapcsolódási

pontokat és a P2X7-receptor gyulladásos közvetítő szerepét ismertetik a SARS-CoV-2 fertőzést követő idegrendszeri eltérések elméleti hátterén keresztül.

3.9 A P2X7 receptor szerepe neuroinflammáció közvetítésében és hosszú távú idegrendszeri eltérések kialakulásában posztakut COVID-19 szindrómában (PASC)

Miközben kutatásaink az anyai immunaktiváció és az autizmus spektrumzavar összefüggéseit vizsgálták a P2X7 receptor közvetítésével, a COVID-19 világjárvány idején lehetőség nyílt a purinerg jelátviteli útvonal szerepének feltérképezésére egy másik neuroinflammatorikus állapotban is. Ez az új kutatási irány nemcsak az aktuális közegészségügyi kihívásokra reflektált, hanem egyben újabb lehetőséget kínált a P2X7 receptor általános patofiziológiai szerepének jobb megértésére a központi idegrendszeri gyulladás és a hosszú távú neuropszichiátriai eltérések összefüggésében.

Az utóbbi években világossá vált, hogy a SARS-CoV-2 fertőzést követően számos betegnél alakulnak ki hosszabb távú neurológiai és pszichiátriai tünetek, amit az irodalom post-acute COVID-19 syndrome (PASC) vagy long COVID néven említ [208]. Ezen tünetek közé tartozik a kognitív romlás, szorongás, depresszió, fáradékonyság és alvászavarok is [209] [210]. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy e klinikai tünetek hátterében elhúzódó neuroinflammáció áll, amely különösen az agy frontális és limbikus területeit érinti [211].

3.9.1 A P2X7-mediált gyulladás szerepe a PASC kialakulásában

A SARS-CoV-2 fertőzést követő neuropszichiátriai szövődmények, mint a szorongás, kognitív hanyatlás vagy hangulatzavarok, hátterében az egyensúlyából kibillent gyulladásos válasz, különösen a purinerg P2X7 receptor aktivációja állhat. A P2X7 aktivációja általában magas extracelluláris ATP-szint mellett történik meg, amely jellemző lehet vírusfertőzések utáni gyulladásos környezetre. Állatkísérletes modellekben, köztük az MA10 egértörzzsel végzett fertőzésekkel kimutatták, hogy a fertőzést követően tartós mikrogliális aktiváció és IL-1 β túlszabályozás alakul ki a központi idegrendszerben [212]. A hippocampus, amygdala és prefrontális kéreg régióiban mérhető fokozott P2X7 és inflammaszóma-aktiváció tartós neuroinflammációs környezetet hoz létre [213, 214]. Ezek a mechanizmusok nemcsak strukturális, hanem funkcionális károsodásokhoz is vezethetnek.

3.9.2 A P2X7-receptor közvetítő szerepe a gyulladás és a neuropszichiátriai tünetek között

Preklinikai modellekben a P2X7 receptor aktivációja után szorongásos és depresszív viselkedésformák jelentkeztek, melyeket a gyulladásos mediátorok, mint az IL-1 β , TNF- α és IL-6 megnövekedett szintje kísér [215, 216]. A receptor jelenléte az agyi mikroglia sejteken lehetővé teszi a gyulladásos válasz gyors felerősödését, ami a viselkedéses változások egyik alapja lehet. Egyes egereken végzett vizsgálatok szerint a SARS-CoV-2 S1 fehérje a mikrogliaokban közvetlenül aktiválja az NLRP3 inflammaszómát, amely fokozott IL-1 β termeléshez, neuroinflammációhoz, hippocampalis sejtpusztuláshoz, memóriaromláshoz és szorongásszerű viselkedéshez vezethet, mely hatások az NLRP3 genetikai, vagy farmakológiai gátlásával mérsékelhetőek [213, 214]. A megemelkedett szolubilis P2X7 (sP2X7) szintet humán COVID-19 betegek plazmájában is kimutatták, ami a betegség súlyosságával korrelált [109, 110].

3.9.3 A P2X7 receptor mint potenciális terápiás célpont gyulladásos eredetű idegrendszeri eltérésekben

A P2X7 receptor a neuroinflammatorikus folyamatok egyik kulcsszabályozójaként egyre nagyobb figyelmet kap különböző pszichiátriai és neurodevelopmentális kórképek lehetséges célpontjaként. A fentebb említett állatkísérletes eredmények és humán biomarker adatok egyaránt alátámasztják, hogy a P2X7 receptor gátlása ígéretes stratégiát jelenthet PASC-hoz kapcsolódó neuropszichiátriai tünetek mérséklésére. A JNJ-47965567 egy nagy affinitású, centrálisan ható P2X7-antagonista, amely lehetővé teszi a központi idegrendszeri immunválasz szelektív modulálását. Farmakológiai tulajdonságai révén ígéretes eszközt jelent a P2X7-gátlás terápiás jelentőségének vizsgálatára, különösen olyan állapotokban, ahol a gyulladás szerepet játszik a viselkedéses és kognitív eltérések kialakulásában.

4 CÉLKITŰZÉSEK

A purinerg P2X7 receptor egy gyulladásos jelátvivő, amely aktivációja során kulcsszerepet tölt be a gyulladásos citokin-válasz közvetítésében, a sejtközi kommunikáció szabályozásában, valamint az ATP- és kalcium-homeosztázis dinamikájának alakításában. Kóros aktivációja feltételezhetően tartós, önfenntartó neuroinflammációs folyamatokat indíthat el az idegrendszerben. Ez a jelenség különösen releváns lehet olyan kórképek esetében, ahol elhúzódó immunaktiváció figyelhető meg, így az autizmus spektrumzavar (ASD) és más neurofejlődési rendellenességek patogenezisében is. A receptor aktivációjához kapcsolódó mechanizmusok — úgymint a mikroglia sejtek fokozott citokin-termelése, az extracelluláris ATP közvetítette sejtközi kommunikáció, valamint a neuron-glia interakciók zavara — ígéretes kutatási célponttá teszik a P2X7-et. E mechanizmusok vizsgálata – amely dolgozatom fő fókuszát képezi – elsősorban az autizmus spektrum zavar patomechanizmusának mélyebb megértését szolgálja, ugyanakkor relevanciával bír más, például poszt-infekciós eredetű neuropszichiátriai eltérések szempontjából is. Ezek közül – a pandémia idején való aktualitásuk okán – külön is foglalkozom a SARS-CoV-2 fertőzést követő idegrendszeri következményekkel.

A disszertáció célkitűzései a következők:

- **Az NLRP3 inflammaszóma és az IL-1 β gyulladásos mediátor szerepének feltárása az ASD-szerű fenotípus kialakulásában anyai immunaktivációs (MIA) modellben:** farmakológiai (MCC950, IL-1 β antitest) és genetikai (IL-1 α/β KO) módszerekkel elemeztük ezen gyulladásos útvonalaknak a szerepét az anyai immunaktiváció következményeiben.
- **Az anyai immunaktivációt követő időfüggő citokinprofil meghatározása:** célunk volt az anyai vérplazmában és a magzati agyban jelentkező gyulladásos citokinválaszok időbeli alakulásának jellemzése.
- **A P2X7 receptor központi jelentőségének igazolása az anyai immunaktivációs modellben:** célunk volt annak meghatározása, hogy a genetikai delécia (P2rx7^{-/-}

egerek) vagy a szelektív farmakológiai gátlás (JNJ 47965567) képes-e megelőzni a MIA által kiváltott viselkedési és idegrendszeri elváltozásokat.

- **A P2X7 gátlás posztnatális alkalmazhatóságának vizsgálata:** célul tűztük ki annak meghatározását, hogy az utódok ismételt posztnatális kezelése P2X7-antagonistával képes-e reverzibilis hatást gyakorolni a kialakult neuropszichiátriai eltérésekre.
- **Új poszt-COVID modell felállítása és a P2X7 szerepének vizsgálata:** kutatásainkat kiterjesztettük egy posztakut SARS-CoV-2 (PASC) egérmodellre, amelyben a P2X7 receptor expressziójának regionális változásait és a fertőzést követő neuroinflammációs válaszokat térképeztük fel.
- **A P2X7 gátlás hatásának vizsgálata posztakut SARS-CoV-2 fertőzés esetén:** célunk volt feltárni, hogy a P2X7 receptor szelektív gátlása képes-e enyhíteni a fertőzést követően megfigyelt viselkedési és molekuláris eltéréseket.
- **A P2X7 receptor mint terápiás célpont preklinikai értékelése:** célul tűztük ki a P2X7 gátlás alkalmazhatóságának preklinikai bizonyítását gyulladásos eredetű neuropszichiátriai zavarokban, különös tekintettel az ASD- és PASC-modellek alapján megítélhető transzlációs potenciálra.

5 MÓDSZERTAN

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

5.1.1 Kísérleti állatok

Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között, 12 órás fény-sötét ciklusban, páratartalom ($60 \pm 10\%$) és hőmérséklet ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) szabályozott helyiségekben tartottuk, ad libitum biztosított táplálékkal (tenyésztési táp, V1124-000, Sniff Spezialdiäten GmbH) és vízzel. Az állatok szenvedésének minimalizálását szem előtt tartottuk és mindent megtettünk a felhasznált állatok számának csökkentése érdekében. A Kísérleti Orvostudományi Intézet helyi állatgondozási bizottsága minden kísérleti eljárást jóváhagyott (engedélyszám: PEI/001/778-6/2015). Az állatok tenyésztése az KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegében, SPF (specified pathogen free/ meghatározott fertőző betegségektől mentes) higiéniai szintű körülmények között történt. A kísérleteket kezelt és teszt-naiv vad típusú $\text{P2rx7}^{+/+}$ és $\text{P2rx7}^{-/-}$ egereken és $\text{IL-1}\alpha\beta^{-/-}$ egereken végeztük [217]. A $\text{P2rx7}^{-/-}$ and $\text{IL-1}\beta^{-/-}$ állatokat homológ rekombinációval hozták létre. A $\text{P2rx7}^{-/-}$ egerek eredeti tenyészpárjait Christopher Gabel a Pfizer, Inc.-től (Groton CT, USA) kaptuk. A targetáló konstrukciót patkányokból izolált teljes RNS felhasználásával, RT-PCR segítségével állították elő. A primerek szekvenciái a következők voltak: P2X7-F1 (5'-CGGCGTGCGCGTTTTGACATCCT-3') és P2X7-R2 (5'-AGGGCCCTGCGGTTCTCTC-3') [218]. A $\text{P2rx7}^{+/+}$ és $\text{P2rx7}^{-/-}$ állatok farkából genomi DNS-t izoláltunk, és a genotípusokat PCR-elemzéssel igazoltuk. A kísérleteinkben használt $\text{P2rx7}^{-/-}$ egérkolóniához összesen kilenc visszakeresztetést végeztünk C57BL/6-ra. Az $\text{IL-1}\alpha\beta$ kettős knockout egerek tenyészpárjai a *University of Tokyo Institute of Medical Science* tenyészállat-központjából származnak. Az $\text{IL-1}\alpha$ targetáló konstrukciót úgy hozták létre, hogy az 5. exonban és az 5. intronban lévő *Sau3AI* és *KpnI* helyek közötti 1,5 kbyte-os DNS-fragmentumot *lacZ-pA-PGK-hph-pA* kazettával helyettesítették. A 3. és 5. exonban lévő *HincII* és *BstXI* helyek közötti 2,45 kbyte-os DNS-fragmentumot törölték és *lacZ-pA-PGK-neo-pA* kazettával helyettesítették az $\text{IL-1}\beta$ célvektor létrehozásához. Az $\text{IL-1}\alpha/\beta$ kettős-KO egereket az embrionális őssejtben végzett egymást követő homológ rekombinációkkal állították elő. Minden kísérletsorozatban 40-60 felnőtt, 10-14 hetes nőstény és hím (25-30 g súlyú), azonos korú és genotípusú egyedet párosítottunk 2 vagy 3 véletlenszerűen kijelölt

csoportokban, a további kezeléstől függetlenül. A párosítás hetente egyszer történt, hogy az embriófejlődés napjait követni lehessen. A nőtényeket 6-10 fős csoportokban tartottuk, amíg vemhességük be nem bizonyosodott, míg a hímeket a tenyésztés során egyesével tartottuk. Az pároztatást követően naponta megfigyeltük a nőtény állatokat és a E12,5. terhességi napon a has mérete és alakja alapján 1-2 fős csoportokba különválasztottuk és kezeltük a vemhes állatokat. A vemhes nőtényeket meghatározott kísérleti csoportokba randomizáltuk. A megtermékenyítettség a poly(I:C) kezelés után körülbelül 60%-ra, a sóoldatos kezelés után 80%-ra csökkent. Ezek a spontán vetélési arányok hasonlóak voltak a más csoportok által a MIA-modellt használó csoportok által jelentett arányokhoz [219]. Csak a hím utódokat vizsgáltuk tovább, mivel az azonos alomból származó nőtény utódok többnyire rezisztensnek tűntek a MIA hatásaival szemben [180, 220]. Korábbi tapasztalataink alapján egy vemhes anyaállat átlagosan 5 hímnek ad életet, ezért a tenyésztési folyamat előtt a korábbi tanulmányunkban [180] leírtak szerint számoltuk ki az ideális elemszámot. A kísérleti állatokat a tenyésztőhelyről a tervezett viselkedési tesztek előtt egy héttel szállítottuk át a viselkedésvizsgálati egységbe. A csoportokon belüli elemszám eltérést mutatott a kezelt állatok körében előforduló nagy szórású spontán vetélések, anyai és újszülöttkori elhalálozások miatt.

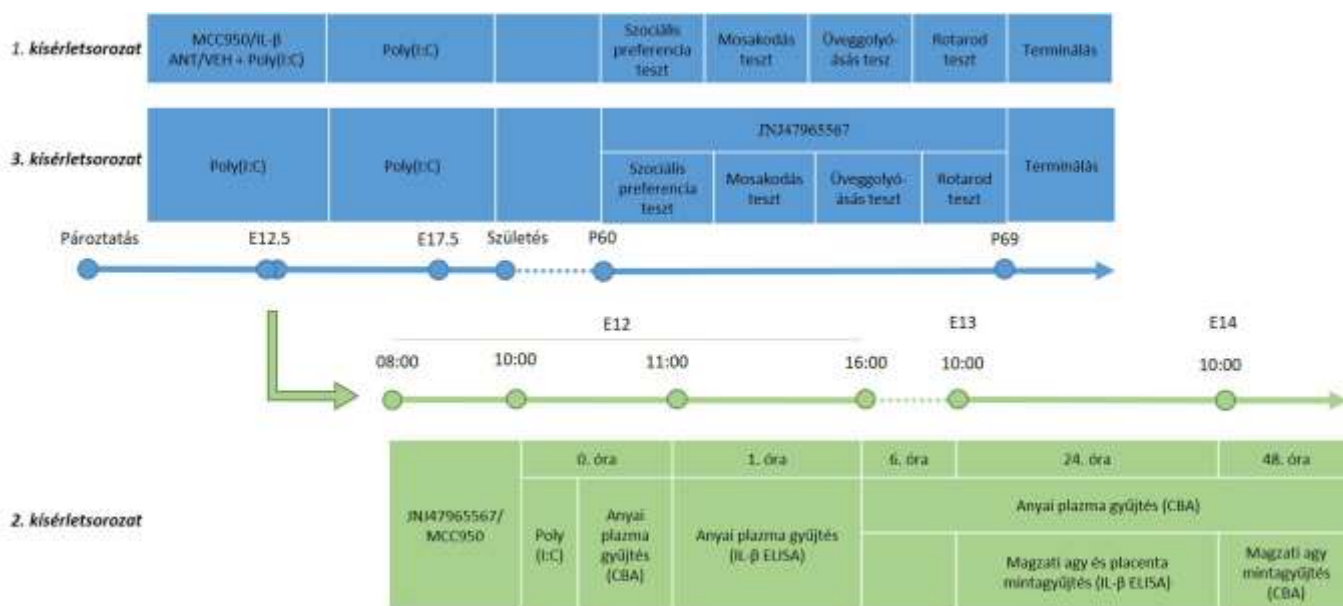
5.1.2 Kezelések

A MIA kiváltására a vemhes anyákat 3 mg/kg dózisú poly(I:C)-vel (Sigma-Aldrich, P9582, LOT#118M4035V, LOT#12190304) intraperitoneális injekcióval kezeltük az E12.5 napon és 1.5 mg/kg dózissal az E17.5 napon, vagy azonos mennyiségű fiziológiás sóoldattal kezeltük korábbi metodikánknak megfelelően [180] (4. ábra). Az NLRP3 inflammaszóma gátlás céljából a MIA kiváltása előtt vemhes anyaállatokat 50 mg/kg NLRP3-szelektív antagonistával, MCC950-nel (CRID3 nátriumsó, Tocris Bioscience, LOT#5479) intraperitoneálisan előkezeltük az E12.5 napon, kétórával a poly(I:C) injektálást megelőzően. Hasonló módon az IL-1 β aktiváció gátlásának céljából egyes vemhes egereket 25 μ g/kg kecske anti-egér IL-1 β /IL-1F2 antigén affinitású tisztított poliklonális IgG ellenanyaggal kezeltünk elő (R&D Systems, AF-401-NA). A kontrollállatok azonos térfogatú (100 μ l) sóoldatot kaptak ugyanabban az időpontban.

Az MCC950 az NLRP3 inflammaszóma specifikus inhibitora, amely közvetlenül kötődik a NACHT domén Walker B motívumához, ezáltal stabilizálja az NLRP3 fehérjét egy inaktív konformációban. A gyártói adatok alapján szelektív módon hat az NLRP3-ra, miközben nem befolyásolja az NLRC4 inflammaszóma vagy a TLR receptorok jelátviteli útvonalait. A kontroll állatokat az MCC950 kezeléssel egyidőben, egyenértékű vivőanyaggal (sulfobutylether-7 β -cyclodextrin, Sigma-Aldrich) kezeltük. A P2X7-hatás gátlására JNJ47965567 anyagot használtunk (30 mg/kg, Tocris Bioscience), melyet szintén két órával a MIA indukció előtt alkalmaztunk egereken, míg a kontrollcsoportok egyenértékű mennyiségű oldószer anyagot kaptak (30% captizol-oldat).

5.1.3 Kísérleti elrendezés

Az 1. és a 3. kísérletben 8-10 hetes hím utódokon viselkedésteszteket végeztünk a következő sorrendben: szociális preferencia teszt, mosakodás teszt, golyó-ásás teszt, rotarod teszt (4. ábra). Ezután az állatokat termináltuk és mintákat gyűjtöttünk a morfológiai elemzésekhez. A 2. kísérletben vemhes egerek farokvénájából vettünk vérmintákat az E12 napon 0, illetve egyes kísérletekben 1, 6 és 24 órával a poly(I:C) injekció beadását követően. A 24., vagy 48. órában az egereket folyamatosan adagolt izofluránnal altattuk, míg anyai plazma, magzati agy és placenta mintákat gyűjtöttük ELISA, vagy CBA elemzésekhez, majd az anyákat cervikális diszlokációval termináltuk. A viselkedéstesztekhez használt, állatokkal érintkező eszközöket és arénákat minden egyes tesztállat után 20%-os alkohollal, majd vízzel tisztítottuk meg a szagok csökkentése érdekében.



4. ábra A vizsgálatok kísérleti felépítése, a kísérletek és a kezelések idővonala. Az 1. és 3. kísérletben az ASD-vel kapcsolatos viselkedésmintákat vizsgáltuk anyai poly(I:C) kezelés hatására. Az intraperitoneális kezeléseket két dózisban végeztük az E12,5 és az E17,5 napokon. Az 1. kísérletben anyai előkezelést (MCC950), a 3. kísérletben pedig ismételt utódkezelést (JNJ47965567) alkalmaztunk. A 2. kísérletben anyai és magzati szöveteket gyűjtöttünk egyszeri poly(I:C) és előzetes anyai előkezelést (MCC950/JNJ47965567) követően.

5.1.4 Viselkedésteszt

5.1.4.1 Szociális preferencia teszt

Naviaux [221] módszertanát alkalmaztuk egy háromkamrás plexiarénában (60x40 cm), ahol minden oldalkamrában egy-egy drótketrecet helyeztünk el. A kísérletek két fázisból álltak: 5 perces habituációs és 10 perces tesztfázisból. Az első habituációs fázisban a kísérleti állat 5 percig szabadon fedezhette fel az egész arénát. Ezt követően az egeret az aréna középső kamrájába zártuk, és egy azonos korú és nemű idegen egeret (intruder) helyeztünk a kamra egyik oldalsó drótketrecébe. A másik oldalsó kamra drótketrece üresen maradt. Ezután a 10 perces tesztfázis kezdetén kinyitottuk a kapukat a ketrecek között. A Noldus Ethovision XT 13 szoftverrel élő nyomon követési méréseket végeztünk, összehasonlítva azt az időt, amelyet a tesztegér az egyes, a szoftverben meghatározott szimatolási zónákban töltött. A

szociális preferenciát százalékban fejeztük ki: az üres- vagy az intruder-szimatolási zónában töltött kumulatív időtartam (másodperc) és a mindkét szimatoló zónában töltött össződő hányadosának százszorosát véve.

5.1.4.2 Mosakodás (self-grooming) teszt

A mosakodás tesztet a Kyzar által leírtak szerint végeztük [222]. A kísérletek előtt az egereket 30 percig szoktattuk a kísérleti helyiséghez. Az állatokat egyenként üveghengerekbe (12 cm átmérőjű, 20 cm magas) helyeztük egymástól elszeparálva, és 10 percen keresztül rögzítettük a spontán mosakodási viselkedésüket. A mosakodás hosszát és frekvenciáját manuálisan pontoztuk a Noldus Observer XT szoftver segítségével, és a mosakodás kumulatív időtartamát másodpercben fejeztük ki.

5.1.4.3 Üveggolyó-ásás (marble-burying) teszt

Az üveggolyó-ásás tesztet Malkova tanulmánya alapján terveztük [223]. Egy tiszta állattartó ketrecben ($36,7 \times 14,0 \times 20,7$ cm) 4-5 cm vastag, tiszta alom felületén 20 egyforma méretű üveggolyót helyeztünk el egyenlő távolságra, 4x5 sorban. 1/3 felület maradt golyómentes, ahová az egereket óvatosan behelyeztük, majd a ketrecet plexiüveggel fedtük le a 10 perces vizsgálati idő alatt. A >60%-ban alommal fedett golyókat elásottnak tekintettük. Az ásási viselkedés jellemzésére szolgáló elásott golyók mennyiségét darabszámban fejeztük ki.

5.1.4.4 Rotarod teszt

A rotarod-tesztet [221] szerint végeztük egy rotarod-készüléken (Rotarod Treadmill 755, IITC Life Science, Kalifornia, Egyesült Államok). Az egereket óvatosan egy állandó vagy gyorsuló sebességgel forgatható rúdra helyeztük. A készülék 5 egér egyidejű vizsgálatát tette lehetővé. Minden egér két egymást követő napon állandó, 4 fordulat/perc sebességgel végzett habituáción esett át, hogy elérje a rúdon való egyensúlyozás képességét legalább 30 másodpercig. A következő két napban, a vizsgálati fázis során a rúd egyenletesen gyorsult 5 percig 4 és 40 fordulat/perc között. A leesésig eltelt időt a vizsgálati napokon mértük, naponta négyszer. A próbák közötti időköz legalább 30 perc volt. A leesési késleltetési értékeket másodpercben fejeztük ki.

5.1.5 Morfológiai vizsgálatok

5.1.5.1 Kvantitatív immunhisztokémia

Csoportonként 6-13 állat kisagyan végeztünk immunhisztokémiai festést a Purkinje-sejtek számszerűsítése céljából. Az egereket izofluránnal túlaltattuk és 4%-os paraformaldehiddel (PFA) perfundáltuk. A perfúziót 0,1 M foszfátpufferes sóoldattal (PBS) kezdtük az erek átöblítése céljából, majd ezt követte a 4%-os paraformaldehides fixálás. Az agyakat kivettük és egy éjszakán át 4%-os PFA-ban posztfixáltuk. A mintákat háromszor átöblítettük PBS-szel, majd 50 µm-es paraszagittális metszeteket készítettünk a kisagyból Leica vibratom segítségével. A metszeteket 5% normál lószérumot, 1% szarvasmarha szérumalbumint (BSA) és 0,3% Triton X-100-t tartalmazó blokkoló oldatban permeabilizáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten, 0,1 M foszfát pufferben (PB). A metszeteket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk elsődleges antitesttel: nyúlból származó poliklonális anti-calbindin D-28k antitesttel (Swant, CB-38a, 1:12 000), amelyet 0,1 M PB-ben hígítottunk. Ezután a metszeteket ismét háromszor mostuk PBS-szel, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk őket fluoreszcens másodlagos antitesttel (Alexa-Fluor 488 kecske antinyúl IgG, 1:3000, Invitrogen). A metszeteket az előzőek szerint mostuk és óvatosan tárgylemezekre helyeztük. A kitapadt mintákat fluoreszcens festést védő közeggel és fedőlemezekkel fedtük le. A kisagy VII. lebenyéről [224] konfokális Nikon C2 mikroszkóppal készítettünk képeket 20x-os nagyítással. A sejtsűrűséget az ImageJ szoftver segítségével számoltuk manuálisan. A képeken fluoreszcensen jelölt Purkinje-sejtek számát a lebeny mért hosszához hasonlítottuk, így a Purkinje-sejtek sűrűségét sejt/mm-ben fejeztük ki.

5.1.5.2 Szinaptoszóma-integritás mérése elektronmikroszkópiával

Teljes-agy szinaptoszóma frakciókat készítettünk Köfalvi és munkatársai protokollja alapján [225]. Dekapitulációt követően a teljes agyakat szacharóz-HEPES oldatban (0,32 M szacharóz, 0,01 M HEPES, 0,63 mM Na₂EDTA, pH 7,4) 4°C-on homogenizáltuk kézi üveg-dugattyús homogenizátorral, majd 5 percig 3000 g-nél centrifugáltuk. A felülúszót 13000 g-n (10 perc, 4 °C) centrifugáltuk tiszta centrifugacsőben. Ezután a felülúszót elvetettük, és a P2 pelletet 45%-os (v/v) Percoll-Krebs oldatban (Krebs: 113 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM

KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 5,5 mM glükóz, 1,5 mM HEPES, pH 7,4) felvettük, és 2 percig 13000 g-nél 4 °C-on centrifugáltuk. A Percoll-oldatot a folyadékoszlop tetején lévő, szinaptoszómákban gazdag réteg alól leszívtuk, majd a fennmaradó szinaptoszóma-frakciót leválasztottuk, és azonos térfogatú Krebs-oldatban 2 percig 13000 g-nél újra centrifugáltuk. Az így kapott pelletet kétszer újra szuszpendáltuk Krebs-oldatban, ismét centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk. A szinaptoszómákat tartalmazó pelletet 4%-os paraformaldehiddel (pH 7,4) fixáltuk legalább egy órán keresztül. PBS pufferrel történő öblítés után 1%-os OsO₄-al utófixáltuk szobahőmérsékleten 30 percig. A preparátumot en bloc 1%-os uranil-acetáttal 50%-os etanolban festettük (30 perc), majd 50%-os, 70%-os, 90%-os, 100%-os alkohol sorozattal dehidratáltuk. Végül a mintákat Taab 812 gyantába (Taab Laboratories) ágyaztuk be. A minták 60°C-on történő éjszakai polimerizációját ultravékony metszés követte Leica EM UC7 ultramikrorotómával (Leica Microsystem), majd egy Veleta 2k x 2k MegaPixel TEM CCD kamerával (Olympus) felszerelt Hitachi 7100 elektronmikroszkóppal (Hitachi Ltd., Japán) vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópos felvételeket 25 000-es nagyítással készítettük minden vizsgálati csoportban. A kapott képeket „Adobe Photoshop CS3” és az „Image J” szoftver segítségével elemeztük. Az intakt és a malformált (egyenetlen membránok, szabálytalan posztszinaptikus denzitás) szinaptoszómákat manuálisan kétszer számolta meg egy olyan kutató, aki nem tudott a kezelésekről.

5.1.6 Biokémiai vizsgálatok

5.1.6.1 Az IL-1 β kvantitatív elemzése ELISA módszerrel

Az anyai plazma, a magzati agy és a placenta IL-1 β szintjét a The Quantikine® Mouse IL-1 beta Immunoassay, R&D Systems segítségével mértük. A plazmamintákat a vena cava inferiorból vettük, egy órával a poly(I:C) (3 mg/kg), vagy sóoldat intraperitoneális injekcióját követően. A kezelést követően 24 órával magzati agy- és méhlepénymintákat gyűjtöttünk olyan vemhes egerekből, amelyekből korábban nem vettek plazmamintát. A homogenizáláshoz a mintákat 1%-os proteáz inhibitor tartalmazó, PBS-sel 1:1 arányban hígított lízis-pufferbe helyeztük (50mM Tris HCL, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,02%NaN₂, 1% Triton X-100, pH=7,4) helyeztük. Homogenizálás és centrifugálás után az agyi

homogenátumot és a plazmamintákat -80°C -on tároltuk. Az IL- 1β koncentrációját egér IL- 1β -specifikus monoklonális antitesttel előzetesen bevont mikrotiter lemezen határoztuk meg határoztuk meg a gyártó utasításait követve. Az optikai sűrűséget 450 nm-en mikroplate olvasóval határoztuk meg (Cytation™5 Cell Imaging Multi-Mode Reader). A koncentrációs értékeket (pg/ml) GraphPad segítségével számoltuk ki. A szövetminták teljes fehérjekoncentrációját BCA-módszerrel határoztuk meg (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Pierce), és a szövetminták teljes fehérjeszintjének méréséhez az abszorbanciát 560 nm-en mértük. A magzati agyi és placentáris IL- 1β koncentrációkat pg/mg fehérjében fejeztük ki. A plazma citokinkoncentrációkat pg/ml-ben fejeztük ki.

5.1.6.2 Anyai plazma és magzati agyi citokin- és kemokin-vizsgálata

A poly(I:C) (3 mg/kg) vagy sóoldat intraperitoneális beadását követően 0, 6 és 24 órával anyai plazmamintákat gyűjtöttünk farokvénából. 48 óránál magzati agyat, valamint vérmintát gyűjtöttünk a vena cava inferiorból és jéggel hűtött fiziológiás sóoldatba helyeztük. Homogenizálás és centrifugálás után az agyi homogenátumot és a plazmamintákat -80°C -on tároltuk. Óvatos felolvasztást követően a következő citokineket és kemokineket mértük multiplex CBA-analízissel (BD FACSVerse áramlási citométer, BD Biosciences): IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-4, IL-10, TNF α , G-CSF, RANTES, MCP-1. Az elemzéshez FCAP Array 5 (Soft Flow) eszközt használtunk. Az agyi citokinkoncentrációt a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Pierce) segítségével normalizáltuk a teljes fehérjeszintre. Az abszorbancia mérése 560 nm-en történt Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader segítségével. A magzati agyi citokinkoncentrációkat pg/mg fehérjében fejeztük ki. A plazma citokinkoncentrációkat pg/ml-ben fejeztük ki. A termék adatlapján meghatározottak szerint az egér IL- 1β minimális kimutatható dózisa (MDD) 0,46-4,80 pg/ml között mozgott, az átlagos MDD 2,31 pg/ml volt. Az ennél alacsonyabb értékeket nullának vettük.

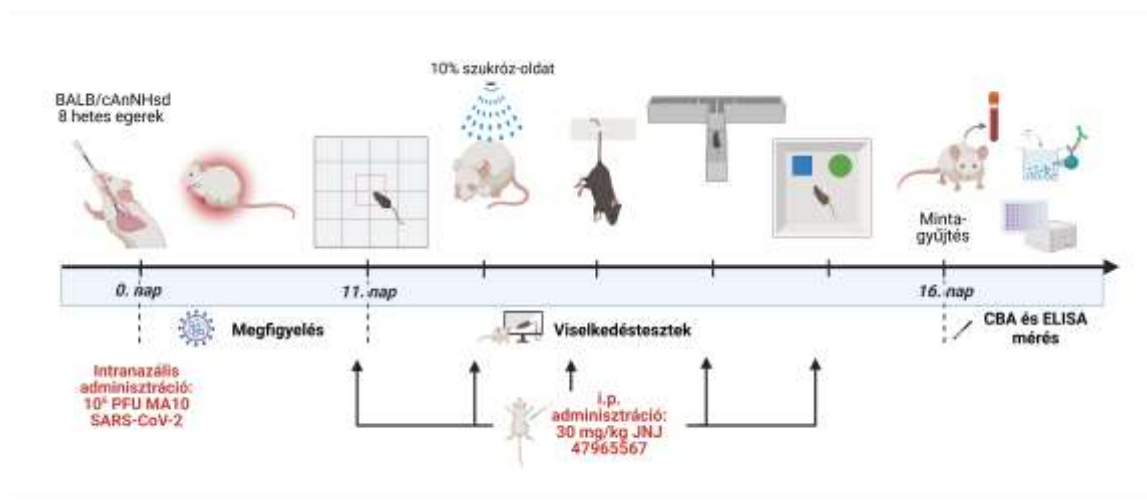
5.1.7 Statisztika I.

A statisztikai elemzésekhez GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) és Statistica 13 (Dell) programokat használtuk. Az adatok normalitását a Kolmogorov-Smirnov-tesztel vizsgáltuk, ahol az adatokat szükség esetén logaritmikusan transzformáltuk. A lehetséges kiugró

értékeket a ROUT módszerrel ($q = 1\%$) [226] detektáltuk, és ezeket az adatokat kihagytuk az elemzésből. Az adatokat átlag+ SEM értékeként mutattuk be, 'n' az állatok számát jelentette. Minden kísérletet 3-7 független alomban ismételtünk meg. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$. A viselkedésvizsgálatokra és a citokinkoncentrációkra vonatkozó adatokat egy- és kétutas ANOVA-val elemeztük Tukey post hoc teszttel kiegészítve. A nem normál-eloszlást mutató adatok esetében a Dunn-féle többszörös összehasonlítással kiegészített nem-parametrikus ANOVA (Kruskal-Wallis) tesztet alkalmaztuk. A részletes statisztikai eredményeket – az egyes ábrákhoz tartozó F, p-értékekkel, próbákkal és elemszámokkal – a 4. Kiegészítő táblázatban foglaltuk össze.

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

5.2.1 Kísérleti elrendezés



5. ábra A vizsgálat kísérleti felépítése. A COVID-19 fertőzés neuropszichiátriai következményeit vizsgáltuk egereken 10^5 PFU SARS-CoV-2 MA10 intranazális beadását követően. 30 perccel minden egyes viselkedésvizsgálat előtt az egerek egy csoportja további P2X7-antagonista (JNJ 47965567) kezelést kapott. A viselkedésvizsgálat végén ketamin-xilazin altatás mellett termináltuk az állatokat és szövetmintákat gyűjtöttünk, majd -80°C -on tároltuk a CBA és az ELISA vizsgálatok elvégzéséig.

A vizsgálathoz 79 nyolchetes BALB/c hím egeret használtunk. Az állatokat egyedileg szellőztetett ketrecekben tartottuk természetes megvilágítási viszonyok mellett, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ -

on, 50–70% páratartalommal. A kísérletek a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ BSL-3 laboratóriumában történtek. A SARS-CoV-2 MA10 törzset intranazálisan, 10^5 PFU dózisban adagoltuk ketamin-xilazin anesztézia mellett. Kontrollként PBS-oldatot alkalmaztunk. A fertőzést követő tíz napon át monitoroztuk a testtömeget és általános állapotot. Egyes egerek a viselkedésvizsgálatok előtt 30 mg/kg dózisú JNJ 47965567 P2X7-antagonista kezelést kaptak intraperitoneálisan (5. ábra).

5.2.2 Viselkedésteszték

A viselkedésteszték között szerepelt a Nyílt tér (“Open Field”) teszt, az úgynevezett “Splash” teszt (cukros-permetes mosakodás teszt), a faroklógatás teszt (“Tail Suspension”), a T-labirintus (“T-maze”), valamint az új tárgy preferencia teszt (“Novel Object Recognition”). A *nyílt tér teszt* során az egereket egy négyzet alapú plexidoboz közepére helyeztük és 30 percen keresztül rögzítettük a spontán mozgásukat, majd Ethovision XT 15 rendszerrel (Noldus) elemeztük a teljes megtett távolságot, sebességet, valamint a centrumban eltöltött időt. A “*Splash*” teszt során az önápolási (mosakodási) viselkedést figyeltük. A vizsgálat során a mosakodásra fordított idő hossza a motivációs állapot és depresszió-szerű viselkedés egyik indikátoraként szolgál. Ehhez az egereket egy téglalap alakú arénában (40 x 13 x 10 cm, átlátszó akrillemezzel borítva) helyeztük el 5 percre habituáció céljából. Ezután az állatokat 10 %-os szacharózzalalattal permeteztük le, és 5 percig rögzítettük a mosakodási viselkedést. Az eredményeket manuálisan elemeztük a Solomon Coder eseményrögzítő szoftver (Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország) segítségével. A faroklógatás teszt során az egereket a padlótól 10 cm magasra függesztettük fel a farkuk végétől 1-2 cm-re elhelyezett ragasztószalag segítségével és 6 percig rögzítettük az inaktivitással töltött időt. Az immobilitás a motiváció és a küzdési hajlandóság csökkenésére utal, így a teszt a depresszió-szerű, tehetetlenségi viselkedés egyik állatmodellje. A videókat szintén a Solomon Coder eseményrögzítő szoftver segítségével elemeztük. A *T-labirintus teszt* során a térbeli memóriát vizsgáltuk, majd az *újszerű objektum felismerését*. Ennek során először az egereket a T-labirintus egy karjához szoktattuk 10 percen keresztül, majd megállapítottuk az új karokba lépések számát, ezáltal meghatározva a spontán alternációk arányát ($\text{Spontán alternáció \%} = (\text{új karba lépés}) / (\text{összes belépés} - 1) \times 100$). Belépésnek a

mind a négy végtag általi vonalátlépést (centrum-kar) számítottuk. 24 órával később végeztük az új tárgy felismerésének vizsgálatát. Ehhez a tesztállatot és két ismeretlen tárgyat helyezünk a korábban használt 3-ágú labirintusba 10 percen keresztül, a két tárgyat az egértől egyforma távolságra két ellentétes kar végébe helyezve. Ezt követően a tesztállatokat az eredeti ketrecükbe visszahelyeztük 3 percre, míg az egyik tárgyat egy új ismeretlen tárgyra cseréltük. A teszt során ismételten 10 percig vizsgáltuk a tárgyfelismerő memóriát, azaz az újszerű és az ismerős tárgyak felfedezésére fordított teljes időt az Ethovision XT 15 rendszer (Noldus) használatával.

5.2.3 Mintakezelés, ELISA és áramlási citometriás CBA analízis

A viselkedésteszteket követő 24 órán belül az állatokat ketamin–xilazin anesztéziában, heparin (10 mL/kg, 550 IU/mL) i.p. beadását követően cervicalis diszlokációval termináltuk. A vena cava inferiorból vérmintát vettünk, majd 6000 rpm-en centrifugáltuk 2 percig. A tüdő jobb alsó lebenyét, valamint a prefrontális kérget (PFC), a hippocampuszt (HIP) és a striátumot (STR) izoláltuk, lízispufferben (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,02% NaN₂, 1% Triton-X, proteázgátló koktél) inaktiváltuk, majd -80 °C-on tároltuk. Ezt követően a szöveteket ultrahangos homogenizálást követően 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 15 percen át 10 000 g-n centrifugáltuk. A felülúszót -80 °C-on tároltuk. A teljes fehérjeszintet Pierce BCA Protein Assay segítségével határoztuk meg, tízszeres hígítás mellett, duplikált mintákban. P2X7 receptor koncentrációját a plazmából és szöveti homogenátumokból ELISA-val határoztuk meg (P2X7 Receptor ELISA Kit, MyBioSource, San Diego, CA, USA; detektálási tartomány: 0,156–10 ng/mL) a gyártó protokollja szerint. A plazmamintákat hígítatlanul, a szöveti mintákat pedig a teljes fehérjetartalomhoz normálva (pg/mg) vizsgáltuk duplikátumban. Az abszorbanciaértékeket 450 nm-en, Multiskan Sky mikrotiter leolvasóval (Thermo Fisher Scientific) mértük. A gyulladásos citokin szinteket (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , CXCL1, TNF- α) CBA Flex Set (BD Biosciences) segítségével mértük a plazma- és szövetmintákban, duplikátumban, kétszeres hígítást alkalmazva. A mérést BD FACSVerse áramlási citométeren végeztük, az adatok elemzése FCAP Array szoftverrel (Soft Flow Kft., Pécs) történt. A citokinszinteket pg/ml-ben (plazma) vagy pg/ μ g fehérje egységben (szövet) adtuk meg.

5.2.4 Statisztika II.

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 8.0.2 szoftverrel végeztük. Az állatokat random módon osztottuk be a kísérleti csoportokba, a viselkedéses elemzéseket a kezelések ismerete nélkül, vak módon végző kísérletvezető végezte. A túlélési arány elemzéséhez Log-rank (Mantel–Cox) tesztet alkalmaztunk. A normáeloszlás ellenőrzése Kolmogorov–Szmirnov-teszttel történt. A többszemponos összehasonlításokhoz egy- vagy kétutas ANOVA-t használtunk, szükség esetén logaritmikus transzformációval, majd Sidak- vagy Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatok átlag $\pm$ SEM vagy 95%-os konfidenciaintervallum formájában kerültek megjelenítésre. A statisztikai szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -ben határoztuk meg, amelyet az ábrákon csillaggal jelöltünk (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). A részletes statisztikai eredményeket – az egyes ábrákhoz tartozó F, p-értékekkel, próbákkal és elemszámokkal – az 5. *Kiegészítő táblázatban* foglaltuk össze.

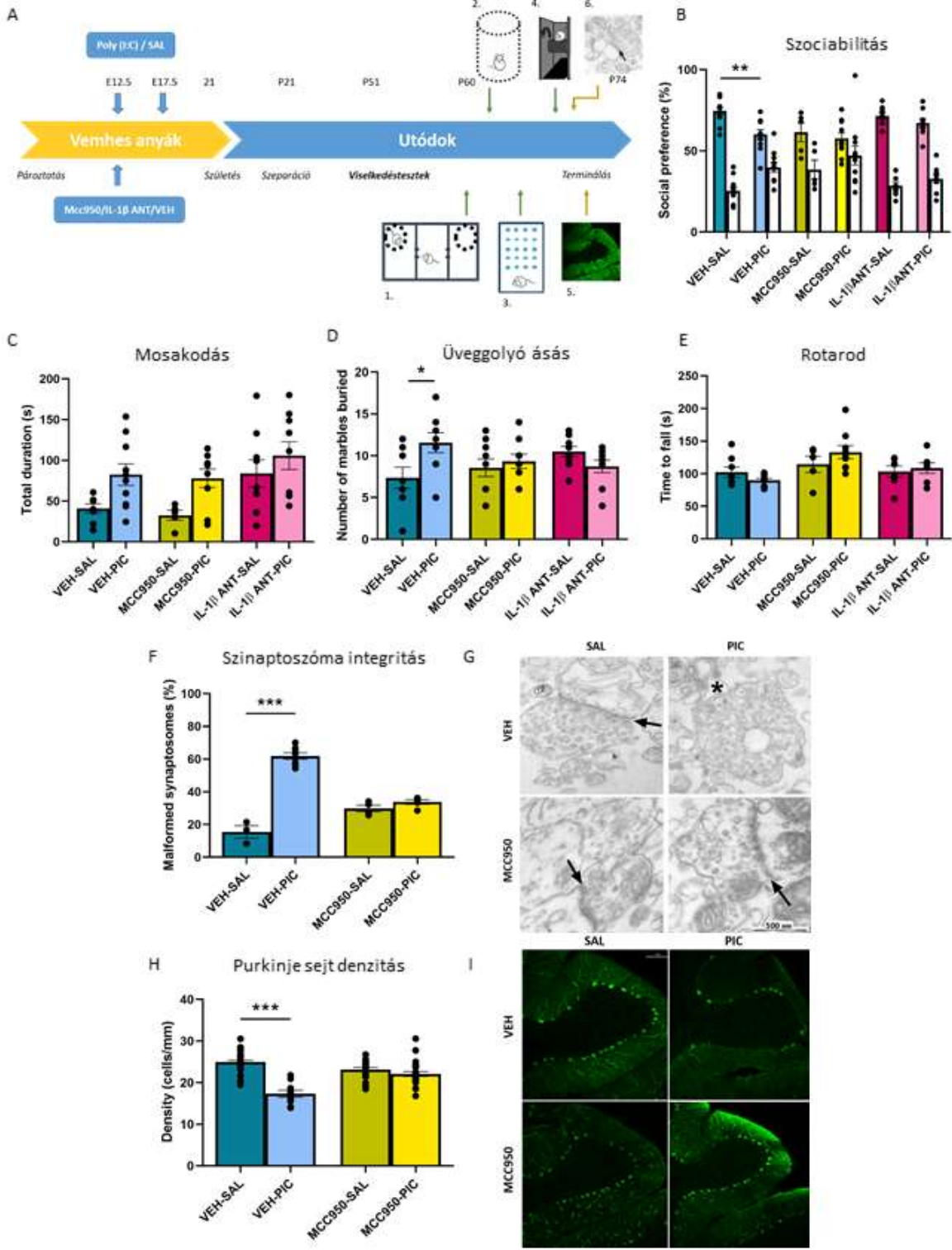
6 EREDMÉNYEK

6.1 I. A P2X7-receptor szerepe az autizmus spektrum zavar egérmodellben

6.1.1 Az NLRP3 és IL-1 β gátlása mérsékelte a MIA által kiváltott autizmus-szerű fenotípus kialakulását

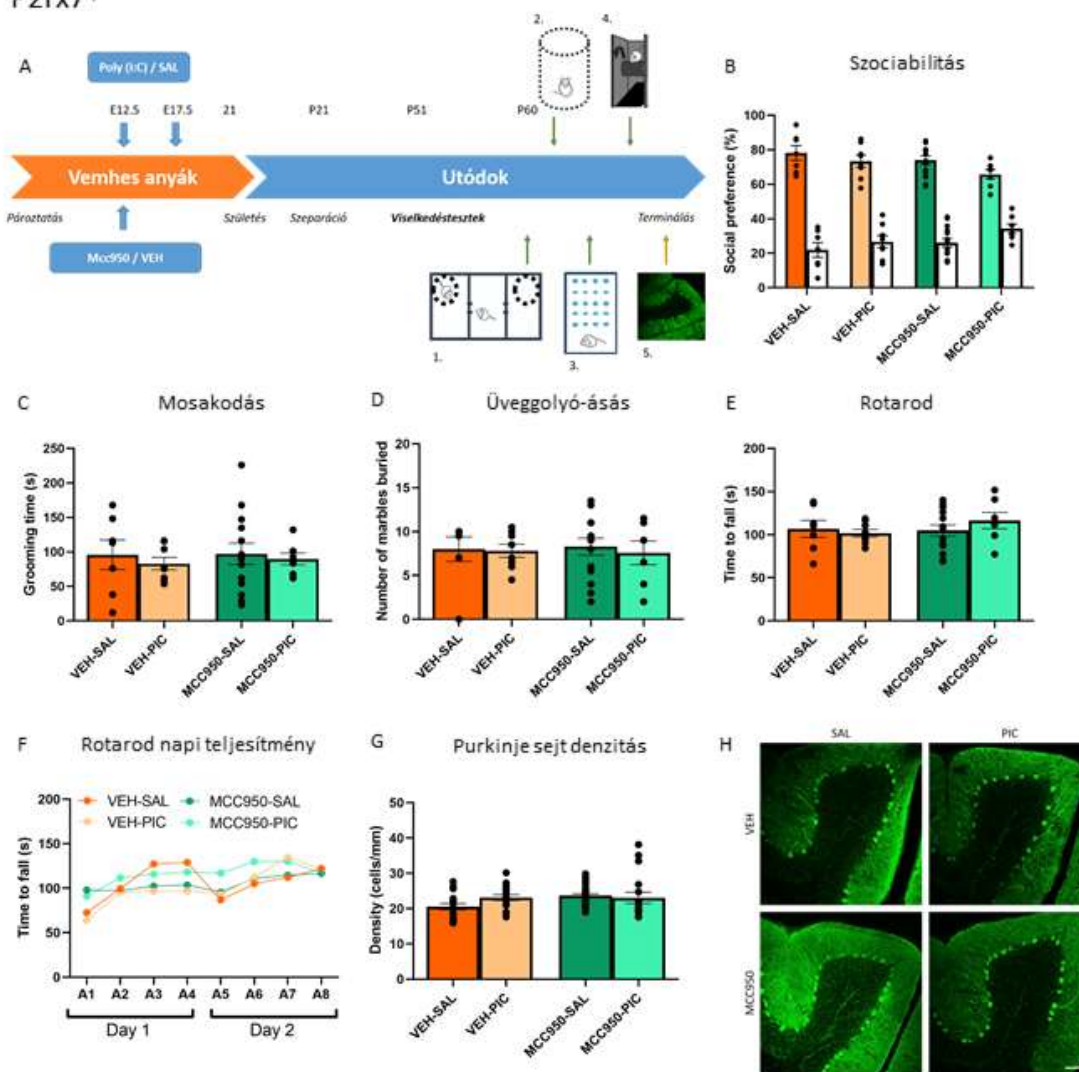
Az *1. kísérletben* azt vizsgáltuk, hogy az NLRP3 farmakológiai gátlása hogyan módosítja az anyai immunaktiváció hatására kialakult ASD-szerű fenotípust egerekben. Az anyai poly(I:C) kezelés a P2rx7^{+/+} utódokban autisztikus fenotípust váltott ki, így szociális deficitet (*6B ábra*) és repetitív viselkedésmintázatot figyeltünk meg a szociális preferencia és golyózás tesztben (*6D ábra*), de nem változtatta meg a mosakodási gyakoriságot és a szenzomotoros koordinációt (*6C, E ábra*). NLRP3 antagonistá MCC950-el (50 mg/kg i.p.) való anyai előkezelés kivédte ezen fenotípus kialakulását (*6B,D ábra*). Hasonlóképpen, az anyai előkezelés IL-1 β antitesttel (25 μ g/kg i.p.) szintén megakadályozta a szociális deficitet (*6B. ábra*), valamint az utódok repetitív viselkedésének változását (*6D ábra*). Hasonlóképpen, az IL-1 α/β -hiányos egereknél sem alakult ki autisztikus fenotípus az anyai poly(I:C) kezelést követően (*1. kiegészítő ábra*). Ezután megvizsgáltuk a szinaptoszómák integritását és a Purkinje-sejtek sűrűségét. A poly(I:C) kezelés a szinaptoszómák integritásának csökkenéséhez vezetett, mely a malformált szinaptoszómák nagyobb százalékát eredményezte (*6F-G ábra*), továbbá Purkinje-sejtvesztést okozott a VII. kisagyi lebenyben (*6H-I ábra*), míg az MCC950 előkezelt csoportokban nem észleltünk különbséget a morfológiában (*6F-I*).

P2rx7^{+/+}



6. ábra Az MIA-indukált autizmus-szerű viselkedés megelőzése NLRP3- és IL-1 β -gátlással. A folyamatábrán látható a kísérleti protokoll (1. kísérlet) (A). **B-E** Az anyai immunaktiváció szociális deficitet váltott ki (B), valamint növelte az eltemetett golyók számát av VEH-al kezelt egerekben (D), míg az MCC950 és az IL-1 β antagonistával előkezelt egerekben nem volt megfigyelhető a poly(I:C) (PIC) fenotipikus hatása, bár mindkét MCC950 kezelt csoport alacsonyabb SP értékeket mutatott a VEH-SAL kezelt csoporthoz képest (B). A poly(I:C)-kezelés kismértékben növelte a mosakodási időt, azonban a különbség egyik csoportban sem érte el a szignifikancia határát (C). A szociális preferenciát (%) úgy számoltuk ki, hogy az időnek, amelyet a tesztegér az idegen egér interakciójával töltött és az összes időnek, amelyet a tesztegér az idegennel és az üres ketreccel együttesen töltött, a hányadosát vettük és megszoroztuk százszal. **F-G** A sérült szinaptoszómák arányát jelzik a diagramon feltüntetett pontok (F). Reprezentatív EM-kép a szinaptoszóma preparátumokról (G). A VEH-al kezelt agymintáknál látható sérült szinaptoszómák arányának szignifikáns különbségét az MCC950 kezelés kivédte. A malformált szinapszisok (csillag) a normálisan fejlett szinapszisoktól (nyilak) eltérő struktúrát mutattak (egyenetlen membránok, szabálytalan posztzinaptikus sűrűség). **H-I** A Purkinje-sejtek sűrűsége a VEH-al kezelt csoportban MIA hatására csökkent, mely csökkenést az MCC950-PIC kettős kezelés kivédte (H). Reprezentatív kép a kisagy VII. lebenyében lévő kalbindin-jelölt Purkinje-sejtekről (I). Az adatok 10-30 technikai ismétlésnek felelnek meg, csoportonként n = 3 vagy 4 állatból. Méretség: 100 μ m. Minden adatot átlag + s.e.m. szórásértékekkel ábrázoltunk. *p < 0.05. **p < 0.01. ***p < 0.001. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

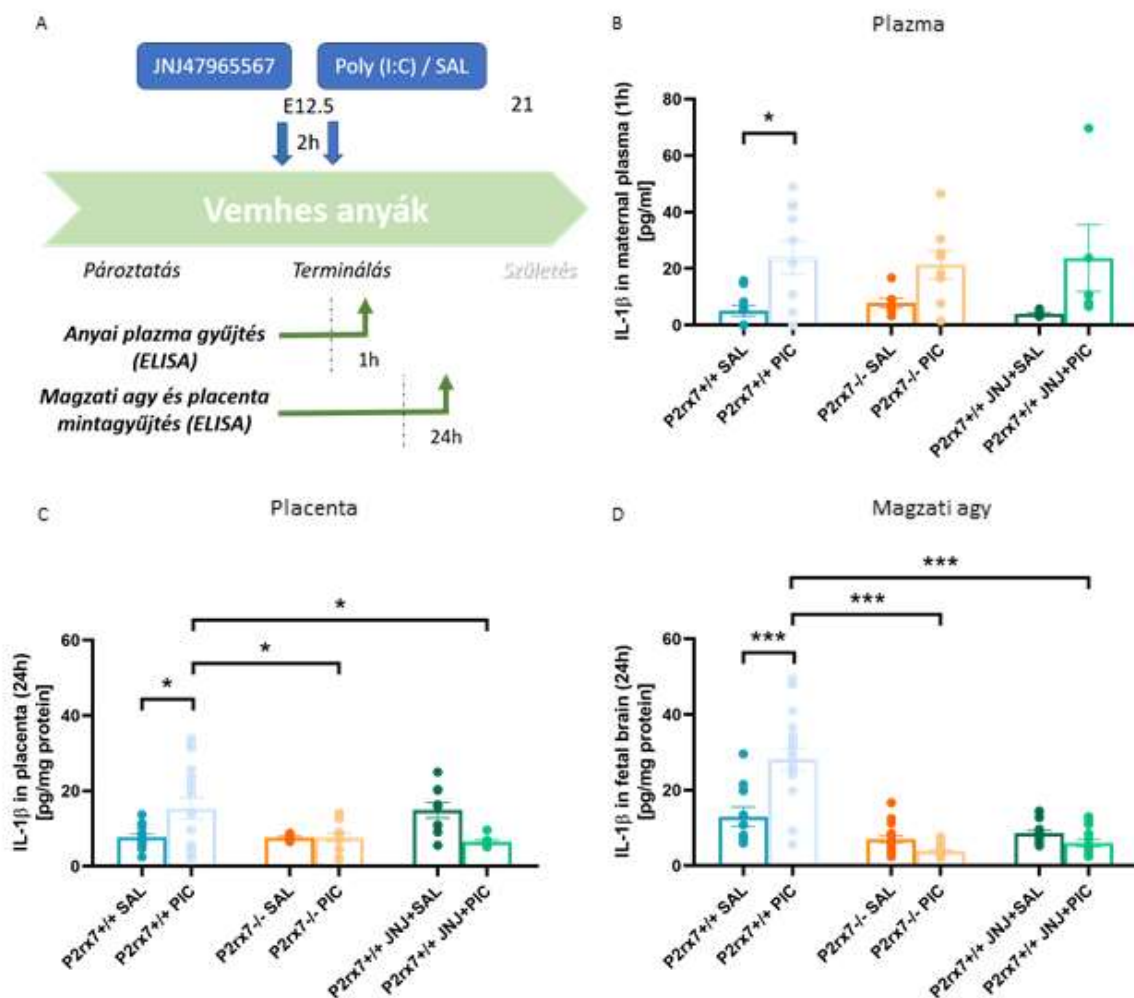
Korábbi adatainkat megerősítve (Horváth és mtsai., 2019), a VEH-SAL és VEH-PIC kezelt P2rx7^{-/-} egerek nem mutatták az autista fenotípus egyetlen aspektusát sem a viselkedésben, sem a morfológiai jellemzőkben (7B-H ábra). Hasonlóképpen, az anyai MCC950 előkezelés sem befolyásolta a szociális vagy repetitív viselkedést (7B-D ábra), sem a motoros koordinációt (7E-H ábra) ennél a genotípusnál.

P2rx7^{-/-}

7. ábra Az anyai Poly(I:C) kezelés nem váltott ki autista fenotípust sem a VEH, sem az MCC950-kezelte P2rx7^{-/-} állatokban. A folyamatábrán látható a kísérleti protokoll (2. kísérlet) (A). **B** Egyik csoportban sem jelentkezett szociális deficit. **C-F** A repetitív viselkedések (C,D) és a szenzomotoros koordináció (E,F) nem mutattak különbséget a MIA hatására egyik PIC-csoportban sem a kontrollcsoportokhoz képest. Ennek megfelelően a VII. lebeny Purkinje-sejtjeinek sűrűségében sem mutatkozott különbség (G,H). Méretszám 100 μ m. Minden adatot átlag + s.e.m szórásértékekkel ábrázoltunk. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

6.1.2 A P2rx7 hiánya és az NLRP3 gátlása megakadályozta a poly(I:C) által kiváltott IL-1 β -szint emelkedését mind a placenta, mind a magzati agymintákban.

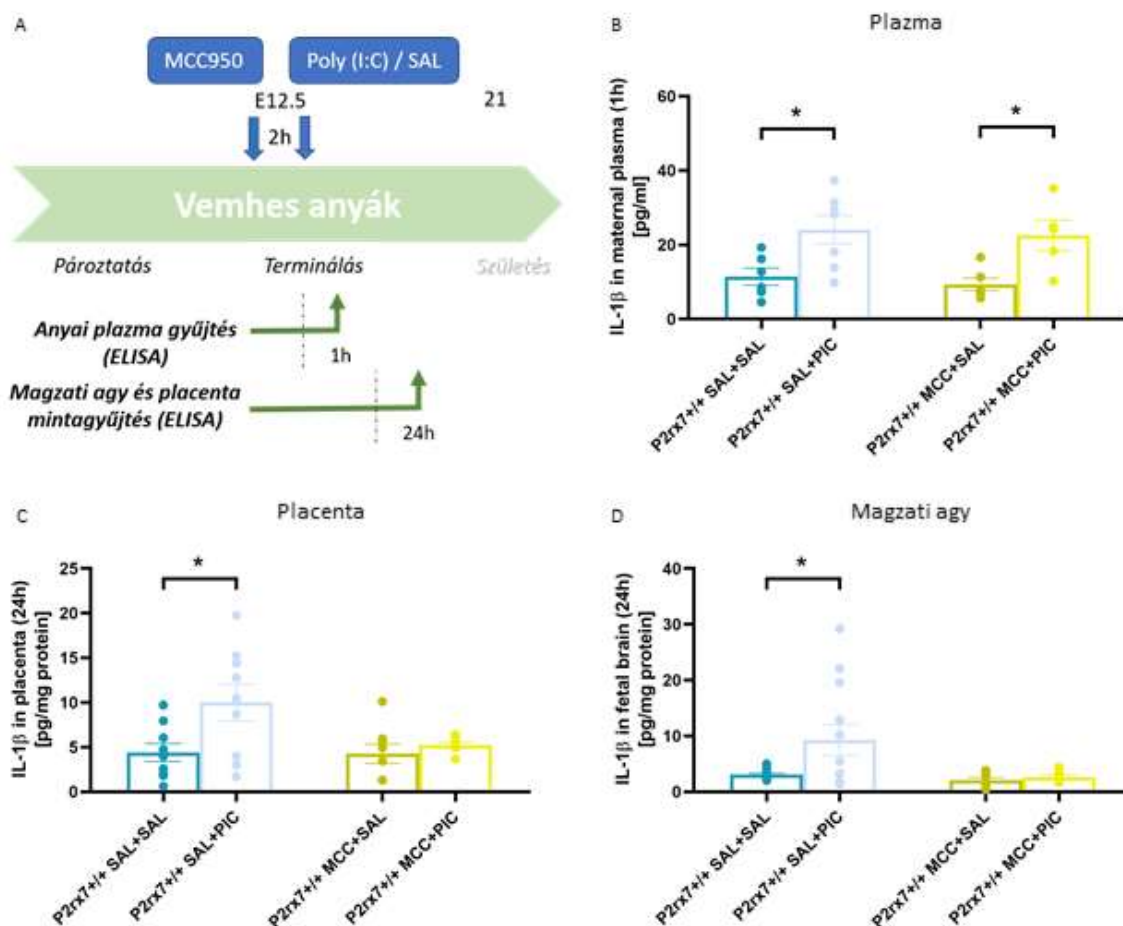
A 2. kísérletben egérspecifikus IL-1 β immunvizsgálatot végeztünk annak meghatározására, hogy az anyai poly(I:C) kezelés indukálja-e az IL-1 β szintjének emelkedését az anyai keringésben, a placentában és az utódok agyában. A vizsgálatot vad típusú és P2rx7-hiányos egerekben végeztük, valamint anyai előkezelést alkalmaztunk a JNJ47965567 szelektív P2X7-receptor-antagonistával és az MCC950 NLRP3-inhibitorral. A JNJ47965567-et, az MCC950-et és a hordozóját a megfelelő poly(I:C) kezelés előtt két órával adtuk be. A P2rx7^{+/+} egerekben a poly(I:C) már az injekció beadása után 1 órával megnövelte az IL-1 β szintjét az anyai plazmában, míg a P2rx7^{-/-} és a JNJ47965567 előkezelt egerek plazmamintáiban észlelt különbségek nem voltak szignifikánsak. (8B ábra). Az IL-1 β fehérje szintje a poly(I:C) hatására 24 órával az injekció beadása után megnövekedett a placentában (8C ábra) és a magzati agyban (8D ábra) vad típusú egerekben. A P2rx7 gén hiánya, valamint az anyai előkezelés a JNJ47965567 szelektív P2X7-antagonistával megakadályozta a poly(I:C) által kiváltott IL-1 β -szint emelkedését mindkét szövettípusban (8C–D ábra).



8. ábra Poly(I:C) által kiváltott IL-1 β szint emelkedés WT egerek anyai és magzati szövetmintáiban. **A** P2rx7 genetikai és farmakológiai gátlása mindhárom szövettípusban megakadályozta a poly(I:C) által okozott jelentős IL-1 β emelkedést. **A** Folyamatábrán bemutatott kísérleti protokoll (2. kísérlet). **B** A PIC szignifikánsan megnövelte a pro-inflammatorikus IL-1 β szintjét P2rx7^{+/+} egerek anyai plazmájában, de nem szignifikánsan a genetikailag és farmakológiailag P2rx7-hiányos egerekből származó mintákban (B). A plazmamintákat a gyógyszer beadását követően 1 órával gyűjtöttük. A különböző pontok különböző állatok mintáinak felelnek meg (csoportonként 5-10 állat). **C-D** A PIC IL-1 β koncentráció-emelkedést idézett elő 24 órával a MIA indukcióját követően vad típusú egerek placenta (C) és magzati agy (D) mintáiban, míg ez a hatás elmaradt a P2rx7^{-/-} és a JNJ előkezelt P2rx7^{+/+} egerekből származó mintákban. Egy vemhes állatból két intakt placenta és 2-3 hasonló méretű és különböző méhhelyzetű magzati agymintát gyűjtöttünk, így csoportonként 9-17 placenta- és 10-24 magzati agymintát kaptunk, amelyek 5-9 állathoz tartoztak. A plazmában mért citokin

és kemokin értékeket pikogramm per milliliterben, a magzati agyban és a placentában mért értékeket pikogramm per mg összfehérje mennyiségben fejeztük ki. Minden adatot átlag + s.e.m szórásértékekkel ábrázoltunk. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

Az MCC950 egy NLRP3-inhibitor (50 mg/kg), melyet 2 órával az anyai poly(I:C)-kezelés előtt intraperitoneálisan injektáltunk vad típusú egerekbe. Ez a kezelés megakadályozta az IL-1 β termelődését a placentában és a magzati agyban (9C–D ábra), míg nem befolyásolta az anyai plazmában megfigyelt, poly(I:C) által indukált IL-1 β -szintkülönbséget a sóoldatos kezeléshez képest (9B ábra).

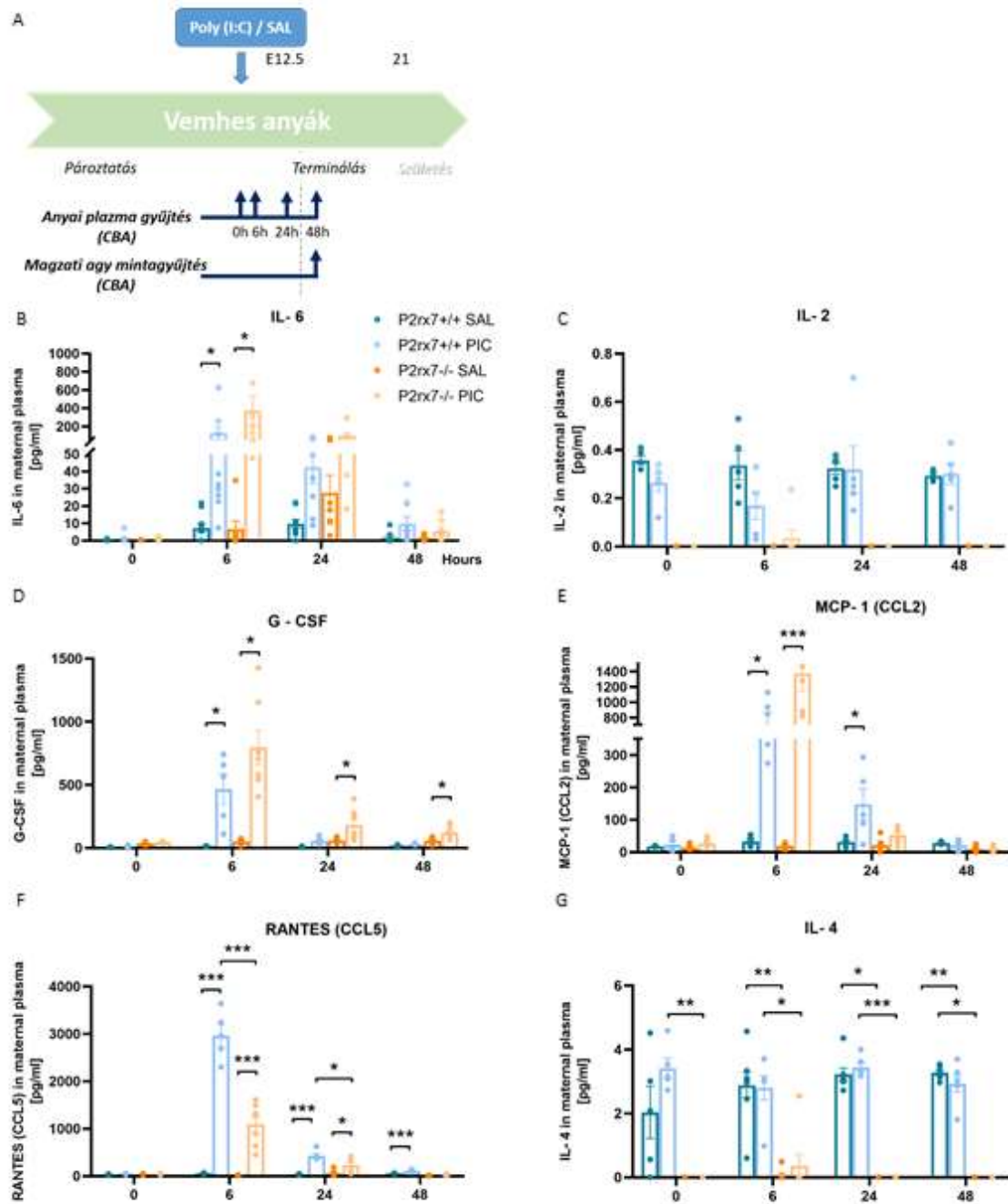


9. ábra Az NLRP3 farmakológiai gátlása megakadályozta a poly(I:C) jelentős IL-1 β -szint emelkedést kiváltó hatását a placenta és a magzati agymintákban, azonban az anyai plazmában nem. *A* Folyamatábrán bemutatott kísérleti protokoll (2. kísérlet). *B* A PIC kezelés ismételt megemelte az IL-1 β szintjét a P2rx7^{+/+} egerek anyai plazmájában 1 órával a PIC injekciót követően mind az NLRP3-antagonistával előkezelt, mind a fiziológiás sóoldattal kezelt egerek esetében (B). A különböző pontok különböző állatok mintáinak felelnek meg (csoportonként 5-10 állat). *C-D* A PIC az IL-1 β koncentrációjának emelkedését kiváltotta 24 órával a MIA indukcióját követően a vad típusú egerek placentáris (C) és magzati agyi (D) mintáiban is, míg az MCC950-előkezelt egerek esetében a poly(I:C) beadása nem eredményezett szignifikáns növekedést. Csoportonként öt vemhes állatból két intakt placentát, valamint 2-3 hasonló méretű, de eltérő méhbeli elhelyezkedésű magzati agymintát gyűjtöttünk. A plazmában mért citokin- és kemokintértékeket pikogramm per milliliterben, míg a magzati agyban és a placentában mért értékeket pikogramm per milligramm összefehérje mennyiségben fejeztük ki. Minden adatot átlag $\pm$ s.e.m. formájában adtunk meg. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

6.1.3 A poly(I:C) által kiváltott proinflammatorikus változások a citokin- és kemokinszintekben az anyai plazmában és a magzati agymintákban

A 2. kísérletben az anyai immunaktiváció (MIA) hatását vizsgáltuk a citokinek és kemokinek széles spektrumára nézve is különböző időpontokban (0, 6, 24 és 48 órával a MIA indukcióját követően), P2rx7^{+/+} és P2rx7^{-/-} egerek anyai plazma- és magzati agymintáinak felhasználásával (10.-11. ábra, 2. kiegészítő ábra). A citokinkoncentrációkat 6 órával a MIA indukciója után vizsgáltuk, és mindkét genotípusban jelentős, poly(I:C) által kiváltott IL-6 emelkedést találtunk, ami P2X7-független mechanizmus közreműködésére utalt (10B ábra). A plazma RANTES szintje szintén 6 óránál jelentősen megnőtt, és az emelkedés mértéke P2X7-függőnek tűnt, mivel a P2rx7^{-/-} csoportban az emelkedés szignifikánsan kisebb volt. Ez a tendencia 24 óránál is megfigyelhető volt (10F ábra). A G-CSF szintje mindkét genotípusban emelkedett a MIA indukcióját követően 6 órával, de a 24. órára csökkent a P2rx7^{+/+} csoportban. A poly(I:C) által kiváltott emelkedés azonban a P2rx7^{-/-} egerekben 24 és 48 órával a kezelés után is fennmaradt (10D ábra). A MIA a poly(I:C)-kezelést követően az MCP-1 plazmaszintjének genotípusfüggetlen emelkedését váltotta ki, amely 6 óránál érte el a csúcspontját. A P2X7-hiánynak volt némi hatása az anyai plazmában 24 órán át tartó MCP-1-emelkedésre (10E ábra). Érdekes módon a plazma TNF α csak a P2rx7^{-/-} csoportban mutatott szignifikáns emelkedést 6 óránál (2B kiegészítő ábra). Az IL-4 szintjét nem

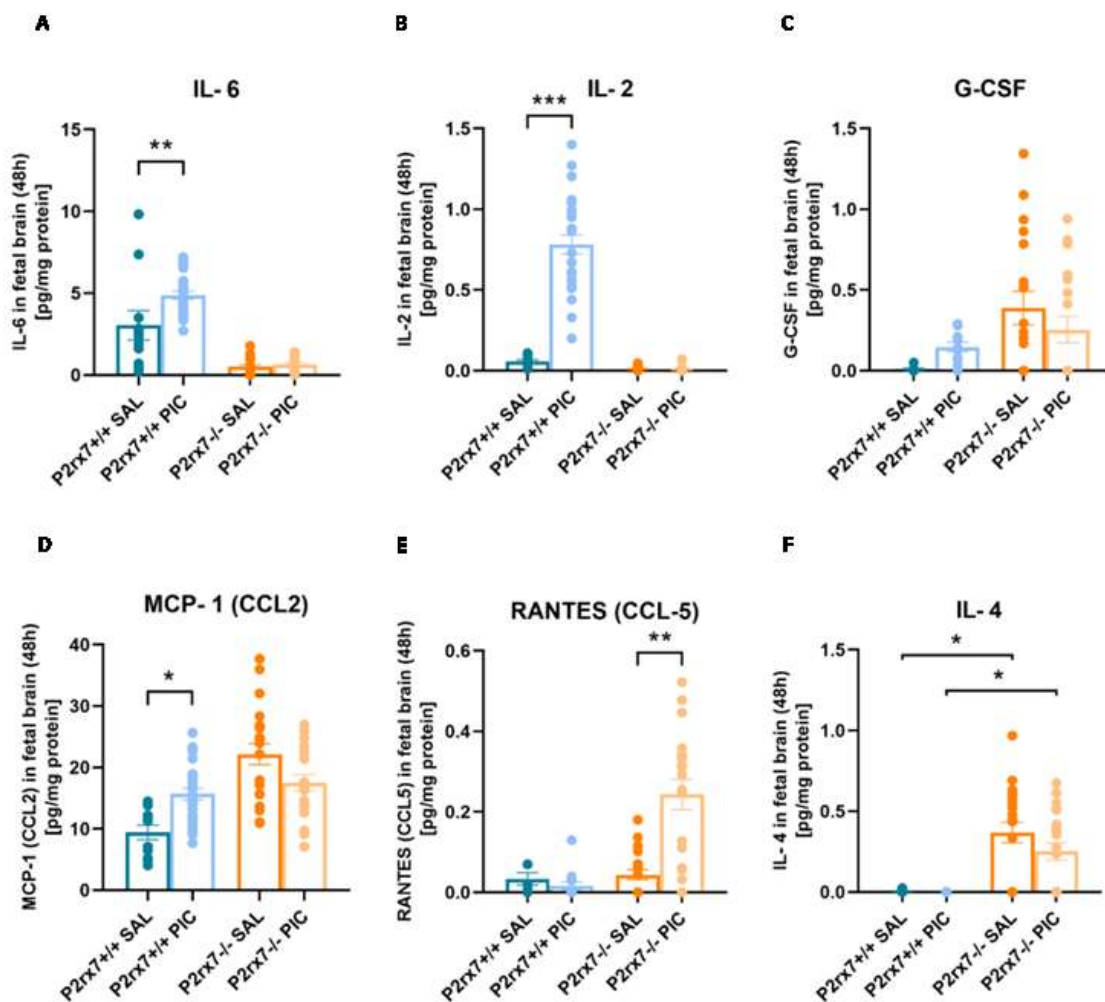
befolyásolta a poly(I:C) kezelés a P2rx7^{+/+} csoportban, és nem volt kimutatható a P2rx7^{-/-} egerekben. A CBA-méréshez használt Mouse IL-4 Flex Set (BD, 558298) gyártójának technikai adatlapja szerint a kimutatás elméleti határa 0,3 pg/ml, így a P2rx7^{-/-} minták többsége feltehetően a kimutatási határ alá esett (*10G ábra*). Az IL-2-t nem befolyásolta a poly(I:C) kezelés, és nem volt kimutatható a P2rx7^{-/-} egerekben. Az elméleti kimutatási határ az IL-2 esetében 0,2 pg/ml. Az IFN- γ (*2A kiegészítő ábra*) és az IL-10 (*2C kiegészítő ábra*) anyai plazmaszintjében egyik időpontban sem mutattunk ki genotípushoz vagy kezeléshez kapcsolódó különbségeket.



10. ábra Az anyai plazmában mért citokin- és kemokin-koncentrációk a poly(I:C) beadását követő különböző időpontokban. **A** Folyamatábrán látható kísérleti protokoll (2. kísérlet). A 48 óránál végzett terminális vérvételt megelőzően a fenti 3 időpontban csoportonként 5-10 vemhes állattól vettünk vért, majd

állatonként 1-3 hasonló megjelenésű és különböző méhpozíciójú magzati agyat gyűjtöttünk (*lásd 11. ábra*). **B-G** Az IL-6 koncentrációja megemelkedett mind a P2rx7^{+/+}, mind a P2rx7^{-/-} plazmamintákban a poly(I:C) injekciót követően (B). Az IL-2 anyai plazmában nem mutatkozott szignifikáns különbség a sóoldatos és a PIC-csoportok között (C). A G-CSF mind a P2rx7^{+/+}, mind a P2rx7^{-/-} poly(I:C)-kezelt állatok mintáiban emelkedett az anyai plazmában a 6. órában, és magasabb értékeket mutatott a plazmában minden génkiütött csoportban (D). A kemokinek plazmaszintje a poly(I:C)-kezelést követően emelkedett (E, F). A RANTES plazmaszintje szignifikánsan alacsonyabb volt a P2X7-hiányos poly(I:C)-kezelt csoportban, mint a vad típusú megfelelőben (F). Az IL-4 plazmakoncentrációja magasabb értékeket mutatott a vad típusú csoportokban, de a poly(I:C) nem indukálta. A plazmában mért citokin- és kemokin-értékeket pikogramm per milliliterben fejeztük ki. Minden adatot átlag + s.e.m szórásértékekkel ábrázoltunk. *p < 0.05. **p < 0.01. ***p < 0.001. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

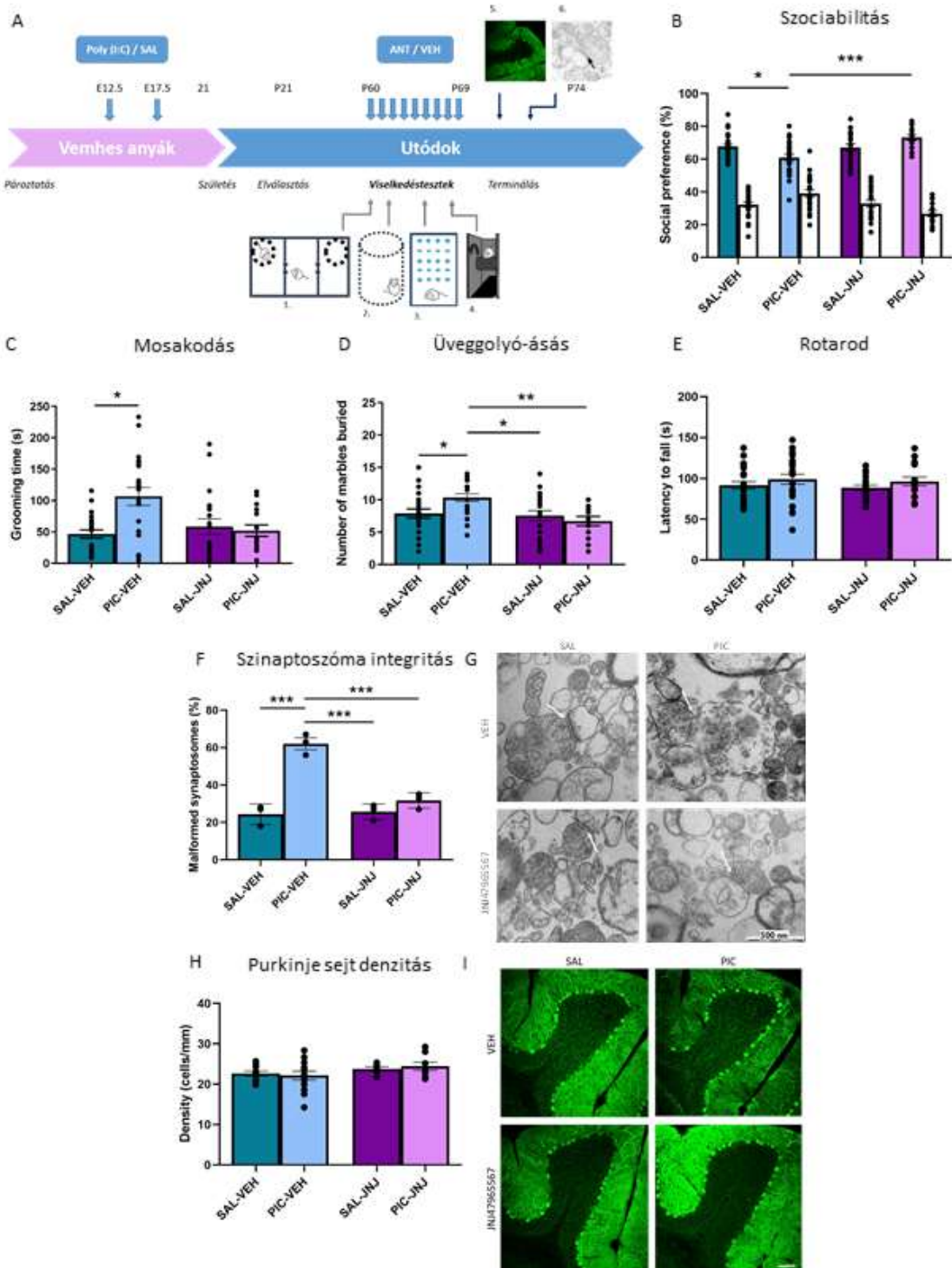
A magzati agyakban a poly(I:C) az IL-6 (*11A ábra*), IL-2 (*11B ábra*) és MCP-1 (*11C ábra*) szintjének genotípusfüggő, szignifikáns emelkedését idézte elő a sóoldattal kezelt csoporthoz képest 24 órával az anyai immunaktivációt követően, amely különbség a P2rx7^{-/-} állatok mintáiban nem volt megfigyelhető. Az IFN- γ (*3A kiegészítő ábra*), TNF- α (*3B kiegészítő ábra*) és IL-10 (*3C kiegészítő ábra*) citokinszintek a P2rx7-hiányos csoportban a kimutatási határérték alatt maradtak, míg a vad típusú állatokból származó mintákban kimutathatóak voltak. A kezelés és a genotípus nem okozott szignifikáns különbségeket a RANTES (*11D ábra*) és a G-CSF (*11E ábra*) szintjében, bár a RANTES koncentrációját a poly(I:C) szignifikánsan növelte a P2rx7^{-/-} csoportban. Míg az IL-4 koncentrációja a vad típusú állatok mindkét kezelési csoportjában nagyon alacsony értékeket mutatott, a P2rx7^{-/-} egerekben sokkal magasabb értékeket kaptunk (*11F ábra*), ellentétben a plazmaszinttel, ahol a vad típusban találtunk jelentősen magasabb értékeket (*10G ábra*).



11. ábra Magzati agymintákban mért citokin- és kemokin-koncentrációk az anyai immunaktivációt követő 48 órában. A magzati agymintákat 48 órával a MIA indukciója után gyűjtöttük, a terminális anyai vérvétellel együtt. **A-B.** A magzati agyban a P2X7 receptorok hiánya megakadályozta a poly(I:C) kezelés által okozott IL-6 (A) és IL-2 (B) szint növekedését. **C.** A G-CSF nem indukálódott szignifikánsan a magzati agyban. **D.** Az MCP-1-et a MIA indukálta, és ezt a hatást a P2X7 hiánya megakadályozta. **E.** A RANTES kiemelkedő koncentrációs értékeket mutatott a P2rx7^{-/-} csoportban. **F.** A P2rx7^{-/-} csoportok gyulladásátló IL-4 szintje a P2rx7^{+/+} társaihoz képest megnövekedett értékeket mutatott a magzati agyban, ellentétben a plazmaszintjével. A magzati agyakban mért citokin- és kemokinértékek pikogramm per összfehérje értékben vannak kifejezve. Minden adatot átlag $\pm$ s.e.m formában ábrázoltunk. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

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

Csoportom korábbi cikkében (Horváth és mtsai., 2019 [180]) kimutatták, hogy az utódok P2X7 genetikai deléciója és farmakológiai gátlása egyszeri JNJ47965567 antagonista injekcióval megakadályozta a MIA által kiváltott utódok viselkedési és szövettani elváltozásait és citokinválaszait. A P2X7 mint potenciális gyógyszercélpont további validálása érdekében ismételt JNJ47965567-kezelést alkalmaztunk olyan MIA-modellben, amely az egyszeri kezeléshez képest jobban hasonlít egy potenciális humán terápiás kezelési időszakhoz. A 3. kísérletben a JNJ47965567-et 20 mg/kg/nap adagban adtuk be az utódoknak intraperitoneálisan, P65-től kezdődően kilenc napon keresztül, 2 órával a megfelelő viselkedési tesztek előtt (*12A ábra*). A szociális preferencia tesztben a MIA enyhe szociális deficitet eredményezett a VEH-val kezelt csoportokban, míg a JNJ47965567-el kezelt utódok nem mutattak szignifikáns különbséget az anyai kezelés tekintetében, ami azt jelzi, hogy a P2X7 antagonista megfordította az anyai poly(I:C) hatását (*12B ábra*). A VEH-al kezelt csoportokban a MIA szignifikánsan növelte a repetitív viselkedést, azaz a mosakodással töltött teljes időtartamot és az elásott golyók számát (*12C-D ábra*) a kontroll utódokhoz képest, míg a JNJ47965567 adása kivédte az anyai poly(I:C) ezen hatását. A gyorsuló rotarod teszttel mért szenzomotoros koordinációt nem befolyásolta sem a poly(I:C), sem a JNJ47965567 hatása (*12E ábra*). A szinaptoszómák integritását elektronmikroszkópiával értékeltük. A MIA szignifikánsan növelte a VEH-al kezelt utódokban a rendellenesen strukturált szinapszisok számát (*12F-G ábra*). Ezzel szemben az ismételt JNJ47965567 adagolás az utódokban jelentősen csökkentette az abnormális szinapszisok számát. A rotarod teszthez hasonlóan a Purkinje-sejtek elvesztése a MIA hatására nem volt megfigyelhető ebben a kísérletsorozatban (*12H-I ábra*). A JNJ47965567 önmagában egyik tesztben sem volt jelentős hatással a fenotípusra.

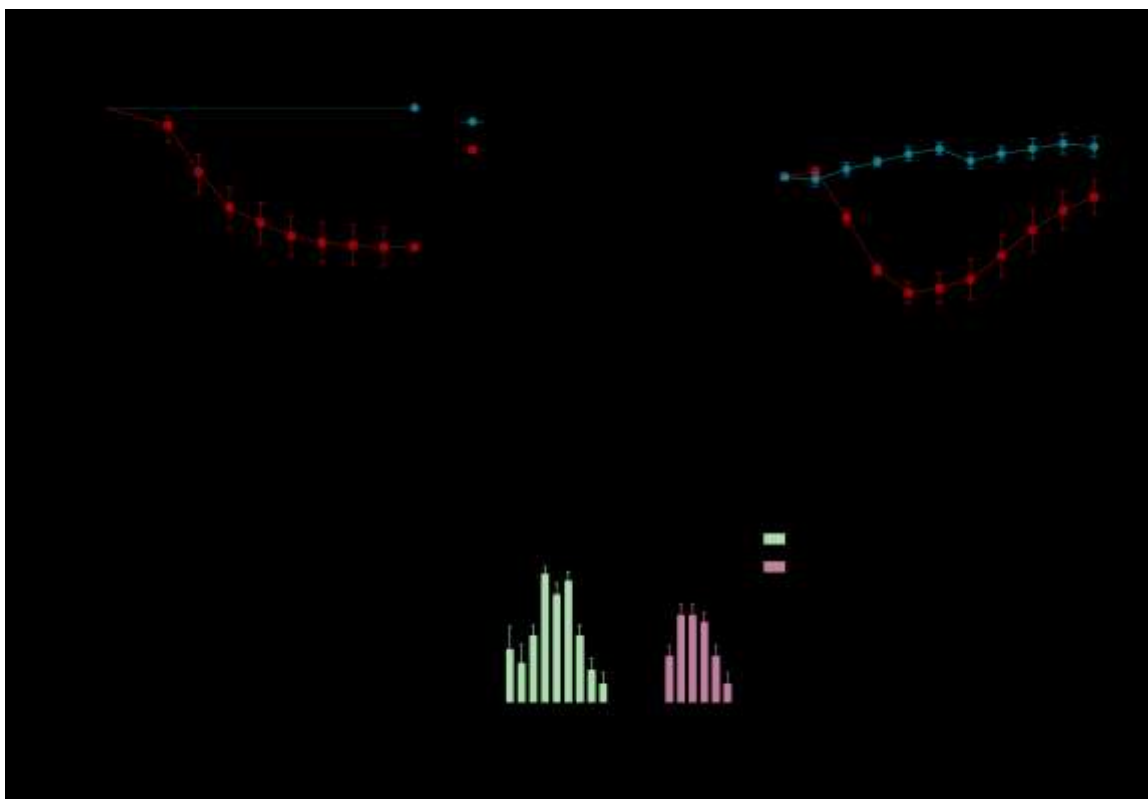
P2rx7^{+/+}

12. ábra A P2rx7 antagonistával (JNJ47965567) történő ismételt utódkezelés megakadályozta a MIA által kiváltott hatásokat P2rx7^{+/+} egerekben. **A** Folyamatábrán bemutatott kísérleti protokoll (3. kísérlet). A viselkedési tesztek változásait vizsgáltuk a szubkrónikus antagonista kezelés során. **B-D**. Az antagonista kezelés kivédte a szociális deficit kialakulását (B) és normalizálta a repetitív viselkedést (C, D). **E**. A MIA nem volt hatással a szenzomotoros koordinációra. **F-G**. A MIA a kontrollcsoportban növelte a malformált szinaptoszómák számát, amely különbség az antagonistával kezelt csoportban elmaradt. Méretsáv 500 nm. **H-I**. A MIA nem volt hatással a Purkinje-sejtek számára, ami összhangban van a szenzomotoros koordinációs teszt eredményével. Skála: 100 μ m. Minden adatot átlag $\pm$ s.e.m értékekkel ábrázoltunk. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. A részletes statisztikai elemzéseket lásd a 4. Kiegészítő táblázatban.

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

6.2.1 A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés súlyos tüneteket és magas mortalitást váltott ki a hím egerekben

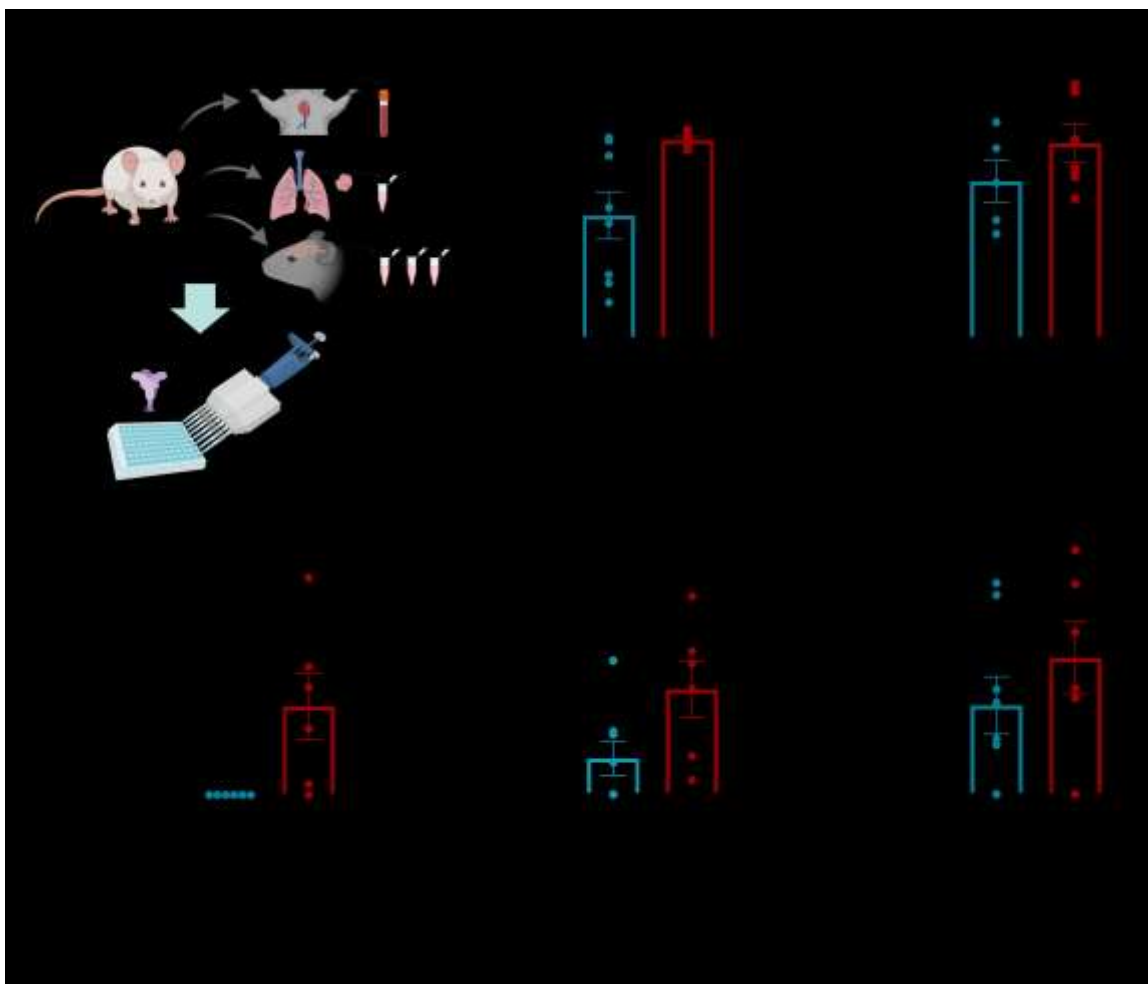
A túlélési arány a 10. napon 41,1% volt, a medián túlélési idő hat nap (*13A ábra*). A testtömeg-változások statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a kontroll (PBS) és a fertőzött egerek között a 3. és 9. nap között (*13B ábra*). Az átlag testtömeg legalacsonyabb értéket a 4. napon mutatott ($83,19 \pm 1,582$ %). A fertőzött egerek állapotromlásának külső jegyei (félíg csukott szem, csapzott szőrzet, gyengeség, mozgáshiány) az 5–8. nap között (*13C ábra*) voltak a legmarkánsabbak.



13. ábra A túlélés és az általános egészségi állapot SARS-CoV-2 MA10 fertőzés után egerekben. A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés magas mortalitást és testsúlycsökkenést okozott a kezelt állatokban. **A:** Túlélési arány; **B:** Relatív testsúlyváltozás; **C:** Az állatok egészségi állapotának értékelése. Az adatok átlag $\pm$ 95% CI (A), átlag $\pm$ SEM (B), illetve átlag (C) formájában kerültek bemutatásra. Kontroll: $n = 6$, SARS-CoV-2 MA10: $n = 30$ (A); kontroll: $n = 6$, SARS-CoV-2 MA10: $n = 10$ (B, C). * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest. A részletes statisztikai elemzéseket lásd az 5. Kiegészítő táblázatban.

6.2.2 A poszt-akut SARS-CoV-2 MA10 fertőzés fokozta a P2X7 receptor expresszióját plazma- és agymintákban

A P2X7 receptor szintjét ELISA-val mértük. A plazmaszint a fertőzést követő 16. napon szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest (*14B ábra*), míg a tüdőszövetben nem volt kimutatható változás (*14C ábra*). Az agyban fokozott P2X7 expressziót észleltünk a prefrontális kéregben (PFC) és a hippocampusban (HIP) (*14D,E ábra*), míg a striatumban (STR) nem történt változás (*14F ábra*).

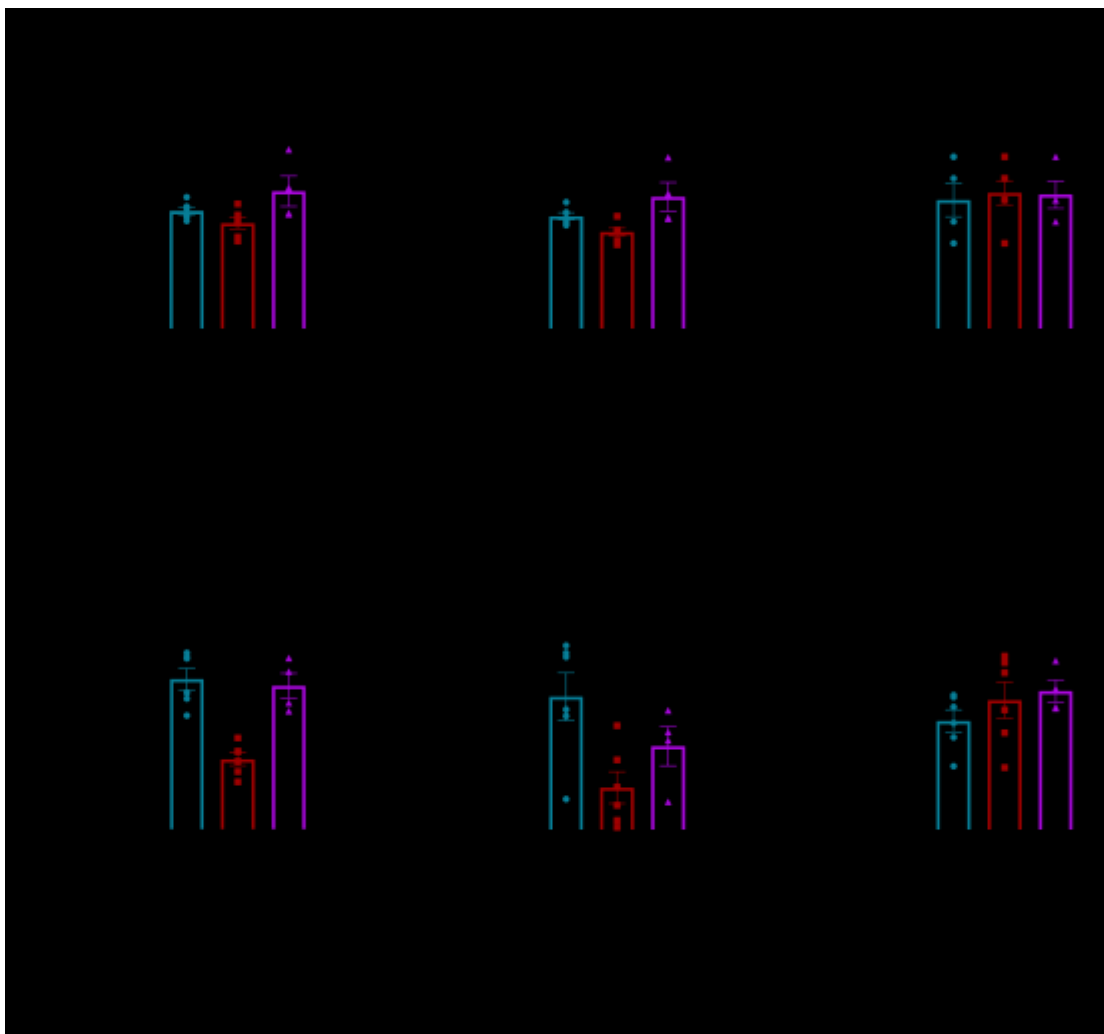


14. ábra P2X7 receptor szintek egér plazmában, tüdő- és agymintákban SARS-CoV-2 MA10 fertőzés után. A plazma P2X7 szintje szignifikánsan emelkedett (B), míg a tüdőmintákban nem volt eltérés (C). A P2X7 expresszió emelkedett a prefrontális kéregben (D) és a hippocampusban (E), de nem változott a striatumban (F). Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában jelennek meg; kontroll: $n = 8$, SARS-CoV-2 MA10: $n = 6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ a kontrollhoz képest. A részletes statisztikai elemzéseket lásd az 5. Kiegészítő táblázatban.

6.2.3 A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés szorongás- és depresszió-szerű viselkedésbeli eltéréseket okozott 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 (15A,B ábra). A rotációk száma nem mutatott eltérést (15C ábra). A fertőzés jelentősen csökkentette az aréna centrumában töltött időt, míg a JNJ kezelés ezt normalizálta (15D

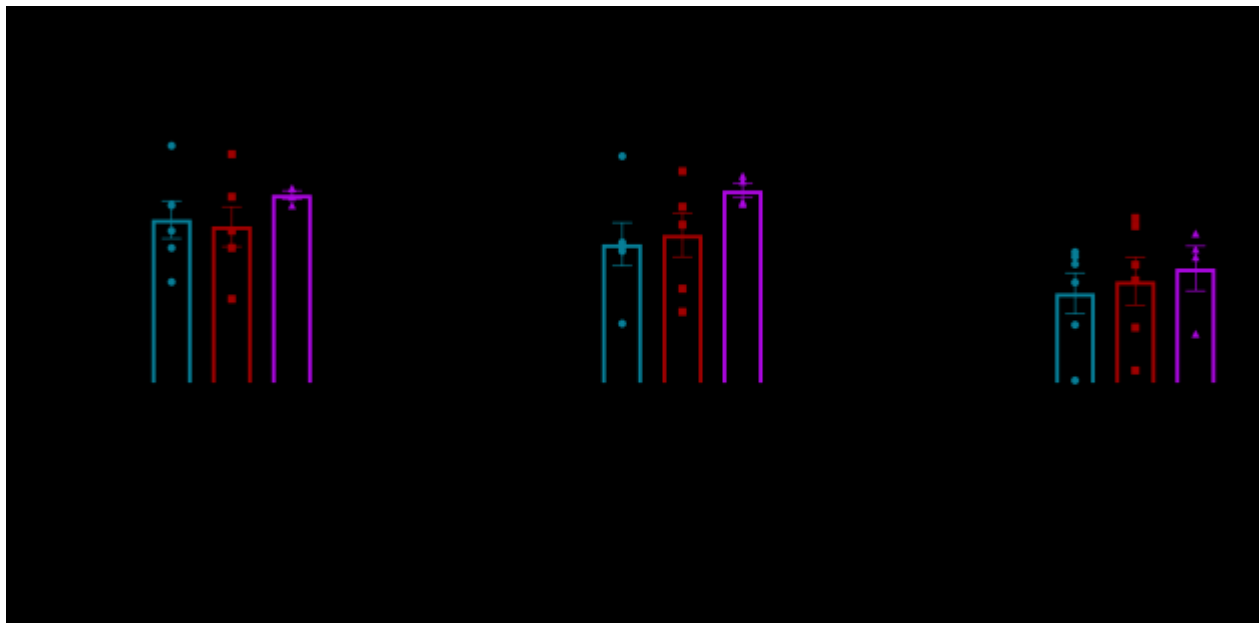
ábra). A splash teszt során a fertőzött egerek mosakodási ideje csökkent, ezt azonban a JNJ kezelés nem befolyásolta (15E ábra). A farokfelfüggesztéses tesztben nem volt kimutatható eltérés (15F ábra).



15. ábra A viselkedés értékelése nyílt tér (open field), splash és farokfelfüggesztéses tesztek során. A JNJ kezelés fokozta az általános mozgásaktivitást a SARS-CoV-2 MA10 csoporthoz képest. A fertőzés szorongásszerű viselkedést eredményezett, amit a centrális zónában töltött idő csökkenése jelzett, melyet a JNJ kezelés visszafordított. **A:** Átlagos sebesség, **B:** Teljes megtett távolság, **C:** Rotációk száma, **D:** A centrumban eltöltött idő, **E:** Splash teszt. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában jelennek meg; kontroll: $n = 6$, SARS-CoV-2 MA10: $n = 6$, SARS-CoV-2 MA10 + JNJ: $n = 4$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ a kontrollhoz képest; +++ $p < 0,001$ a MA10-hoz képest. A részletes statisztikai elemzéseket lásd az 5. Kiegészítő táblázatban.

6.2.4 A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés nem befolyásolta a munkamemóriát

A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés nem okozott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest az alternációk számában (*16A ábra*) és a helyes alternációk arányában (*16B ábra*) a T-labirintus teszt alapján (T-maze), sem a tárgyfelismerési indexben (*16C ábra*) az új tárgy felismerési (NOR) teszt során. A JNJ kezelés sem befolyásolta ezen eredményeket (*16A-C*).

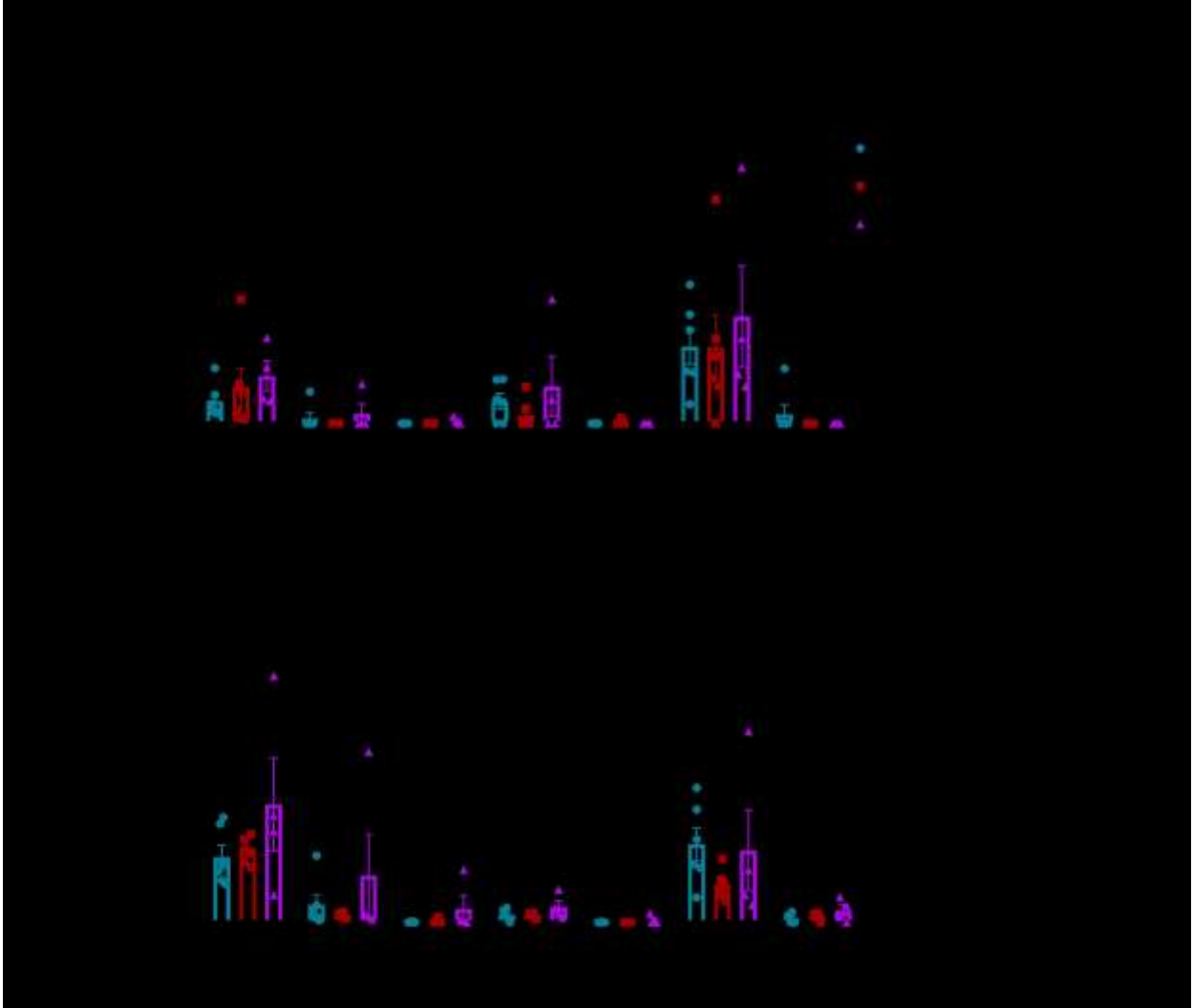


16. ábra A munkamemória vizsgálata SARS-CoV-2 MA10 fertőzés után. A fertőzés nem befolyásolta az állatok munkamemóriáját. A: Alternációk összszáma, B: spontán helyes alternációk száma (T-labirintus teszt); C: Diszkriminációs index az új tárgy felismerési tesztben (NOR). Az adatok átlag ± SEM formájában jelennek meg; kontroll: n = 6, MA10: n = 6, MA10 + JNJ: n = 4. A részletes statisztikai elemzéseket lásd az 5. Kiegészítő táblázatban.

6.2.5 A plazma és tüdő mintákban jelentős citokinszint-elváltozás nem volt detektálható

A fertőzést követően 16 nappal a periférián (plazma, tüdő) és a központi idegrendszerben (PFC, HIP és STR) pro- (IL-1 α , -1 β , -2, -6, IFN- γ , CXCL1 és TNF) és anti-inflammatorikus (IL-4 és -10) szinteket határoztunk meg. A perifériás mintákban az IL-2 és IL-4 szintek nem voltak detektálhatók (*az adatokat nem tüntettük fel*). A plazmában nem történt szignifikáns citokinváltozás (*17A ábra*), míg a tüdőben az IL-1 α szintje emelkedett volt a JNJ kezelt

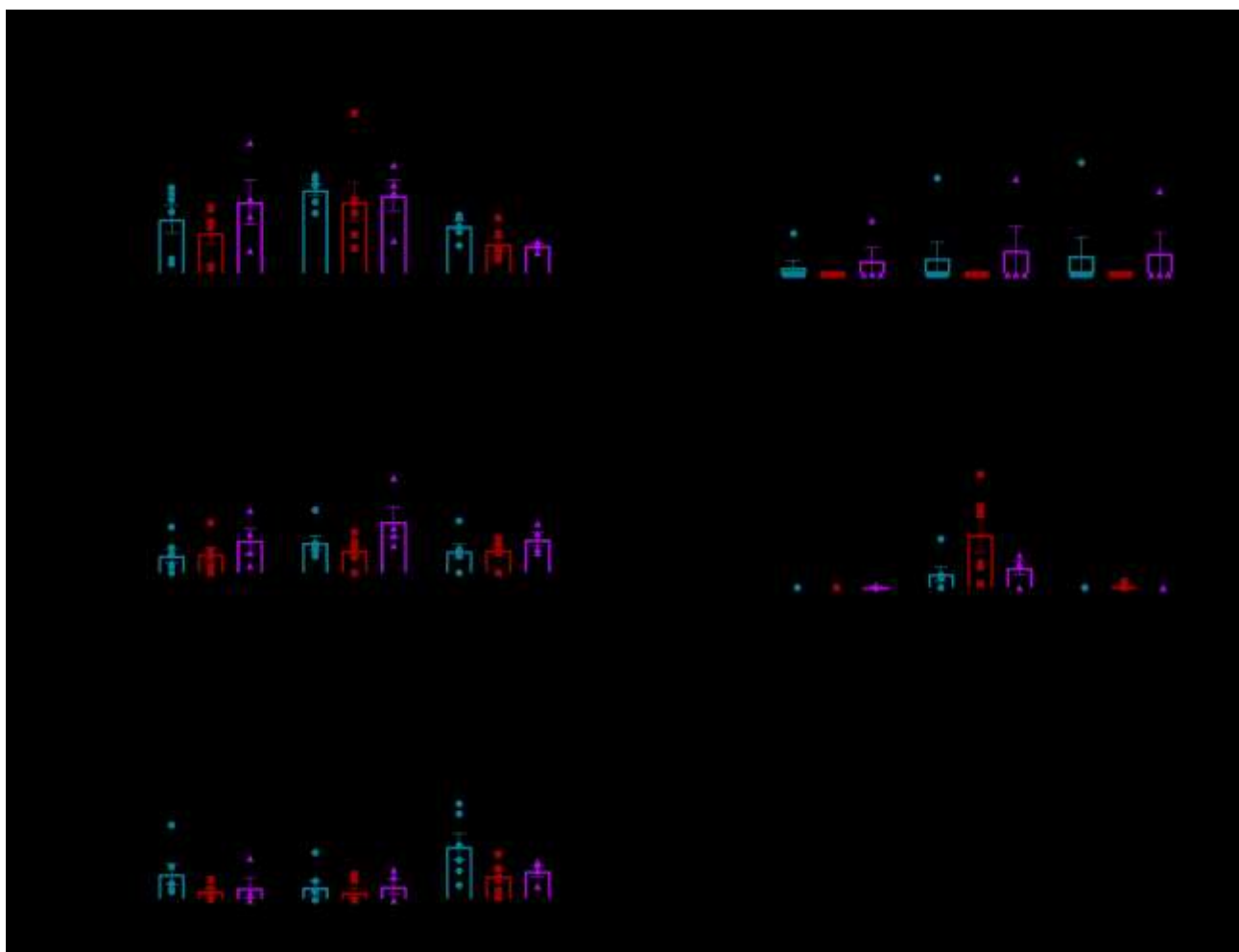
csoportban (17B ábra). Más pro- és antiinflammatorikus citokinek nem mutattak változást (17A-B ábra).



17. ábra Perifériás citokinszintek 16 nappal SARS-CoV-2 MA10 fertőzést követően. Citokinszintek **A:** plazmában, **B:** tüdőben. A vérplazmában nem találtunk szignifikáns eltérést a citokinek szintjében sem a fertőzés, sem a JNJ kezelés hatására. A JNJ kezelés megemelte a tüdő IL-1 α szintjét, egyebekben nem okozott változást, a fertőzéshez hasonlóan. Az adatok átlag $\pm$ SEM formájában jelennek meg; kontroll: n = 6, MA10: n = 6, MA10 + JNJ: n = 4. *p < 0,05 a kontrollhoz képest. A részletes statisztikai elemzéseket lásd az 5. Kiegészítő táblázatban.

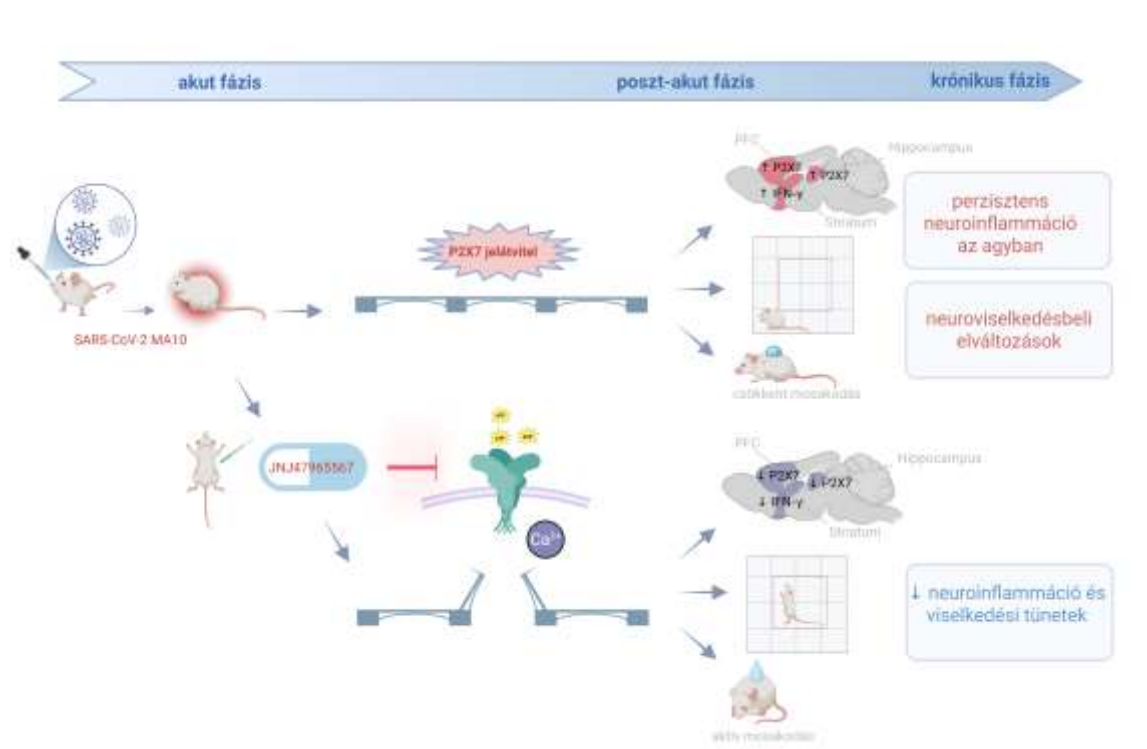
6.2.6 A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés IFN- γ emelkedést okozott a striatumban

A pro-, és antiinflammatorikus citokinek szintjét a központi idegrendszerben a viselkedésselvértések szempontjából releváns területeken is megmértük (prefrontális cortex, hippocampus, striatum). Az IFN- γ szintje emelkedett volt a striatumban a fertőzött csoportban, amelyet a JNJ kezelés kivédett (*18D ábra*). A striatumban az IL-10 szint emelkedett volt a JNJ csoportban (*18C ábra*). A CXCL1 szintje pedig szignifikáns csökkenést mutatott a hippocampusban a fertőzés hatására, míg a JNJ kezelés ezt nem befolyásolta jelentősen (*18E ábra*). Az IL-1 α , és IL-1 β szintjében nem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportok között egyik területen sem (*18A,B ábra*). Az IL-2, IL-4, IL-6 és TNF- α szintje minden csoportban a kimutatási határérték alatt volt ezen időpontban (*az adatokat nem tüntettük fel*).



18. ábra Citokinszintek a központi idegrendszerben 16 nappal SARS-CoV-2 MA10 fertőzés után. Citokinszintek a prefrontális kéreg, a hippocampusz és a striatum szövetmintáiban. A: IL-1 α , B: IL-1 β , C: IL 10, D: IFN- γ , E: CXCL1. Az IFN- γ szintje emelkedett volt a fertőzött állatok striatumában, amely emelkedést a JNJ kezelés kivédett. Ezzel szemben a CXCL1 csökkent a hippocampusban a fertőzés hatására, amelyet a JNJ kezelés nem befolyásolt szignifikánsan. A JNJ kezelés megemelte az IL-10 szintjét a striatumban, míg a fertőzés önmagában nem befolyásolta a kontroll csoportéhoz képest. Az adatok átlag $\pm$ SEM; kontroll: n = 6, MA10: n = 6, MA10 + JNJ: n = 4. *p < 0,05; ***p < 0,001 a kontrollhoz képest; +p < 0,05 a MA10-hoz képest. A részletes statisztikai elemzéseket lásd az 5. Kiegészítő táblázatban.

6.2.7 Összefoglaló grafikus ábra a poszt-akut SARS-CoV-2 MA10-modell főbb viselkedéses és molekuláris eltéréseiről



19. ábra. A SARS-CoV-2 MA10-modell főbb állatkísérletes megfigyeléseinek összefoglalása. Az intranazálisan beadott SARS-CoV-2 MA10 fertőzés akut szakaszát követően az állatokban fokozott P2X7 expresszió alakult ki a prefrontális kéregben és hippocampuszban, valamint IFN- γ szint emelkedés volt kimutatható a striátumban. Mindez szorongásszerű viselkedéssel (csökkent centrumban töltött idő a nyílt tér tesztben) és motivációhiánnyal (csökkent mosakodási idő a “Splash” tesztben) társult. A P2X7 receptor szelektív gátlása (JNJ-47965567) csökkentette a P2X7 és IFN- γ expressziót, és visszafordította ezen viselkedésbeli elváltozásokat.

7 MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmány elsődleges célja a P2X7 aktiválását követő downstream jelátviteli utak azonosítása volt az autizmus spektrum zavar MIA egérmodelljében. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a MIA által kiváltott proinflammatorikus citokin- és kemokinszint-emelkedést az anyai plazmában (IL-1 β , RANTES, MCP-1) és a magzati agyban (IL-1 β , IL-2, IL-6, MCP-1) a P2X7 - NLRP3 útvonal szabályozza ASD egérmodellben. A P2X7 receptor genetikai vagy farmakológiai gátlása az autizmushoz hasonló viselkedésformák és citokinszint-változások hiányát eredményezte fiatal felnőttkorban, ami arra utal, hogy a P2X7 önmagában elegendő és szükséges is az autisztikus jellemzők kialakulásához egerekben a neuronális fejlődés során. Hasonlóképpen, az anyai NLRP3 antagonistával vagy semlegesítő IL-1 β antitesttel történő kezelés a terhesség alatt szintén ellensúlyozta az autisztikus fenotípus kialakulását az utód egerekben. A továbbiakban egy ismételt P2X7-antagonista kezelési protokollt mutattunk be, amely potenciálisan jobban modellezi a humán terápiás alkalmazást. Végül betekintést nyertünk a P2X7 jelátviteli útvonal egyéb, az idegrendszeri gyulladást fenntartó hatásaiba egy egér-COVID-19 modell segítségével, a poszt-COVID szindróma kontextusában. Eredményeink azt sugallják, hogy a P2X7 receptorok aktivációja hozzájárul a poszt-COVID szorongás és depresszió kialakulásához azáltal, hogy fenntartja a neuroinflammációt, így a P2X7-antagonizmus ígéretes terápiás megközelítést jelenthet. Bár a poszt-akut COVID-19 szindróma összetettsége megnehezíti a végleges következtetések levonását, tanulmányunk alátámasztja azt a növekvő bizonyítékot, hogy a P2X7-mediálta gyulladásos útvonalak célzása enyhítheti a SARS-CoV-2 fertőzést követő neurológiai tüneteket.

Az első, MIA-modelt alkalmazó kísérletsorozatban anyai immunaktiváció hatására viselkedésbeli és morfológiai elváltozásokat találtunk a vad típusú, antagonistával nem kezelt állatoknál, úgymint szociális deficit, ásással, mint repetitív tevékenységgel eltöltött idő megnyúlása, a malform szinaptoszómák arányának növekedése, valamint a Purkinje sejtek mennyiségbeli csökkenése a VII. lebenyben. Tekintettel az NLRP3 kulcsszerepére a veleszületett immunválaszban és a P2X7 által közvetített hatásokban, a vemhes anyákat poly(I:C) kezelés előtt MCC950-tel, az NLRP3 szelektív antagonistájával kezeltük. Az anyai

előkezelés gátolta a MIA által kiváltott ASD-fenotípus kialakulását, megakadályozva a poly(I:C) kezelés hatására megjelenő viselkedésbeli és morfológiai eltéréseket, és megerősítette az NLRP3 inflammaszóma szerepét a MIA által indukált válaszban. Ezen eredményeink alátámasztják az NLRP3 inflammaszóma részvételét az utódok MIA-ra adott válaszában. Adatainkat tovább erősíti egy humán vizsgálat, amelyben emelkedett inflammaszóma- és NLRP3-aktivációt figyeltek meg ASD-ben [227]. Az NLRP3 közvetítő szerepet játszhat a bél-agy tengelyen is, a bélmikrobióta összetételének megváltoztatásával proinflammatorikus fenotípus irányába történő eltolódást kiváltva [228, 229]. P2rx7^{-/-} egerekben az anyai poly(I:C) beadása nem befolyásolta az utódok viselkedését, függetlenül az MCC950 jelenlététől, ami arra utal, hogy az NLRP3 aktivációja a P2X7 szabályozása alatt áll. A P2X7 aktiválása ismert módon NLRP3 inflammaszóma aktiválódást és az IL-1 β szekrécióját eredményezi [1, 260], ugyanakkor eredményeink rávilágítanak arra is, hogy az NLRP3 inflammaszóma aktivációja kulcsszerepet játszik a viselkedésbeli és morfológiai eltérések kialakításában MIA hatására, és ez a folyamat P2X7-függő mechanizmusokon keresztül valósul meg. Az MCC950-vel végzett anyai előkezelés megakadályozta ezeket az eltéréseket, ami megerősíti az NLRP3 inflammaszóma szerepét az autizmus spektrum zavarhoz kapcsolódó patofiziológiai folyamatokban, és rávilágít a célzott gátlás potenciális védőhatására.

Mivel eredményeink szerint az NLRP3 kulcsszerepet játszik az utódok MIA-ra adott válaszában, adekvát volt az IL-1 β lehetséges szerepének további vizsgálata. Annak érdekében, hogy feltárjuk az IL-1 β szerepét az ASD-vel kapcsolatos viselkedési eltérések kialakulásában, megvizsgáltuk, hogyan változnak a vad típusú állatok viselkedésbeli eltérései az IL-1 β jelátvitel gátlása esetén. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az anyai poly(I:C) által kiváltott fenotípus nem jelentkezett sem az IL-1 β semlegesítő antitest anyai beadását követően (6B,D ábra), sem az IL-1 β KO állatokban (lásd 1. kiegészítő ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az IL-1 β szükséges az autisztikus jellemzők kialakulásához egerekben, és központi szerepet játszhat a MIA-modell által közvetített neuroimmun folyamatokban. Ezen eredményeket megerősítendő, Arrode-Brusés és Brusés [244] vizsgálataihoz hasonlóan mi is emelkedett IL-1 β szintet találtunk röviddel a MIA indukciója

után az anyai plazmában, valamint 24 órával az injekció beadása után a magzati agyban és a placentában, ami arra utal, hogy a korai anyai citokintermelés késleltetett hatást gyakorol a fejlődő magzati agyra. A vad típussal ellentétben, a poly(I:C) nem növelte szignifikánsan az IL-1 β koncentrációját a P2rx7 génkiütött és JNJ47965567 kezelt egerek anyai plazmájában (8B ábra), azonban egy MIA-t követő emelkedett tendencia megfigyelhető volt. Az anyai plazmában tehát úgy tűnik, hogy az IL-1 β koncentráció növekedése nem, vagy csak részben függ a P2X7 receptortól. Ugyanakkor a placenta- és magzati agymintákban ettől eltérő módon jelentős P2X7-függést figyeltünk meg az IL-1 β koncentrációkban, amely a placentáris gát szerepére utal. Míg a P2X7^{+/+} állatoknál szignifikáns IL-1 β emelkedés volt megfigyelhető mindkét minta típusban, addig mind a génkiütött, mint az antagonista-kezelt csoportokban elmaradt ez az emelkedés, ami arra utal, hogy a poly(I:C) által indukált IL-1 β -termelés P2X7-függő mechanizmus az utódokban. Így feltételezhetünk egy magzati oldalra korlátozódó P2X7-mediált citokinindukációs szerepet. Ez összhangban van az IL-1 β poly(I:C) által indukált viselkedésbeli és morfológiai változások kialakításában betöltött szerepével. Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az IL-1 β a P2X7-mediálta citokinindukción keresztül hozzájárulhat a poly(I:C) által kiváltott neuroinflammációhoz, amely befolyásolja a magzati agy fejlődését. Mivel a P2X7-függő IL-1 β -emelkedés hiánya a génkiütött és antagonista-kezelt csoportokban együtt járt a poly(I:C) által indukált morfológiai és viselkedésbeli eltérések elmaradásával, ez arra utal, hogy az IL-1 β közvetítő szerepet tölthet be a MIA által kiváltott neurofejlődési zavarokban, így hozzájárulhat az autizmus spektrum zavar patomechanizmusához.

Az NLRP3-gátolt anyák plazmájában az IL-1 β megnövekedett mennyisége volt kimutatható (9B ábra), hasonlóan a sóoldattal előkezelt poly(I:C) csoporthoz. Ez arra utal, hogy az anyai immunaktiváció által indukált korai IL-1 β -termelés az anyai plazmában NLRP3-független mechanizmus által történik. Ezen túlmenően azt találtuk, hogy az NLRP3 antagonizmus önállóan elegendő volt az IL-1 β citokin emelkedésének megakadályozásához a magzati agyban és a placentában, ami megerősíti hipotézisünket, miszerint az NLRP3 fehérje szerepet játszik a P2X7 által kiváltott folyamatok közvetítésében. Az emelkedését az anyai plazmával ellentétben tehát az MCC950-kezelt csoportokban nem volt IL-1 β -emelkedés a magzati

agyan és a placentában (*9C,D ábra*), szemben a kontrollcsoportokkal, ami megintcsak a placenta gát funkcióját hangsúlyozza és arra utal, hogy az anyai IL-1 β nem jut át nagy mennyiségben a placenta gáton. Girard és Sebire eredményei szerint még az anyai immunrendszer LPS általi aktiválása esetén is csupán elhanyagolható mennyiségű anyai eredetű IL-1 β jut át a placentán [230]. Ennek alapján feltételezzük, hogy a placentában és a magzati agyan megfigyelt IL-1 β szint emelkedés elsősorban helyileg, a placenta vagy a magzati oldalon zajló P2X7-NLRP3 jelátviteli folyamatok révén alakulhatott ki, minimális anyai IL-1 β átjutása mellett. Mivel ismert, hogy a placenta jelentős mennyiségű TLR3-at tartalmaz [231, 232], valószínű, hogy a lokálisan generált gyulladásos jel indukálja a citokintermelést. Eredményeink arra is következtetnek, hogy míg az anyai plazmában NLRP3-független mechanizmusokon keresztül indukálódik az IL-1 β , addig a magzati agy lokális IL-1 β szint emelkedésében és az ezzel járó magzati agyi abnormalitások kiakaulásában meghatározó tényező az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása.

Számos tanulmány kimutatta, hogy az fokozott anyai immunaktiváció emelkedett gyulladásos citokin [233, 234] és kemokin szintekhez vezet [235, 236]. Korábbi tanulmányok alapján a P2X7 ko-stimulátorként működik az endotoxin által kiváltott primer stimulus mellett, elősegítve a poszttranszlációs feldolgozást és az azt követő citokin-felszabadulást [3]. Következésképpen feltételezhető, hogy a MIA-modellben az utódválasz P2X7-hez kapcsolódó szabályozását a keringő vagy helyi citokinek is befolyásolhatják. Hogy részletesebb, időfüggő betekintést nyerjünk a MIA által kiváltott citokinválaszba, a poly(I:C) adását követően különböző időpontokban anyai plazma-, placenta- és magzati agymintákat gyűjtöttünk (*10 ábra*). Számos tanulmány foglalkozik a pro- és anti-inflammatorikus citokinek szintjével az emberekben, amelyek szerepet játszhatnak az ASD patofiziológiai mechanizmusában [237]. Az autizmussal élő személyekre jellemző az emelkedett IL-6 szint [238-240]. Egérmodellekben az anyai szérumban indukált IL-6 képes átjutni a placentán [241], és változásokat idézhet elő mind a placenta fiziológiájában, mind a magzati agyan [242, 243]. Kísérleteink során a poly(I:C) kezelést követően 6 órával jelentős pro-inflammatorikus IL-6 indukciót figyeltünk meg az anyai vérben (*10B ábra*), amelynek szintje ezt követően fokozatosan csökkent. Míg korábbi tanulmányunkban az IL-6 szintjének két

órával az injekció beadása utáni emelkedése P2X7-függőnek bizonyult [180], addig jelen kísérleteink alapján a 6. órára egy másik, P2X7-független mechanizmus volt felelős a megnövekedett IL-6 koncentrációért mind a P2X7^{+/+}, mind a P2rx7^{-/-} állatokban. Számos, egymással összefüggő jelátviteli útvonal is hozzájárulhat az IL-6 fokozott expressziójához, beleértve az IL-1 β , TLR3, TLR4 és TNFR1 által közvetített folyamatokat, például a TAK-1-IKK-NF κ B vagy a TAK-1-MKK-p38-AP-1 jelátviteli kaszkádokat [244, 245]. Lehetséges, hogy a citokinek kölcsönhatásai aktiválták az IL-6 expressziót egy későbbi, P2X7-független mechanizmus révén. Ezt a folyamatot például a TNF α -TNFR1 interakció vagy az MCP-1 indukálhatta, amely elősegíti a makrofágok pro-inflammatorikus citokintermelését [246-248]. A RANTES (CCL5) és az MCP-1 (CCL2) kemotaktikus citokinek, amelyek kulcsszerepet játszanak a leukociták gyulladásos helyekre történő toborzásában. Kísérleteink során mind az MCP-1, mind a RANTES koncentrációjának csúcspontját 6 órával a poly(I:C) kezelés után figyeltük meg az anyai plazmában (*10E,F ábra*), amely ezt követően fokozatosan csökkent, és 48 órára alacsonyabb szintre visszasüllyedt. A P2rx7^{+/+} mintákban a poly(I:C)-indukált plazma RANTES-koncentráció jelentős emelkedése, míg a P2rx7^{-/-} mintákban ennek szignifikánsan alacsonyabb növekedése arra utal, hogy a citokinválasz részben genotípusfüggő mechanizmusokhoz köthető. Bár a RANTES szintje P2X7 hiányában is megemelkedett a plazmában, az átlagos koncentrációk feleakkorák voltak, mint P2X7 jelenlétében, ami arra utal, hogy a receptor fontos szerepet játszhat a teljes RANTES-válasz kialakulásában immunaktiváció hatására. A P2X7 receptorok a plazma MCP-1 szintjének indukciójában is szerepet játszanak, különösen 24 órával a poly(I:C) kezelés után, de nem 6 órával azt követően. Ez arra utal, hogy P2X7 hiányában az MCP-1 indukciója gyorsabban lecsenghet, így a P2X7 a hosszabbtávú MCP-1 emelkedés fenntartásában játszhat szerepet. A G-CSF a neuronok és a neurális őssejtek növekedési faktoraként ismert, serkenti a neurogenezist [249], védő szerepet játszik idegsérülés esetén és anti-apoptotikus hatással rendelkezik [250]. Kísérleteinkben az anyai plazma G-CSF-koncentrációjának szignifikáns emelkedését figyeltük meg a MIA-t követő 6 órában, amely a P2rx7^{+/+} mintákban 48 órára fokozatosan csökkent. Ezzel szemben a P2rx7^{-/-} csoportban a G-CSF szintje továbbra is magas maradt, ami arra utalhat, hogy P2X7 hiányában a poly(I:C)

kompenzációs G-CSF-választ váltott ki, mely részben helyettesíthette a P2X7 által közvetített mechanizmusokat.

Magzati agymintákban az IL-1 β koncentrációja 24 órával, míg az IL-2, IL-6 és MCP-1 (CCL2) szintje 48 órával a poly(I:C) injekciót követően P2X7-függő növekedést mutatott (11. ábra), bár az MCP-1 esetében a P2rx7^{-/-} állapot önmagában magasabb citokinkoncentrációkat eredményezett. Míg az anyai plazmában több jelátviteli útvonal is hozzájárulhat az IL-6 szintjének emelkedéséhez, a magzati agyban egy specifikus, P2X7-függő mechanizmus feltételezhető. Eredményeink arra utalnak, hogy a P2X7 receptor jelentős szerepet játszik a citokinszintek magzati agyi változásaiban és az általános immunaktivált állapot neuroinflammációs elváltozásainak közvetítésében, amelyek összefüggésbe hozhatók a megfigyelt viselkedési és morfológiai rendellenességekkel. Érdekes módon, a plazmaszintjével ellentétben a magzati agyban a RANTES koncentrációja nem emelkedett a MIA hatására P2X7 jelenlétében, míg annak hiányában növekedést mutatott. Így elképzelhető, hogy ez a növekedés egy kompenzációs reakció volt, amely a P2X7 által közvetített folyamatok valamelyikét helyettesítette. További kutatásokra van szükség a különböző gyulladásos mediátorok pontos és időfüggő kölcsönhatásának feltárására a magzati agyban, valamint e mediátorok szerepének azonosítására az utódok agyfejlődésében, érési folyamataiban és az azt követő viselkedésbeli változásokban. Eredményeink azt sugallják, hogy a P2X7 receptor kulcsszerepet játszik a MIA által kiváltott citokinválasz időbeli dinamikájában, különösen a magzati agyban kialakuló neuroinflammáció szabályozásában. A P2X7-függő IL-1 β , IL-6 és MCP-1 szintemelkedés összefüggésbe hozható a magzati agy fejlődésére gyakorolt hosszútávú hatásokkal, amelyek befolyásolhatják az érési folyamatokat és hozzájárulhatnak a viselkedésbeli és morfológiai eltérések kialakulásához. A RANTES eltérő expressziós mintázata P2X7 hiányában pedig arra utalhat, hogy egyes gyulladásos mechanizmusok kompenzációs válasz révén módosulhatnak. Összességében eredményeink hangsúlyozzák a P2X7 receptor szerepét az anyai immunaktiváció által kiváltott gyulladásos folyamatok finomhangolásában, ami új megközelítéseket nyithat a neurofejlődési zavarok hátterének megértésében.

További célunk volt az ismételt P2X7-antagonista kezelés hatásainak vizsgálata, ezáltal a P2X7 receptor terápiás célpontként való megerősítése. JNJ47965567 egy nagy affinitású, szelektív, a vér-agy gáton átjutó P2X7-antagonista [251], amely hatékonyan bizonyult különböző pszichiátriai zavarok, például depresszió [252] és skizofrénia [253] állatmodelljeiben is. Depresszió vonatkozásában human klinikai vizsgálatokat is végeztek. Egy vizsgálat megállapította, hogy míg a P2X7-receptor antagonistája JNJ-54175446 hatékonyan csökkentette a gyulladásos IL-1 β felszabadulást és jól tolerálható volt, nem javította jelentősen az általános depressziós tüneteket, bár modulálta a teljes alvás megvonás akut antidepresszáns-szerű hatásait az anhedónia csökkenésének tompításával [254]. Egy in vitro humán tanulmány pedig kimutatta, hogy a JNJ-47965567-vel történő kezelés hatékonyan csökkentette depressziós betegek monocitáiban a P2X7-által közvetített calcium-szabályozási zavarokat és kaspáz-1 aktivációt [255]. Míg ezen humán vizsgálatok alapján a JNJ-54175446 hatékonyan csökkenti a gyulladást, pozitív hatással bír egyes depressziós-jellegű eltérésekre és modulálja az antidepresszánsok hatását depresszióban, addig nem végeztek még humán vizsgálatokat az autizmusban betöltött potenciáljának feltárására. A MIA egérmodellt alkalmazó harmadik kísérletsorozatban a JNJ47965567 alacsony dózissal, ismételt adagolással nagyrészt kivédte az autizmus-szerű fenotípust a poly(I:C)-kezelt anyák utódaiban (12. ábra), megerősítve korábbi, egyszeri nagy dózissal protokollunk eredményeit, amely jobban tükröz egy lehetséges humán kezelési rendszert. Érdekes, hogy ebben a sorozatban nem figyeltünk meg a korábbi, egyszeri kezelésnél látott szenzomotoros koordinációs zavart és Purkinje-sejtvesztést (6E,H ábra), amit a poly(I:C) batch-ek közötti immunogenitási különbségek vagy az injekciós protokoll (naponta öt egymást követő napon) zavaró hatása is magyarázhat. Eredményeink összhangban állnak más vizsgálatokkal is, amelyekben a nem szelektív P2-antagonista suramin szintén hatékonyan bizonyult human és állatkísérletekben egyaránt [256, 257]. Mindezek alapján a JNJ47965567-hez hasonló, centrálisan ható P2X7-antagonisták ígéretes farmakológiai eszközök lehetnek az ASD kezelésében. Ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek a hatásosság hosszú távú fenntartásának értékeléséhez és a terápiás potenciál pontos meghatározásához.

Munkánk során a P2X7-jelátvitel neuroinflammációs folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata nemcsak az ASD, hanem egy posztinfekciós, SARS-CoV-2 MA10 egérmodellen végzett kiegészítő kísérlet révén is alátámasztást nyert. Bár a poszt-akut COVID-19 szindróma modellje csak kiegészítő jellegű volt disszertációmban, eredményeink új megvilágításba helyezték a P2X7-mediált neuroinflammáció jelentőségét a vírusfertőzésekhez társuló perzisztáló viselkedési zavarok kialakításában. Az eredeti humán SARS-CoV-2 vírus nem fertőzi a vad típusú egereket, azonban a MA10 törzs kifejlesztése [258] lehetővé tette a posztakut COVID-hoz hasonló viselkedéses eltérések vizsgálatát egérmodellben is. A vizsgálatban megfigyelt testtömegcsökkenés és egészségi állapotromlás a SARS-CoV-2 fertőzést követő napokon a betegség akut szakaszára utalt (*13. ábra*), amely megfelelt más MA10 modellekkel végzett vizsgálatoknak [212, 258].

A SARS-CoV-2 MA10 fertőzés során kimutattuk, hogy a fertőzést követő poszt-akut fázisban a P2X7 receptor expressziója szignifikánsan fokozódott az állatok plazmájában, prefrontális kérgében és hippocampusában, de nem változott a tüdőben vagy a striátumban (*14. ábra*). Ez arra utal, hogy míg a pulmonáris gyulladás az infekciót követően lecsenghetett, a központi idegrendszer egyes területein perzisztáló P2X7-aktiváció alakulhat ki. Ismert, hogy a SARS-CoV-2 átjut a vér-agy gáton és az általa okozott neuroinvázió a vér-agy gát működési zavarait okozhatja, ami potenciálisan elősegíti a COVID utáni szorongásért és depresszióért felelős neuroinflammatorikus folyamatokat [259]. Szintén ismert, hogy a fertőzés akut szakaszában meghatározó a P2X7 és NLRP3 emelkedése fertőzött makrofágokban [90] és a szolubilis P2X7-szint emelkedés humán plazmában, melynek mértéke összefüggést mutat a lefolyás súlyosságával [109]. Ugyanakkor a poszt-akut fázisban elsőként mutattunk ki P2X7-szintemelkedést vérplazmában és specifikus agyterületeken, jelezve annak lehetséges szerepét a tartós neuropszichiátriai tünetek kialakulásában – azonban ennek pontos mechanizmusai további vizsgálatokat igényelnek.

A viselkedésteszteket a fertőzés akut fázisának lezajlása után, a 11. naptól kezdve végeztük, összhangban az irodalmi adatokkal, amelyek szerint a szorongás- és depresszió-szerű tünetek kb. két héttel a SARS-CoV-2 fertőzést követően jelennek meg állatmodellekben [214, 260]. A fertőzött egerek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek az open field aréna középső

területén, mely szorongásra utal, valamint csökkent a mosakodással töltött idő a “splash” teszt során, ami pedig motivációcsökkenésre utal (*15D,E ábra*). Ugyanakkor a farokfelfüggesztéses teszt nem mutatott jelentős változást (*15F ábra*). A kognitív teljesítményre (T-maze, NOR) nem gyakorolt szignifikáns hatást sem a fertőzés, sem az antagonistá kezelés (*16. ábra*), ami megfelel más irodalmi adatoknak, miszerint a fertőzést követően nem minden esetben figyelhető meg kognitív tünet, vagy memóriazavar [261, 262]. Fontos szem előtt tartani az állatmodellek viselkedési tesztjeinek korlátait: például a faroklógatás teszt mozdulatlanlansági ideje nem feltétlenül tükrözi az emberi depresszió komplexitását. A különbségek hiánya pedig nem zárja ki finomabb eltérések jelenlétét sem, ami különösen érdekes a SARS-CoV-2 okozta kognitív károsodásokról szóló korábbi egérvizsgálatok fényében [213, 214]. Ez az eltérés hangsúlyozza a különböző vizsgálatokban megfigyelt eredmények változatosságát, ami a kísérleti tervezés eltéréseiből eredhet, például a vírustörzs, az egérmodell vagy az értékelési időpontok eltéréseiből [263]. Az ilyen módszertani variabilitás gyakori kihívás a preklinikai kutatásban, és különösen nyilvánvaló a COVID-19 kutatás gyorsan fejlődő területén, ahol a szabványosított protokollok még mindig fejlesztés alatt állnak [264].

A citokinprofil vizsgálata során nem találtunk szisztémásan emelkedett proinflammatorikus citokinszinteket a vérplazma és tüdőmintákban a fertőzést követő 16. napon (*17. ábra*), ami arra utal, hogy a vizsgált időpontban nem akut, hanem perzisztáló, lokális gyulladás állhat fenn. Ugyanakkor az IFN- γ szintje szignifikánsan emelkedett volt a striátumban, amit a JNJ47965567 kezeléssel normalizálni tudtunk (*18D ábra*). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a P2X7 receptor aktivációja feltehetően az IFN- γ szint emelkedésén keresztül járulhat hozzá a neuroinflammáció fennmaradásához. Az IFN- γ szintjének emelkedése a striátumban – más gyulladásos citokinek (pl. IL-6, IL-1 β , IL-2) szintjének változása nélkül – egy olyan lokális gyulladásos folyamat jelenlétére utalhat, amely eltér az akut gyulladás klasszikus mintázatától, és potenciálisan a SARS-CoV-2 fertőzés utáni perzisztáló immunaktivációhoz kapcsolódik [213, 265]. Mukherjee és mtsai (2024) hasonló IFN- γ emelkedést figyeltek meg *Citrobacter rodentium* fertőzést követően egerek striátumában, amely hozzájárult a vér-agy gát károsodásához és a gliaaktivációhoz – olyan patofiziológiai folyamatokhoz, amelyek a

vírusos encephalitis és más gyulladásos agyi kórképek hátterében is állhatnak [266]. Eredményeink ezzel összhangban azt sugallják, hogy a striátumban megfigyelt IFN- γ emelkedés a posztakut SARS-CoV-2 fertőzést követően egy régióspecifikus, P2X7-mediált gyulladásos választ tükrözhet, amely a motoros és jutalmazó funkciók szabályozásában részt vevő agyterületeket érintve hozzájárulhat a megfigyelt szorongás- és depresszió-jellegű viselkedés kialakulásához [267]. Ruiz-Rodríguez és mtsai (2020) rámutattak arra is, hogy a P2X7 receptor expresszióváltozásai befolyásolhatják a CD8⁺ T sejtek differenciálódását és az IFN- γ termelését, ami tovább erősíti a P2X7–IFN- γ tengely jelentőségét az adaptív immunválasz szabályozásában [268]. A JNJ47965567 kezelés során megfigyelt IFN- γ csökkenés, valamint a párhuzamosan észlelt szorongásos viselkedés mérséklődése alátámasztja, hogy a P2X7 receptor gátlása képes lehet modulálni az idegrendszeri gyulladást és annak viselkedéses következményeit.

Vizsgálatunkban a P2X7 receptor gátlása az antiinflammatorikus citokinszintek eltolódását is eredményezte a striátumban: az IL-10 szintje szignifikánsan megnőtt a SARS-CoV-2 + JNJ csoportban a kezeletlen fertőzött állatokhoz képest (*18C ábra*), miközben az IFN- γ szintje egyidejűleg csökkent (*18D ábra*). Az IFN- γ ismerten képes gátolni az IL-10 termelését makrofágokban, többek között a MAPK jelátviteli útvonal blokkolásával, valamint a GSK3-aktiváció révén, amely a CREB és AP-1 transzkripciós faktorokon keresztül visszafogja az IL-10 expresszióját, különösen TLR2 aktiváció során [269, 270]. A striátumban megfigyelt fordított irányú citokinszintek – csökkent IFN- γ és emelkedett IL-10 – arra utalhatnak tehát, hogy a P2X7 gátlása révén megszűnhet az IFN- γ által közvetített IL-10-szuppresszió. Bár az IL-10-ről is leírták, hogy gátolhatja az IFN- γ expresszióját makrofágokban [271], ez az irány kevésbé feltárt a központi idegrendszer kontextusában. Eredményeink azt sugallják, hogy az IL-10 és az IFN- γ egy dinamikus szabályozási hurkot alkothatnak, és a P2X7 jelátvitel ennek a kölcsönhatásnak az egyik kulcsszabályozója lehet posztakut neuroinflammáció során. Ez megerősíti azt a hipotézist, hogy a P2X7 receptor célzása helyreállíthatja az immunhomeosztázist, és enyhítheti a PASC alapját képező neuroinflammatorikus folyamatokat.

A CXCL1 csökkent szintje a hippocampusban (*18E ábra*) szintén a tartós neuroimmun aktivációra utalhat, mivel hosszan fennálló gyulladás esetén a proinflammatorikus CXCL1-termelés csökkenése a mediátorok negatív visszacsatolásának vagy a kemokinrendszer kimerülésének következménye lehet, ami az immunválasz adaptív módosulását tükrözheti. Érdekes módon a tüdőmintákban egyedül az IL-1 α szintje mutatott szignifikáns emelkedést a SARS-CoV-2 fertőzött, JNJ47965567-el kezelt állatokban a kontrollhoz képest (*17B ábra*). Ez a megfigyelés több lehetséges mechanizmust vet fel. Egyrészt az IL-1 α nem feltétlenül P2X7/IL-1 β –függő módon indukálódik, és lehetséges, hogy más gyulladásos utak (pl. TLR-aktiváció, DAMP/PAMP jelátvitel) révén kompenzatorikusan aktiválódott, a P2X7-NLRP3 útvonal blokkolásának hatására [272]. Bár az állatok túljutottak az akut fázison, a tüdő nyálkahártyájában perzisztálhatnak virális antigének vagy DAMP-ok, melyek nem elégségesek már egy széles körű gyulladásához, de lokálisan fenntartják az IL-1 α szintjét, különösen epitélisejtekből vagy nem-klasszikus immunsejtekből felszabadulva. Az IL-1 α nem csak gyulladásos, hanem reparatív szerepet is betölthet, különösen epitélisejtek vagy fibroblasztok által termelve, így az emelkedett IL-1 α szint akár a tüdő regenerációs folyamatait is jelezheti [272, 273].

Mindezek alapján a COVID-19 modellszinten történő alkalmazása, habár nem közvetlenül kapcsolódik az autizmus spektrum zavarokhoz, alátámasztja azt a hipotézist, miszerint a P2X7 receptor aktivációja – különböző patológiás kontextusokban – közös mechanisztikus láncszem lehet a különböző infekciós és immunaktivációs hatásoknak a gyulladásos eredetű viselkedésváltozások kialakulásában és perzisztenciájában. A P2X7 mediálta neuroinflammáció így nemcsak neurodevelopmentális zavarok alatti, hanem késői posztinfekciós állapotok esetén is releváns célpont lehet. Vizsgálataink azt sugallják, hogy a P2X7 útvonal központi szerepet játszik mind a fejlődési időszakban fellépő immunstimuláció, mind a felnőttkori vírusfertőzés által kiváltott gyulladásos válasz szabályozásában.

Jelen disszertációban bemutatott eredményeink – valamint saját, korábban publikált összefoglaló tanulmányunk, amely a P2X7 receptor korai életstressz által kiváltott depresszióhoz és szorongáshoz való hozzájárulását tárgyalja [60] – összhangban állnak az

autizmus spektrum zavarban és más kórképekben, például a skizofréniában [69] megfigyelt P2X7-mediálta neuroimmun mechanizmusokkal. Mindez egy eddig kevésbé feltárt, de lehetséges közös mechanizmusra utal, **melyben a P2X7 univerzális és konvergens szereplő lehet a különböző időbeli és patológiai kontextusokban fellépő neuroinflammáció által közvetített pszichiátriai zavarok kialakulásában.** Ez a konvergencia alátámasztja a P2X7 receptor ígéretes terápiás célpontként való kezelését a gyulladás által mediált neuropszichiátriai zavarok széles spektrumában.

8 KÖVETKEZTETÉSEK

8.1 A kutatás célja és újdonsága

Kutatásaink célja volt, hogy új megvilágításba helyezzük a P2X7 receptor által közvetített jelátviteli útvonal szerepét a neuroinflammáció kialakulásában és annak önfenntartó mechanizmusaira, különös tekintettel az anyai immunaktiváció (MIA) és a SARS-CoV-2 fertőzést követő neuropszichiátriai tünetek összefüggéseire. Vizsgálataink során arra fókuszáltunk, hogy a P2X7 receptor aktivációja miként járulhat hozzá a gyulladásos kaszkád tartós fennmaradásához az idegrendszerben, és ez milyen szerepet játszhat az ASD és a COVID-19 utáni neurológiai zavarok kialakulásában. Munkánk célja volt továbbá ezen patomechanizmusok mélyebb megértése, és ezáltal új, potenciális farmakológiai célpontok azonosítása – különösen a P2X7-jelátvitel terén.

8.1.1 A P2X7–NLRP3–IL-1 β tengely szerepe az ASD kialakulásában

Eredményeink elsődlegesen azt mutatták, hogy a P2X7 receptor aktiválása közvetlenül aktiválja a NLRP3 inflammaszómát, amely kulcsszerepet játszik a neuroinflammációs válaszokban MIA egérmodellben. Jelen munkánk újdonsága, hogy az anyai immunaktiváció során a P2X7 és a NLRP3 közötti közvetlen mechanizmusokat világítunk meg, és ezen interakciók szerepét az ASD-szerű viselkedési zavarokban is alátámasztjuk. Az IL-1 β szintjének csökkentése révén sikerült megelőzni az ASD-szerű viselkedési eltéréseket. Irodalmi adatok alapján az IL-1 β aktiválódása és jelentős szerepe az idegrendszeri fejlődési zavarokban már korábban is ismert volt, mi azzal járultunk hozzá a tudományos diskurzushoz, hogy feltártuk a P2X7 és IL-1 β közötti kapcsolatot és ennek a kóroki szerepét bizonyítottuk az egyes agyi morfológiai és viselkedésbeli elváltozásokban MIA egérmodellben.

8.1.2 Az anyai citokinprofil és a placentáris szerep új megközelítése

A kutatás során megfigyeltük a P2X7 citokinindukciós hatását az anyai plazmában, a placentában és a magzati agyban is. Az anyai immunválaszok szabályozásában a placenta szerepét ugyan már korábban is vizsgálták, azonban a mi munkánk azzal járult hozzá az irodalomhoz, hogy azonosította a P2X7-függő és P2X7-független citokin- és

kemokininindukciós mechanizmusokat az anyai oldalon összevetve a magzati oldallal. Az eredmények új megvilágításba helyezik a placenta szerepét a P2X7-NLRP3-IL-1 β mediálta neuroinflammációs folyamatokban, ezáltal hozzájárulva az idegrendszeri fejlődési zavarok mechanizmusának jobb megértéséhez. Kutatásaink során azt találtuk, hogy a P2X7 nemcsak az IL-1 β , hanem más citokinek, például IL-6, IL-2, MCP-1 és RANTES termelését is szabályozza. Ez az új felfedezés szélesíti a neuroinflammációs mechanizmusok megértését, és segít abban, hogy pontosabban meghatározzuk a P2X7 szerepét a különböző citokinek szabályozásában.

8.1.3 A P2X7/NLRP3/IL-1 β mint új terápiás célpont

Kutatásunk egyik legfontosabb újdonsága, hogy mind a P2X7, mind az NLRP3 és IL-1 β gátlását potenciális terápiás lehetőségként azonosítottuk az ASD kialakulásának megelőzésében. Bár a P2X7 antagonisták alkalmazása már korábban is felvetődött különböző neuropszichiátriai betegségeknél, mi most a P2X7 gátlásának konkrét hatásait mutattuk be az ASD-szerű viselkedési zavarok megelőzésében, ezzel új alapot adva a terápiás alkalmazások kutatásához.

8.1.4 A P2X7 receptor szerepe a SARS-CoV-2 fertőzést követő neuroinflammációban

A COVID-19 egérmodellben megfigyeltük, hogy a fertőzést követő neuroinflammáció és viselkedésbeli eltérések szintén P2X7-függőek. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a P2X7 receptor nemcsak a fejlődési időszakban jelentkező immunstimuláció esetén, hanem a felnőttkori vírusfertőzésekhez kapcsolódó neurológiai zavarokban is meghatározó szerepet játszhat.

8.1.5 A P2X7 receptor gátlásának terápiás potenciálja COVID-19 utáni neurológiai zavarokban

Eredményeink alapján a P2X7 receptor gátlása csökkenti a SARS-CoV-2 fertőzést követő neuroinflammációt és viselkedésváltozásokat. Ez arra utal, hogy a P2X7 célzott modulálása a jövőben nemcsak terápiás szempontból, hanem a neuroimmunológiai viselkedéses zavarok rendszerszintű újraértelmezése szempontjából is jelentős lehet.

8.2 Jövőbeli irányok

A P2X7-NLRP3-IL-1 β kapcsolat és ezen útvonal célzott modulálása ígéretes terápiás megközelítést kínálhat különböző neuroinflammációval összefüggő pszichiátriai kórképek kezelésében. A jövőbeli kutatásoknak érdemes lenne feltárniuk, hogy a P2X7 receptor gátlása miként befolyásolhatja a neuroimmunológiai folyamatokat, valamint hogyan járulhat hozzá a viselkedéses tünetek enyhítéséhez. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a P2X7 receptor, az NLRP3 inflammaszóma és az IL-1 β fiziológiás körülmények között is szerepet játszanak a normális agyfejlődésben és sejtes működésben. Ennek megfelelően a célzott gátlásuk terápiás kontextusban csak akkor lehet indokolt, ha ezek a mechanizmusok kórosan túlműködnek -fokozott immunaktiváció során. Következésképpen a jövőbeli farmakológiai beavatkozásoknak nem a teljes gátlásra, hanem a homeosztatikus szint helyreállítására kell törekedniük. Az optimális terápia célja nem a gyulladásos válasz megszüntetése, hanem annak finomhangolása olyan mértékben, hogy a neuroinflammációs válasz ne váljon károssá az idegrendszer fejlődése vagy működése szempontjából. Ez különösen fontos annak fényében, hogy – amint azt a bevezetőben részletesen tárgyaltuk – a P2X7 receptor a normál idegrendszeri fejlődés, a szinaptikus plaszticitás és a posztnatális neurogenesis egyik szabályozója is, így fiziológiás funkcióinak megőrzése terápiás célzás esetén is alapvető követelmény.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

A neuropszichiátriai zavarok hátterében meghúzódó gyulladásos folyamatok feltérképezése napjaink kutatásainak egyik központi kérdése, különösen olyan komplex kórképek esetén, mint az autizmus spektrum zavar vagy a SARS-CoV-2 fertőzést követő neuropszichiátriai tünetegyüttes. Az elmúlt évek során egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az immunrendszer és az idegrendszer közötti kommunikáció zavara hosszútávon is maradandó funkcionális és viselkedésbeli következményekkel járhat. A purinerg P2X7 receptor, amely egyszerre érzékeli a sejtkárosodást és aktiválja a gyulladásos kaszkádokat, különleges pozíciót foglal el ezen interakciós tengelyben, mégis viszonylag kevés figyelmet kapott az idegrendszeri fejlődési zavarok vagy a fertőzést követő hosszútávú idegrendszeri tünetek vonatkozásában.

A disszertációhoz kapcsolódó kutatásaink során e kevésbé feltárt kapcsolatrendszer pontosabb megértéséhez kívántunk hozzájárulni: kimutattuk, hogy a P2X7 jelátviteli út vonal központi szabályozó szerepet tölt be az anyai immunaktiváció során kialakuló magzati neuroinflammációs válaszokban, amelyek az autizmus spektrum zavar kialakulásához vezethetnek. Eredményeink szerint a P2X7–NLRP3–IL-1 β tengely célzott gátlása hatékonyan megelőzi a viselkedéses és morfológiai eltérések kialakulását a MIA egérmodellben, ezáltal ígéretes terápiás célpontként jelölve meg ezt az útvonalat azokban a kórállapotokban, ahol annak komponensei kórosan aktiváltak – hangsúlyozva a fiziológiás funkciók megőrzésének és a gyulladásos válasz finomhangolásának fontosságát.

Munkánk során emellett egy kiegészítő COVID–19 egérmodellt is alkalmaztunk, amelyben a fertőzés utáni neuroinflammáció és viselkedésváltozások szintén P2X7-függőnek bizonyultak. Ez az eredmény új megvilágításba helyezi a P2X7 szerepét: nemcsak a fejlődési időszakban jelentkező immunstimuláció esetén, hanem a felnőttkori vírusfertőzésekhez kapcsolódó neurológiai zavarokban is meghatározó jelentőségű lehet.

Eredményeink így két különböző patológiai modellben is megerősítik, hogy a P2X7 receptor aktivációja a gyulladásos eredetű viselkedésváltozások közös, konvergáló mechanisztikus

eleme lehet. Ezek az adatok egy eddig kevésbé feltárt, de potenciálisan univerzális mechanizmus lehetőségét vetik fel, amelyben a P2X7 receptor központi csomópontként kapcsolhatja össze a különböző időbeli és patológiai kontextusokban fellépő neuroinflammációt a pszichiátriai zavarok viselkedéses manifesztációival. E megközelítés hozzájárulhat annak felismeréséhez, hogy a P2X7 célzott modulálása a jövőben nemcsak terápiás szempontból, hanem a neuroimmunológiai viselkedéses zavarok rendszerszintű újraértelmezése szempontjából is jelentős lehet.

10 SUMMARY

Mapping the inflammatory processes underlying neuropsychiatric disorders is one of the central challenges of current research, particularly in complex conditions such as autism spectrum disorder or the neuropsychiatric symptomatology that may emerge following acute SARS-CoV-2 infection. In recent years, increasing evidence has confirmed that disturbances in the communication between the immune and nervous systems can result in persistent functional and behavioural consequences. The purinergic P2X7 receptor, which simultaneously detects cellular damage and triggers inflammatory cascades, holds a unique position within this interactional axis—yet it has received relatively little attention in the context of neurodevelopmental disorders or infection-related long-term neurological symptoms.

In the research associated with this dissertation, we aimed to contribute to a better understanding of this underexplored mechanism by demonstrating that the P2X7 signaling pathway plays a central regulatory role in fetal neuroinflammatory responses triggered by maternal immune activation, which can ultimately lead to the development of ASD.

Our results showed that inhibition of the P2X7–NLRP3–IL-1 β axis effectively prevented both behavioral and morphological alterations in the maternal immune activation (MIA) mouse model, highlighting this pathway as a promising novel therapeutic target in conditions where its components are pathologically activated - emphasizing the importance of preserving physiological function and fine-tuning the inflammatory response. In addition, we employed an independent mouse model of COVID-19, in which post-infectious neuroinflammation and behavioral alterations were also shown to be P2X7-dependent.

Our findings across two distinct pathological models—maternal immune activation and post-infectious SARS-CoV-2 exposure—highlight the P2X7 receptor as a converging mechanistic element in inflammation-induced behavioral alterations. These results suggest the existence of a previously underexplored, yet potentially universal mechanism wherein P2X7 serves as a central node linking neuroinflammatory processes to neuropsychiatric manifestations

across diverse temporal and pathological contexts. This perspective may contribute to recognizing that targeted modulation of P2X7 could hold significance not only for therapeutic interventions but also for a systemic re-evaluation of neuroimmune-related behavioral disorders.

11 IRODALOMJEGYZÉK

1. Mondelli, V., et al., Brain microglia in psychiatric disorders. *Lancet Psychiatry*, 2017. **4**(7): p. 563-572.
2. Miller, A.H. and C.L. Raison, The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, 2016. **16**(1): p. 22-34.
3. Di Virgilio, F., et al., The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 2017. **47**(1): p. 15-31.
4. Savio, L.E.B., et al., The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Front Pharmacol*, 2018. **9**: p. 52.
5. Fields, R.D., Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling. *Semin Cell Dev Biol*, 2011. **22**(2): p. 214-9.
6. Koizumi, S., Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *Febs j*, 2010. **277**(2): p. 286-92.
7. George, J., et al., Different danger signals differently impact on microglial proliferation through alterations of ATP release and extracellular metabolism. *Glia*, 2015. **63**(9): p. 1636-45.
8. Bodin, P. and G. Burnstock, Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res*, 2001. **26**(8-9): p. 959-69.
9. Chen, Y.H., et al., Extracellular ATP Is a Homeostatic Messenger That Mediates Cell-Cell Communication in Physiological Processes and Psychiatric Diseases. *Biol Psychiatry*, 2025. **97**(1): p. 41-53.
10. Giuliani, A.L., A.C. Sarti, and F. Di Virgilio, Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 619458.
11. Taruno, A., ATP Release Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(3): p. 808.
12. Burnstock, G. and C. Kennedy, P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol*, 2011. **61**: p. 333-72.
13. North, R.A., Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 2002. **82**(4): p. 1013-67.

14. Rodrigues, R.J., A.R. Tomé, and R.A. Cunha, ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci*, 2015. **9**: p. 148.
15. Sperlágh, B. and P. Illes, P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 2014. **35**(10): p. 537-47.
16. Bidula, S., et al., Positive allosteric modulation of P2X7 promotes apoptotic cell death over lytic cell death responses in macrophages. *Cell Death & Disease*, 2019. **10**(12): p. 882.
17. Purohit, R. and A.K. Bera, Pannexin 1 plays a pro-survival role by attenuating P2X7 receptor-mediated Ca²⁺ influx. *Cell Calcium*, 2021. **99**: p. 102458.
18. Crespo Yanguas, S., et al., Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2017. **1864**(1): p. 51-61.
19. Weilinger, N.L., et al., Pannexin-1 opening in neuronal edema causes cell death but also leads to protection via increased microglia contacts. *Cell Rep*, 2023. **42**(10): p. 113128.
20. Boyce, A.K.J. and L.A. Swayne, P2X7 receptor cross-Talk regulates ATP-induced pannexin 1 internalization. *Biochemical Journal*, 2017. **474**(13): p. 2133-2144.
21. Ruan, Z., et al., Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature*, 2020. **584**(7822): p. 646-651.
22. Mim, C., G. Perkins, and G. Dahl, Structure versus function: Are new conformations of pannexin 1 yet to be resolved? *Journal of General Physiology*, 2021. **153**(5).
23. Baroja-Mazo, A., M. Barberà-Cremades, and P. Pelegrín, The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2013. **1828**(1): p. 79-93.
24. Li, D. and M. Wu, Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021. **6**(1): p. 291.
25. Acioglu, C., R.F. Heary, and S. Elkabes, Roles of neuronal toll-like receptors in neuropathic pain and central nervous system injuries and diseases. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2022. **102**: p. 163-178.

26. Kielian, T., Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res*, 2006. **83**(5): p. 711-30.
27. Viola, T.W., et al., Acute neuroinflammation elicited by TLR-3 systemic activation combined with early life stress induces working memory impairments in male adolescent mice. *Behav Brain Res*, 2019. **376**: p. 112221.
28. Yang, J. and H. Yan, TLR5: beyond the recognition of flagellin. *Cellular & Molecular Immunology*, 2017. **14**(12): p. 1017-1019.
29. Miyake, K., et al., Nucleic Acid Sensing by Toll-Like Receptors in the Endosomal Compartment. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 941931.
30. Zhang, Z., et al., Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands. *Cell Reports*, 2018. **25**(12): p. 3371-3381.e5.
31. Semple, C., et al., Polymorphisms in the P2X7 receptor, and differential expression of Toll-like receptor-mediated cytokines and defensins, in a Canadian Indigenous group. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 14204.
32. Zhang, W.-J., et al., NLRP3 Inflammasome: A key contributor to the inflammation formation. *Food and Chemical Toxicology*, 2023. **174**: p. 113683.
33. Yang, Y., et al., Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death & Disease*, 2019. **10**(2): p. 128.
34. Zangiabadi, S. and A.A. Abdul-Sater, Regulation of the NLRP3 Inflammasome by Posttranslational Modifications. *The Journal of Immunology*, 2022. **208**(2): p. 286-292.
35. Karmakar, M., et al., Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10555.
36. Próchnicki, T., M.S. Mangan, and E. Latz, Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Res*, 2016. **5**.
37. Swanson, K.V., M. Deng, and J.P. Ting, The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(8): p. 477-489.
38. Groß, C.J., et al., K(+) Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity*, 2016. **45**(4): p. 761-773.

39. Pelegrin, P., P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochem Pharmacol*, 2021. **187**: p. 114385.
40. Tschopp, J. and K. Schroder, NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology*, 2010. **10**(3): p. 210-215.
41. Boucher, D., et al., Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*, 2018. **215**(3): p. 827-840.
42. Ting, J.P., S.B. Willingham, and D.T. Bergstralh, NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 372-9.
43. Bockstiegel, J., J. Engelhardt, and G. Weindl, P2X7 receptor activation leads to NLRP3-independent IL-1 β release by human macrophages. *Cell Communication and Signaling*, 2023. **21**(1): p. 335.
44. Andrei, C., et al., Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 β secretion: implications for inflammatory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(26): p. 9745-9750.
45. MacKenzie, A., et al., Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, 2001. **15**(5): p. 825-835.
46. Qu, Y., et al., Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol*, 2007. **179**(3): p. 1913-25.
47. Shirasaki, Y., et al., Real-time single-cell imaging of protein secretion. *Scientific reports*, 2014. **4**(1): p. 4736.
48. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(2): p. 99-109.
49. Hewett, S.J., N.A. Jackman, and R.J. Claycomb, Interleukin-1 β in Central Nervous System Injury and Repair. *Eur J Neurodegener Dis*, 2012. **1**(2): p. 195-211.
50. Grebenciucova, E. and S. VanHaerents, Interleukin 6: at the interface of human health and disease. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1255533.
51. Rauf, A., et al., Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 2022. **27**(10).

52. Dinarello, C.A., Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 8-27.
53. Luís, J.P., C.J.V. Simões, and R.M.M. Brito, The Therapeutic Prospects of Targeting IL-1R1 for the Modulation of Neuroinflammation in Central Nervous System Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(3): p. 1731.
54. Sims, J.E. and D.E. Smith, The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2010. **10**(2): p. 89-102.
55. Liu, X., et al., Cell-Type-Specific Interleukin 1 Receptor 1 Signaling in the Brain Regulates Distinct Neuroimmune Activities. *Immunity*, 2019. **50**(2): p. 317-333.e6.
56. Huang, Y., et al., Neuron-specific effects of interleukin-1 β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *J Neurosci*, 2011. **31**(49): p. 18048-59.
57. Banks, W.A., A.J. Kastin, and R.D. Broadwell, Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 1995. **2**(4): p. 241-8.
58. Fetsko, A.R., et al., IL-1 β disrupts blood-brain barrier development by inhibiting endothelial Wnt/ β -catenin signaling. *bioRxiv*, 2024.
59. Ospelt, C. and S. Gay, TLRs and chronic inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010. **42**(4): p. 495-505.
60. Kristof, Z., et al., From Childhood Woes to Adult Blues: Unmasking the Role of Early Traumas, P2X7 Receptor, and Neuroinflammation in Anxiety and Depression. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025. **26**(10): p. 4687.
61. Burnstock, G. and H. Ulrich, Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(8): p. 1369-94.
62. Ribeiro, D.E., et al., Purinergic receptors in neurogenic processes. *Brain Res Bull*, 2019. **151**: p. 3-11.
63. Tsao, H.K., P.H. Chiu, and S.H. Sun, PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death Dis*, 2013. **4**(8): p. e751.

64. Cheung, K.K., W.Y. Chan, and G. Burnstock, Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience*, 2005. **133**(4): p. 937-945.
65. Ortega, F., et al., Salient brain entities labelled in P2rx7-EGFP reporter mouse embryos include the septum, roof plate glial specializations and circumventricular ependymal organs. *Brain Struct Funct*, 2021. **226**(3): p. 715-741.
66. Sebastián-Serrano, Á., et al., Studying the Role of P2X7 Receptor in Axonal Growth Using In Utero Electroporation Technique. *Methods Mol Biol*, 2022. **2510**: p. 355-366.
67. Glaser, T., et al., Modulation of mouse embryonic stem cell proliferation and neural differentiation by the P2X7 receptor. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e96281.
68. Beamer, E., G. Kovács, and B. Sperlág, ATP released from astrocytes modulates action potential threshold and spontaneous excitatory postsynaptic currents in the neonatal rat prefrontal cortex. *Brain Res Bull*, 2017. **135**: p. 129-142.
69. Mut-Arbona, P., et al., Dual Role of the P2X7 Receptor in Dendritic Outgrowth during Physiological and Pathological Brain Development. *J Neurosci*, 2023. **43**(7): p. 1125-1142.
70. Andrejew, R., et al., Post-weaning social isolation impairs purinergic signaling in rat brain. *Neurochem Int*, 2021. **148**: p. 105111.
71. Miras-Portugal, M.T., et al., Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *J Neurosci*, 2017. **37**(30): p. 7063-7072.
72. Delarasse, C., et al., Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem*, 2009. **109**(3): p. 846-57.
73. Oliveira, Á., P. Illes, and H. Ulrich, Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, 2016. **104**: p. 272-81.
74. Leeson, H.C., et al., P2X7 receptor signaling during adult hippocampal neurogenesis. *Neural Regen Res*, 2019. **14**(10): p. 1684-1694.
75. Csölle, C., et al., Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e66547.

76. Lammert, C.R., et al., AIM2 inflammasome surveillance of DNA damage shapes neurodevelopment. *Nature*, 2020. **580**(7805): p. 647-652.
77. Coutinho-Budd, J.C. and H.T. Broihier, Pyroptosis Takes Aim at Neurodevelopment. *Developmental Cell*, 2020. **53**(5): p. 498-499.
78. McKenzie, B.A., V.M. Dixit, and C. Power, Fiery Cell Death: Pyroptosis in the Central Nervous System. *Trends Neurosci*, 2020. **43**(1): p. 55-73.
79. Ma, L., et al., Interleukin-1 beta guides the migration of cortical neurons. *J Neuroinflammation*, 2014. **11**: p. 114.
80. Mousa, A., et al., HUMAN FIRST TRIMESTER FOREBRAIN CELLS EXPRESS GENES FOR INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES. *Cytokine*, 1999. **11**(1): p. 55-60.
81. Giulian, D., et al., Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci*, 1988. **8**(2): p. 709-14.
82. Striedinger, K. and E. Scemes, Interleukin-1beta affects calcium signaling and in vitro cell migration of astrocyte progenitors. *J Neuroimmunol*, 2008. **196**(1-2): p. 116-23.
83. Boato, F., et al., Interleukin-1 beta and neurotrophin-3 synergistically promote neurite growth in vitro. *J Neuroinflammation*, 2011. **8**: p. 183.
84. Prem, S., J.H. Millonig, and E. DiCicco-Bloom, Dysregulation of neurite outgrowth and cell migration in autism and other neurodevelopmental disorders. *Neurodevelopmental Disorders: Employing iPSC Technologies to Define and Treat Childhood Brain Diseases*, 2020: p. 109-153.
85. Kwok, J., et al., Maternal infections during pregnancy and child cognitive outcomes. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2022. **22**(1): p. 848.
86. Knuesel, I., et al., Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*, 2014. **10**(11): p. 643-660.
87. Zimmer, A., et al., Prenatal exposure to viral infection and neuropsychiatric disorders in offspring: A review of the literature and recommendations for the COVID-19 pandemic. *Brain Behav Immun*, 2021. **91**: p. 756-770.

88. Tau, G.Z. and B.S. Peterson, Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(1): p. 147-68.
89. Doi, M., N. Usui, and S. Shimada, Prenatal Environment and Neurodevelopmental Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022. **13**: p. 860110.
90. Lécuyer, D., et al., The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1270081.
91. Lanzone, A., S. Ferrazzani, and A. Botta, Delivery and late preterm birth. *Italian Journal of Pediatrics*, 2014. **40**(2): p. A1.
92. San Martín-González, N., et al., Maternal respiratory viral infections during pregnancy and offspring's neurodevelopmental outcomes: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023. **149**: p. 105178.
93. Brown, A.S., et al., Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 2004. **61**(8): p. 774-80.
94. Brown, A.S., et al., A.E. Bennett Research Award. Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 2001. **49**(6): p. 473-86.
95. Sørensen, H.J., et al., Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophr Bull*, 2009. **35**(3): p. 631-7.
96. Croen, L.A., et al., Infection and Fever in Pregnancy and Autism Spectrum Disorders: Findings from the Study to Explore Early Development. *Autism Res*, 2019. **12**(10): p. 1551-1561.
97. Holingue, C., et al., Interaction between Maternal Immune Activation and Antibiotic Use during Pregnancy and Child Risk of Autism Spectrum Disorder. *Autism Res*, 2020. **13**(12): p. 2230-2241.
98. Jiang, H.Y., et al., Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*, 2016. **58**: p. 165-172.
99. Lee, Y.H., et al., Effects of prenatal bacterial infection on cognitive performance in early childhood. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2020. **34**(1): p. 70-79.

100. Cheslack-Postava, K. and A.S. Brown, Prenatal infection and schizophrenia: A decade of further progress. *Schizophr Res*, 2022. **247**: p. 7-15.
101. Shuid, A.N., et al., Association between Viral Infections and Risk of Autistic Disorder: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*, 2021. **18**(6).
102. Dickerson, F., et al., Schizophrenia is Associated With an Aberrant Immune Response to Epstein-Barr Virus. *Schizophr Bull*, 2019. **45**(5): p. 1112-1119.
103. Vianna, P., et al., Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects. *Neuroimmunomodulation*, 2018. **25**(5-6): p. 320-327.
104. Figueiredo, C.P., et al., SARS-CoV-2-associated cytokine storm during pregnancy as a possible risk factor for neuropsychiatric disorder development in post-pandemic infants. *Neuropharmacology*, 2021. **201**: p. 108841.
105. Ousseny Zerbo, Y.Q., Cathleen Yoshida, Judith K. Grether, Judy Van de Water, Lisa A. Croen, Maternal Infection during Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord.*, 2016. **45**(12): p. 4015–4025.
106. Myka L Estes, A.K.M., Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science.*, 2016. **353**((6301)): p. 772-7.
107. Knuesel, I., et al., Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*, 2014. **10**(11): p. 643-60.
108. Lee, B.H., et al., Activation of P2X(7) receptor by ATP plays an important role in regulating inflammatory responses during acute viral infection. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35812.
109. García-Villalba, J., et al., Soluble P2X7 Receptor Is Elevated in the Plasma of COVID-19 Patients and Correlates With Disease Severity. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 894470.
110. Vultaggio-Poma, V., et al., The shed P2X7 receptor is an index of adverse clinical outcome in COVID-19 patients. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1182454.
111. Ye, Q., B. Wang, and J. Mao, The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect*, 2020. **80**(6): p. 607-613.
112. Moore, K.M. and M.S. Suthar, Comprehensive analysis of COVID-19 during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021. **538**: p. 180-186.

113. van Baar, J.A.C., et al., COVID-19 in pregnant women: a systematic review and meta-analysis on the risk and prevalence of pregnancy loss. *Hum Reprod Update*, 2024. **30**(2): p. 133-152.
114. Ahmad, S.N., et al., Do SARS-CoV-2-Infected Pregnant Women Have Adverse Pregnancy Outcomes as Compared to Non-Infected Pregnant Women? *Int J Womens Health*, 2022. **14**: p. 1201-1210.
115. Chen, H., et al., Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*, 2020. **395**(10226): p. 809-815.
116. Dong, L., et al., Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. *Jama*, 2020. **323**(18): p. 1846-1848.
117. Jeganathan, K. and A.B. Paul, Vertical transmission of SARS-CoV-2: A systematic review. *Obstet Med*, 2022. **15**(2): p. 91-98.
118. Kotlyar, A.M., et al., Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 2021. **224**(1): p. 35-53.e3.
119. Pantelis, C., et al., Neurological, neuropsychiatric and neurodevelopmental complications of COVID-19. *Aust N Z J Psychiatry*, 2021. **55**(8): p. 750-762.
120. Shanes, E.D., et al., Placental Pathology in COVID-19. *Am J Clin Pathol*, 2020. **154**(1): p. 23-32.
121. Shuffrey, L.C., et al., Association of Birth During the COVID-19 Pandemic With Neurodevelopmental Status at 6 Months in Infants With and Without In Utero Exposure to Maternal SARS-CoV-2 Infection. *JAMA Pediatr*, 2022. **176**(6): p. e215563.
122. Ayed, M., et al., Neurodevelopmental outcomes of infants born to mothers with SARS-CoV-2 infections during pregnancy: a national prospective study in Kuwait. *BMC Pediatrics*, 2022. **22**(1): p. 319.
123. Jackson, R., et al., Antenatal and neonatal exposure to SARS-CoV-2 and children's development: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Res*, 2024. **96**(1): p. 40-50.

124. Erdogan, M.A., et al., Prenatal SARS-CoV-2 Spike Protein Exposure Induces Autism-Like Neurobehavioral Changes in Male Neonatal Rats. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2023. **18**(4): p. 573-591.
125. de Araújo, T.V.B., et al., Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*, 2018. **18**(3): p. 328-336.
126. Lottini, G., et al., Zika virus induces FOXP1 nuclear displacement and downregulation in human neural progenitors. *Stem Cell Reports*, 2022. **17**(7): p. 1683-1698.
127. Krow-Lucal, E.R., et al., Association and birth prevalence of microcephaly attributable to Zika virus infection among infants in Paraíba, Brazil, in 2015-16: a case-control study. *Lancet Child Adolesc Health*, 2018. **2**(3): p. 205-213.
128. Azevedo, R.S.S., et al., In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1.
129. Sherer, M.L., et al., Zika virus infection of pregnant rats and associated neurological consequences in the offspring. *PLoS One*, 2019. **14**(6): p. e0218539.
130. Shi, Y., et al., Vertical Transmission of the Zika Virus Causes Neurological Disorders in Mouse Offspring. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 3541.
131. Elgueta, D., et al., Consequences of Viral Infection and Cytokine Production During Pregnancy on Brain Development in Offspring. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 816619.
132. Ohki, C.M.Y., et al., Zika virus infection impairs synaptogenesis, induces neuroinflammation, and could be an environmental risk factor for autism spectrum disorder outcome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024. **1870**(5): p. 167097.
133. Leite-Aguiar, R., et al., ATP-P2X7 signaling mediates brain pathology while contributing to viral control in perinatal Zika virus infection. *Brain Behav Immun*, 2024. **118**: p. 318-333.
134. Lee, Y.H., et al., Maternal Bacterial Infection During Pregnancy and Offspring Risk of Psychotic Disorders: Variation by Severity of Infection and Offspring Sex. *American Journal of Psychiatry*, 2020. **177**(1): p. 66-75.

135. Kirsten, T.B. and M.M. Bernardi, Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. *Behavioural Brain Research*, 2017. **331**: p. 25-29.
136. Carbone, E., et al., Maternal Immune Activation Induced by Prenatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Long-Lasting Autistic-like Social, Cognitive and Immune Alterations in Male Wistar Rats. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(4).
137. Pålsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 2004. **113**(2): p. 153-62.
138. McDermott, S., et al., Urinary tract infections during pregnancy and mental retardation and developmental delay. *Obstet Gynecol*, 2000. **96**(1): p. 113-9.
139. Getahun, D., et al., The Effect of Neonatal Sepsis on Risk of Autism Diagnosis. *Am J Perinatol*, 2023. **40**(8): p. 858-866.
140. Fan, Z., et al., P2X7 receptor: A receptor closely linked with sepsis-associated encephalopathy. *Open Life Sci*, 2024. **19**(1): p. 20220775.
141. Martínez-García, J.J., et al., P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2711.
142. Fialho, S., et al., Could P2X7 receptor be a potencial target in neonatal sepsis? *International Immunopharmacology*, 2024. **142**: p. 112969.
143. Martínez-García, J.J., et al., P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 2711.
144. Wang, H., et al., P2RX7 sensitizes Mac-1/ICAM-1-dependent leukocyte-endothelial adhesion and promotes neurovascular injury during septic encephalopathy. *Cell Research*, 2015. **25**(6): p. 674-690.
145. Ozkanlar, S., et al., P2X7 receptor antagonist A-438079 alleviates oxidative stress of lung in LPS-induced septic rats. *Purinergic Signalling*, 2023. **19**(4): p. 699-707.
146. Larrouyet-Sarto, M.L., et al., P2X7 receptor deletion attenuates oxidative stress and liver damage in sepsis. *Purinergic Signal*, 2020. **16**(4): p. 561-572.

147. Savio, L.E.B., et al., P2X7 Receptor Signaling Contributes to Sepsis-Associated Brain Dysfunction. *Molecular Neurobiology*, 2017. **54**(8): p. 6459-6470.
148. Alves, V.S., et al., P2X7 receptor contributes to long-term neuroinflammation and cognitive impairment in sepsis-surviving mice. *Front Pharmacol*, 2023. **14**: p. 1179723.
149. Csóka, B., et al., Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. *Faseb j*, 2015. **29**(9): p. 3626-37.
150. Greve, A.S., et al., P2X(1), P2X(4), and P2X(7) Receptor Knock Out Mice Expose Differential Outcome of Sepsis Induced by α -Haemolysin Producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 113.
151. Arranz-Solís, D., D. Mukhopadhyay, and J.J.P. Saeij, Toxoplasma Effectors that Affect Pregnancy Outcome. *Trends Parasitol*, 2021. **37**(4): p. 283-295.
152. Cabral, C.M., et al., Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(2): p. e1005447.
153. Tyebji, S., A.J. Hannan, and C.J. Tonkin, Pathogenic Infection in Male Mice Changes Sperm Small RNA Profiles and Transgenerationally Alters Offspring Behavior. *Cell Rep*, 2020. **31**(4): p. 107573.
154. Brown, A.S., et al., Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry*, 2005. **162**(4): p. 767-73.
155. Bottari, N.B., et al., Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells. *Purinergic Signal*, 2019. **15**(1): p. 77-84.
156. Moreira-Souza, A.C.A. and R. Coutinho-Silva, The Complexity of Purinergic Signaling During *Toxoplasma* Infection. *Curr Top Med Chem*, 2021. **21**(3): p. 205-212.
157. Komal, A., M. Noreen, and A.F. El-Kott, TLR3 agonists: RGC100, ARNAX, and poly-IC: a comparative review. *Immunol Res*, 2021. **69**(4): p. 312-322.
158. Goasdoué, K., et al., Review: The blood-brain barrier; protecting the developing fetal brain. *Placenta*, 2017. **54**: p. 111-116.

159. Xiao, L., et al., Critical Role of TLR4 on the Microglia Activation Induced by Maternal LPS Exposure Leading to ASD-Like Behavior of Offspring. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 634837.
160. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
161. Lee, G.A., et al., Maternal Immune Activation Causes Social Behavior Deficits and Hypomyelination in Male Rat Offspring with an Autism-Like Microbiota Profile. *Brain Sciences*, 2021. **11**(8): p. 1085.
162. Oskvig, D.B., et al., Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*, 2012. **26**(4): p. 623-34.
163. Hughes, H.K., et al., Immune Dysfunction and Autoimmunity as Pathological Mechanisms in Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci*, 2018. **12**: p. 405.
164. Palmeira, P., et al., IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 985646.
165. Chen, S.W., et al., Maternal autoimmune diseases and the risk of autism spectrum disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. *Behav Brain Res*, 2016. **296**: p. 61-69.
166. Zhu, Z., et al., Maternal Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, and Risk for Autism Spectrum Disorders in Offspring: A Meta-analysis. *J Autism Dev Disord*, 2020. **50**(8): p. 2852-2859.
167. Brimberg, L., et al., Brain-reactive IgG correlates with autoimmunity in mothers of a child with an autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 2013. **18**(11): p. 1171-1177.
168. Piras, I.S., et al., Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014. **38**: p. 91-99.

169. Kaplan, Z.B., et al., Maternal Thyroid Dysfunction During Pregnancy as an Etiologic Factor in Autism Spectrum Disorder: Challenges and Opportunities for Research. *Thyroid*, 2023. **34**(2): p. 144-157.
170. Escobar, G.M.d., M.a.J. Obregón, and F.E.d. Rey, Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004. **18**(2): p. 225-248.
171. Whiteley, P., et al., Autoimmune Encephalitis and Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry*, 2021. **12**: p. 775017.
172. Martínez-Cerdeño, V., et al., Prenatal Exposure to Autism-Specific Maternal Autoantibodies Alters Proliferation of Cortical Neural Precursor Cells, Enlarges Brain, and Increases Neuronal Size in Adult Animals. *Cereb Cortex*, 2016. **26**(1): p. 374-383.
173. Ariza, J., et al., Maternal autoimmune antibodies alter the dendritic arbor and spine numbers in the infragranular layers of the cortex. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0183443.
174. Camacho, J., et al., Embryonic intraventricular exposure to autism-specific maternal autoantibodies produces alterations in autistic-like stereotypical behaviors in offspring mice. *Behav Brain Res*, 2014. **266**: p. 46-51.
175. Jha, S., et al., The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci*, 2010. **30**(47): p. 15811-20.
176. Grassi, F. and G. Salina, The P2X7 Receptor in Autoimmunity. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(18).
177. Keystone, E.C., et al., Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(10): p. 1630-5.
178. Eser, A., et al., Safety and Efficacy of an Oral Inhibitor of the Purinergic Receptor P2X7 in Adult Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease: A

- Randomized Placebo-controlled, Double-blind, Phase IIa Study. *Inflamm Bowel Dis*, 2015. **21**(10): p. 2247-53.
179. Fiebich, B.L., S. Akter, and R.S. Akundi, The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 260.
 180. Horváth, G., et al., P2X7 Receptors Drive Poly(I:C) Induced Autism-like Behavior in Mice. *J Neurosci*, 2019. **39**(13): p. 2542-2561.
 181. Girard, S., et al., IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 3997-4005.
 182. Su, Y., et al., Prenatal Poly I:C Challenge Affects Behaviors and Neurotransmission via Elevated Neuroinflammation Responses in Female Juvenile Rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2022. **25**(2): p. 160-171.
 183. Talukdar, P.M., et al., A proof-of-concept study of maternal immune activation mediated induction of Toll-like receptor (TLR) and inflammasome pathways leading to neuroprogressive changes and schizophrenia-like behaviours in offspring. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2021. **52**: p. 48-61.
 184. American Psychiatric Association Neurodevelopmental Disorders, in *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 2013: Washington, DC.
 185. Stefanik Krisztina, G., A diagnózistól a foglalkozási rehabilitációig : új utak és eredmények a tanulásban akadályozott személyek gyógypedagógiájában. Az ELTE BGGYK és az ELTE Eötvös Kiadó közös tankönyvsorozata, ISSN 2060-5862 ; 6., ed. s. Papp Gabriella. 2011: Budapest : ELTE BGGYK : ELTE Eötvös K.
 186. Lord, C., et al., Autism spectrum disorder. *Lancet*, 2018. **392**(10146): p. 508-520.
 187. National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities, C.f.D.C.a.P. Signs and Symptoms of Autism Spectrum Disorder. 2022; Available from: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/signs.html>.
 188. Lobar, S.L., DSM-V Changes for Autism Spectrum Disorder (ASD): Implications for Diagnosis, Management, and Care Coordination for Children With ASDs. *J Pediatr Health Care*, 2016. **30**(4): p. 359-65.

189. Maenner, M.J., et al., Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ*, 2023. **72**(2): p. 1-14.
190. Shaw, K.A., et al., Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ*, 2023. **72**(1): p. 1-15.
191. Chiarotti, F. and A. Venerosi, Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain Sci*, 2020. **10**(5).
192. Ann Katrin Sauer, J.E.S., Sakshi Hans, Andreas M. Grabrucker, Autism Spectrum Disorders: Etiology and Pathology, in Autism Spectrum Disorders, G. AM, Editor. 2021, Exon Publications: Brisbane.
193. Rosenberg, R.E., et al., Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2009. **163**(10): p. 907-14.
194. Hallmayer, J., et al., Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 2011. **68**(11): p. 1095-102.
195. Taniai, H., et al., Genetic influences on the broad spectrum of autism: study of proband-ascertained twins. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008. **147b**(6): p. 844-9.
196. Ozonoff, S., et al., Recurrence Risk for Autism Spectrum Disorders: A Baby Siblings Research Consortium Study. *Pediatrics*, 2011. **128**: p. e488-95.
197. Sumi, S., et al., Sibling risk of pervasive developmental disorder estimated by means of an epidemiologic survey in Nagoya, Japan. *J Hum Genet*, 2006. **51**(6): p. 518-522.
198. DiGuseppi, C., et al., Screening for autism spectrum disorders in children with Down syndrome: population prevalence and screening test characteristics. *J Dev Behav Pediatr*, 2010. **31**(3): p. 181-91.
199. Zecavati, N. and S.J. Spence, Neurometabolic disorders and dysfunction in autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2009. **9**(2): p. 129-36.

200. Levy, S.E., et al., Autism spectrum disorder and co-occurring developmental, psychiatric, and medical conditions among children in multiple populations of the United States. *J Dev Behav Pediatr*, 2010. **31**(4): p. 267-75.
201. Wolff, N., et al., Autism Spectrum Disorder and IQ - A Complex Interplay. *Front Psychiatry*, 2022. **13**: p. 856084.
202. Szabo, A., et al., Elevated levels of peripheral and central nervous system immune markers reflect innate immune dysregulation in autism spectrum disorder. *Psychiatry Res*, 2024. **342**: p. 116245.
203. Suzuki, K., et al., Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20470.
204. O'Shea, T.M., et al., Elevated concentrations of inflammation-related proteins in postnatal blood predict severe developmental delay at 2 years of age in extremely preterm infants. *J Pediatr*, 2012. **160**(3): p. 395-401.e4.
205. Bajnok, A., et al., Distinct cytokine patterns may regulate the severity of neonatal asphyxia—an observational study. *Journal of Neuroinflammation*, 2017. **14**(1): p. 244.
206. Bartha, A.I., et al., Neonatal encephalopathy: association of cytokines with MR spectroscopy and outcome. *Pediatr Res*, 2004. **56**(6): p. 960-6.
207. Kelly, S.B., et al., Interleukin-1: an important target for perinatal neuroprotection? *Neural Regen Res*, 2023. **18**(1): p. 47-50.
208. Chippa, V., A. Aleem, and F. Anjum, Postacute Coronavirus (COVID-19) Syndrome, in *StatPearls*. 2025, StatPearls Publishing

Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies.

Disclosure: Abdul Aleem declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Fatima Anjum declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

209. Frontera, J.A. and N.M. Simon, Bridging Knowledge Gaps in the Diagnosis and Management of Neuropsychiatric Sequelae of COVID-19. *JAMA Psychiatry*, 2022. **79**(8): p. 811-817.

210. D'Hondt, S., et al., Anxiety and depression in people with post-COVID condition: a Belgian population-based cohort study three months after SARS-CoV-2 infection. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 2024. **59**(11): p. 2083-2092.
211. Monje, M. and A. Iwasaki, The neurobiology of long COVID. *Neuron*, 2022. **110**(21): p. 3484-3496.
212. Amruta, N., et al., Mouse Adapted SARS-CoV-2 (MA10) Viral Infection Induces Neuroinflammation in Standard Laboratory Mice. *Viruses*, 2022. **15**(1).
213. Jiang, Q., et al., SARS-CoV-2 spike S1 protein induces microglial NLRP3-dependent neuroinflammation and cognitive impairment in mice. *Experimental Neurology*, 2025. **383**: p. 115020.
214. Oh, J., et al., SARS-CoV-2 spike protein induces cognitive deficit and anxiety-like behavior in mouse via non-cell autonomous hippocampal neuronal death. *Scientific Reports*, 2022. **12**(1): p. 5496.
215. Bhattacharya, A., et al., Role of neuro-immunological factors in the pathophysiology of mood disorders. *Psychopharmacology*, 2016. **233**(9): p. 1623-1636.
216. Ribeiro, D.E., et al., Hyperactivation of P2X7 receptors as a culprit of COVID-19 neuropathology. *Molecular Psychiatry*, 2021. **26**(4): p. 1044-1059.
217. Horai, R., et al., Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*, 1998. **187**(9): p. 1463-75.
218. Solle, M., et al., Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 125-32.
219. Mueller, F.S., et al., Influence of poly(I:C) variability on thermoregulation, immune responses and pregnancy outcomes in mouse models of maternal immune activation. *Brain Behav Immun*, 2019. **80**: p. 406-418.
220. Estes, M.L., et al., Baseline immunoreactivity before pregnancy and poly(I:C) dose combine to dictate susceptibility and resilience of offspring to maternal immune activation. *Brain Behav Immun*, 2020. **88**: p. 619-630.

221. Naviaux, R.K., et al., Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly(IC) mouse model. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e57380.
222. Kyzar, E., et al., Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: focus on mouse self-grooming and its sequencing. *Behav Brain Res*, 2011. **225**(2): p. 426-31.
223. Malkova, N.V., et al., Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*, 2012. **26**(4): p. 607-16.
224. Hashimoto, T., et al., Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *J Autism Dev Disord*, 1995. **25**(1): p. 1-18.
225. Köfalvi, A., et al., Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. *Eur J Neurosci*, 2003. **18**(7): p. 1973-8.
226. Motulsky, H.J. and R.E. Brown, Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 2006. **7**: p. 123.
227. Saresella, M., et al., Multiple inflammasome complexes are activated in autistic spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 2016. **57**: p. 125-133.
228. Pellegrini, C., et al., Microbiota-gut-brain axis in health and disease: Is NLRP3 inflammasome at the crossroads of microbiota-gut-brain communications? *Prog Neurobiol*, 2020. **191**: p. 101806.
229. Hirota, S.A., et al., NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(6): p. 1359-72.
230. Girard, S. and G. Sebire, Transplacental Transfer of Interleukin-1 Receptor Agonist and Antagonist Following Maternal Immune Activation. *Am J Reprod Immunol*, 2016. **75**(1): p. 8-12.
231. Pudney, J., et al., Differential expression of toll-like receptors in the human placenta across early gestation. *Placenta*, 2016. **46**: p. 1-10.

232. Bryant, A.H., et al., Human gestation-associated tissues express functional cytosolic nucleic acid sensing pattern recognition receptors. *Clin Exp Immunol*, 2017. **189**(1): p. 36-46.
233. Wong, H. and C. Hoeffler, Maternal IL-17A in autism. *Exp Neurol*, 2018. **299**(Pt A): p. 228-240.
234. Ashwood, P., et al., Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*, 2011. **25**(1): p. 40-5.
235. Arrode-Brusés, G. and J.L. Brusés, Maternal immune activation by poly I:C induces expression of cytokines IL-1 β and IL-13, chemokine MCP-1 and colony stimulating factor VEGF in fetal mouse brain. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 83.
236. Ashwood, P., et al., Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*, 2011. **232**(1-2): p. 196-9.
237. Xu, N., X. Li, and Y. Zhong, Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 531518.
238. Masi, A., et al., Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 2015. **20**(4): p. 440-6.
239. Wei, H., I. Alberts, and X. Li, Brain IL-6 and autism. *Neuroscience*, 2013. **252**: p. 320-5.
240. Li, X., et al., Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*, 2009. **207**(1-2): p. 111-6.
241. Wu, W.L., et al., The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain Behav Immun*, 2017. **62**: p. 11-23.
242. Zaretsky, M.V., et al., Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol*, 2004. **103**(3): p. 546-50.
243. Smith, S.E., et al., Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, 2007. **27**(40): p. 10695-702.

244. Adhikari, A., M. Xu, and Z.J. Chen, Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3214-26.
245. Ermolaeva, M.A., et al., Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol*, 2008. **9**(9): p. 1037-46.
246. Mantovani, A., et al., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
247. Roca, H., et al., CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b⁺ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem*, 2009. **284**(49): p. 34342-54.
248. Jiang, Y., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, 1992. **148**(8): p. 2423-8.
249. Wallner, S., et al., The Granulocyte-colony stimulating factor has a dual role in neuronal and vascular plasticity. *Front Cell Dev Biol*, 2015. **3**: p. 48.
250. Schneider, A., H.G. Kuhn, and W.R. Schäbitz, A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*, 2005. **4**(12): p. 1753-7.
251. Bhattacharya, A., et al., Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567. *Br J Pharmacol*, 2013. **170**(3): p. 624-40.
252. Bhattacharya, A. and M. Ceusters, Targeting neuroinflammation with brain penetrant P2X7 antagonists as novel therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 2020. **45**(1): p. 234-235.
253. Koványi, B., et al., The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 36680.
254. Recourt, K., et al., Characterization of the central nervous system penetrant and selective purine P2X7 receptor antagonist JNJ-54175446 in patients with major depressive disorder. *Translational Psychiatry*, 2023. **13**(1): p. 266.

255. Garrosa-Jiménez, J., et al., Intracellular calcium and inflammatory markers, mediated by purinergic stimulation, are differentially regulated in monocytes of patients with major depressive disorder. *Neurosci Lett*, 2021. **765**: p. 136275.
256. Naviaux, R.K., et al., Low-dose suramin in autism spectrum disorder: a small, phase I/II, randomized clinical trial. *Ann Clin Transl Neurol*, 2017. **4**(7): p. 491-505.
257. Naviaux, R.K., Antipurinergic therapy for autism-An in-depth review. *Mitochondrion*, 2018. **43**: p. 1-15.
258. Leist, S.R., et al., A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. *Cell*, 2020. **183**(4): p. 1070-1085.e12.
259. Zhang, L., et al., SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier accompanied with basement membrane disruption without tight junctions alteration. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021. **6**(1): p. 337.
260. Singh, A., et al., A murine model of post-acute neurological sequelae following SARS-CoV-2 variant infection. *Front Immunol*, 2024. **15**: p. 1384516.
261. Francis, G. and E. Thunell, COVID-19 infection does not seem to affect cognition in college students. *Conscious Cogn*, 2023. **108**: p. 103464.
262. Wild, C.J., et al., Disentangling the cognitive, physical, and mental health sequelae of COVID-19. *Cell Reports Medicine*, 2022. **3**(10): p. 100750.
263. Li, J., J. Wang, and H. Wang, Emerging Landscape of Preclinical Models for Studying COVID-19 Neurologic Diseases. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2023. **6**(10): p. 1323-1339.
264. Dai, J., et al., Animal models of post-acute COVID-19 syndrome: a call for longitudinal animal studies. *Frontiers in Immunology*, 2025. **16**.
265. Queiroz, M.A.F., et al., Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022. **12**: p. 922422.
266. Mukherjee, S., et al., A single *Citrobacter rodentium* infection in *Pink1* knockout and wild type mice leads to regional blood-brain-barrier perturbation and glial activation without dopamine neuron axon terminal loss. 2024.
267. Lago, T., et al., Striatum on the anxiety map: Small detours into adolescence. *Brain Research*, 2017. **1654**: p. 177-184.

- 268. Ruiz-Rodríguez, V.M., et al., Chemoresistance in Breast Cancer Patients Associated With Changes in P2X7 and A2A Purinergic Receptors in CD8(+) T Lymphocytes. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 576955.
- 269. Hu, X., et al., IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity*, 2006. **24**(5): p. 563-74.
- 270. Saraiva, M. and A. O'Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 2010. **10**(3): p. 170-181.
- 271. Shibata, Y., et al., Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol*, 1998. **161**(8): p. 4283-8.
- 272. Rider, P., et al., IL-1 α and IL-1 β Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *The Journal of Immunology*, 2011. **187**(9): p. 4835-4843.
- 273. Chen, C.-J., et al., Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine*, 2007. **13**(7): p. 851-856.

12 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

12.1 Az értekezés témájában megjelent publikációk

Szabó D, Tod P, Göloncsér F, Román V, Lendvai B, Otrókoci 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, Otrókoci 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, Otrókoci L, Sperlág B.

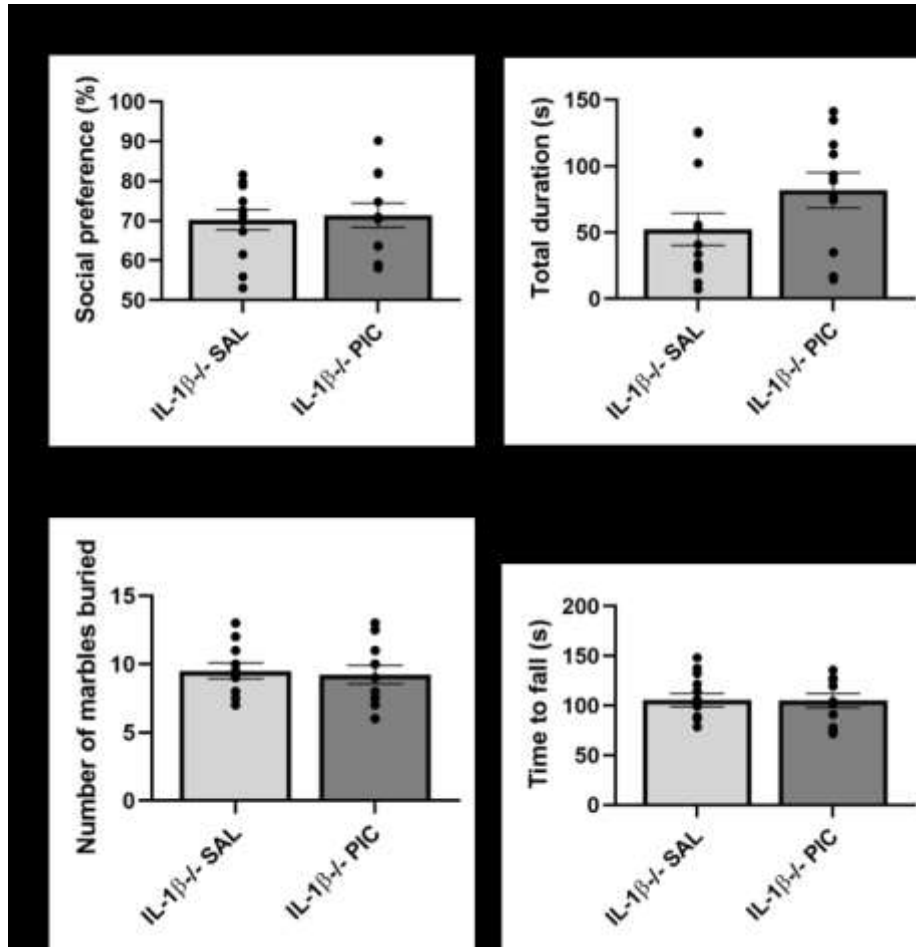
The role of maternal infections in neurodevelopmental psychiatric disorders: focus on the P2X7/NLRP3/IL-1 β signalling pathway. *J Neuroinflammation*. Review. (IF 10,1)

DOI: 10.1186/s12974-025-03509-0

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

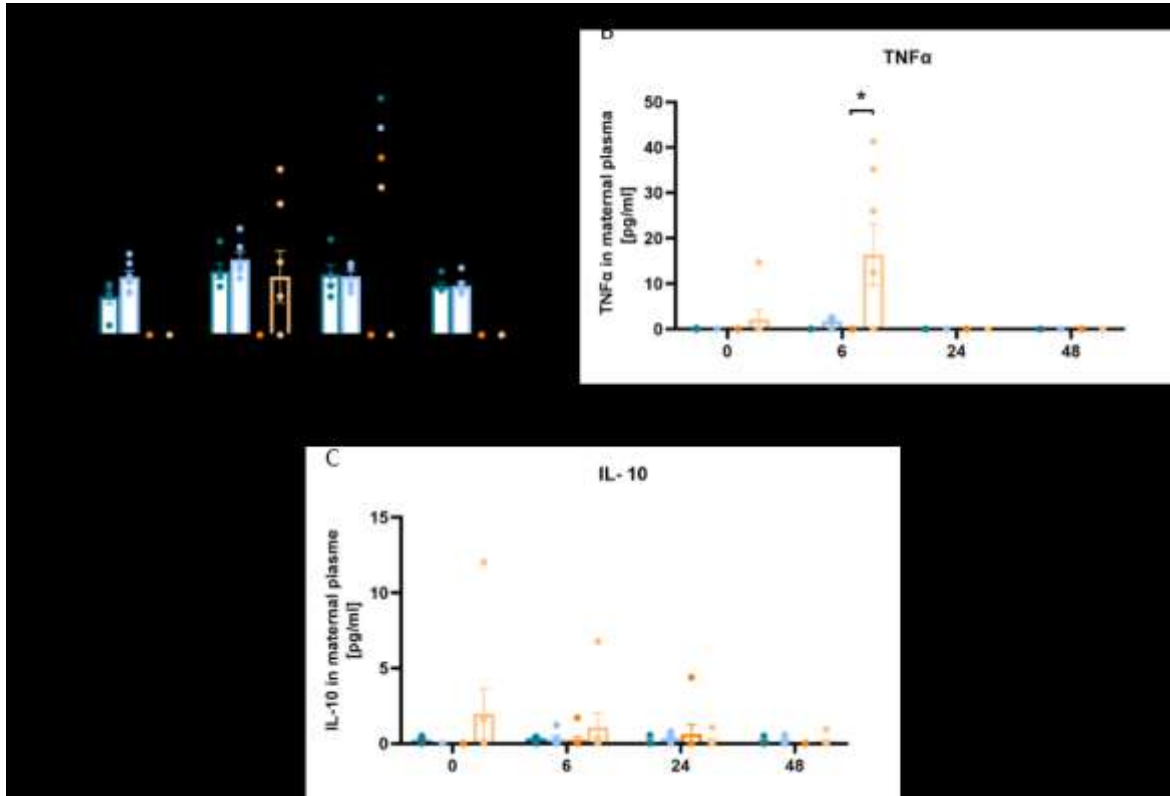
Ezúton szeretném megköszönni mindazoknak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy ez a disszertáció elkészülhessen. Külön köszönöm témavezetőmnek, Dr. Sperlág Beáta professzorasszonynak a folyamatos szakmai támogatást, iránymutatást és bizalmat, amely végigkísérte a munkámat. Hálás vagyok minden csoporttársamnak a segítségért és a közösségért, és különösen azoknak, akikkel szorosan együtt dolgozhattam: Otrókosi Lillának, aki számos technikára megtanított, és mindig készségesen átnézte a kézirataimat; Tod Pálnak a közös munkáért és szakmai tanácsaiért, valamint Paula Mut-Arbonának a bátorító szavakat és pozitív energiát, amelyek segítettek a kitartásban; Iring-Varga Bernadettnek az „egerezések” során nyújtott folyamatos segítségért és Kristóf Zsülietnek a közös cikk összehozásáért, valamint mindkettőjüknek azért, hogy a doktori évek alatt igazi barátaimmá váltak, akiknek támogatása sokat jelent a mindennapokban. Nagyon köszönöm Maác Fruzsínának és Tod Pálnak a COVID-kísérletek során végzett munkájukat távollétem idején. Hálás vagyok Göloncsér Flórának is, aki a kezdetekben segített a viselkedéstesztek betanulásában és mindenkinek a közösen átélt szakmai élményekért. Köszönöm továbbá Oroszi Tündének az adminisztrációs teendőkben nyújtott segítségét és mindig pozitív kisugárzását. Köszönöm a Viselkedés Vizsgálati Egységben Demeter Kornélnak a viselkedéstesztekhez nyújtott segítséget és tanácsokat, valamint az OGR munkatársainak az egerek tenyésztéséért és jólétének biztosításáért végzett gondos munkájukat. Hálásan köszönöm továbbá a BSL3 laborhasználat és a vírus- és sejtszaporítás terén nyújtott támogatást a HUN-REN Állatorvos-tudományi Kutatóintézet (Dr. Mészáros István, Dr. Zádori Zoltán, Dr. Gyuranecz Miklós), valamint a Nemzeti Biztonságos Biotechnológiai Laboratórium, Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ munkatársainak (Dr. Zsidei Gyula, Dr. Kis Zoltán). Kiemelten szeretném megköszönni a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak a doktori képzésem során nyújtott erkölcsi és anyagi támogatást, amely nagyban hozzájárult a munka megvalósításához. Végül, de nem utolsósorban, köszönöm szüleimnek, férjemnek, testvéreimnek és nagyszüleimnek a sok segítséget, szeretetet és biztatást. Külön köszönöm gyerekeimnek a nélkülözéseket, kislányomnak a kétéves bölcsességét és öntudatosságát, ami erőt ad és inspirál.

14 Függelék

1. Kiegészítő ábra

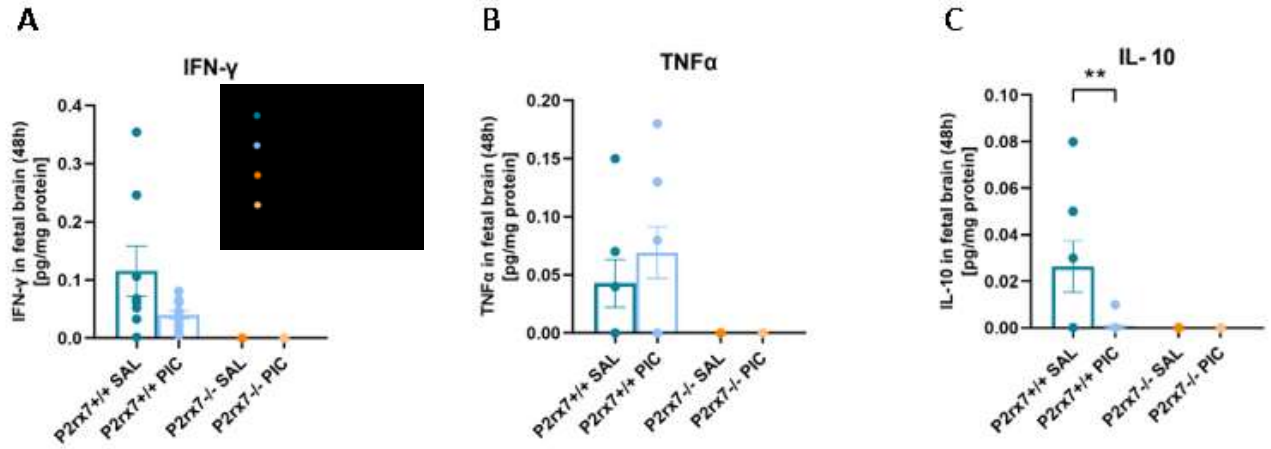
1. Kiegészítő ábra Az IL-1β hiánya megakadályozta a MIA által kiváltott autizmus-szerű fenotípus kialakulását az utódokban (**1. kísérlet**). Viselkedési tesztek végeztünk genetikailag IL-1β-hiányos állatokon is. Az IL-1β gén hiánya kivédte a szociális deficitet (1A ábra), valamint az ismétlődő (1B,C ábra) és szenzomotoros viselkedésváltozások (1D ábra) kialakulását az utódokban. Minden adat átlag ± s.e.m. formában van megadva. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

2. Kiegészítő ábra



2. Kiegészítő ábra IFN- γ , TNF α és IL-10 anyai plazmakoncentrációk mérése 0, 6, 24 és 48 órával a poly(I:C) injekció után (2. kísérlet). Az IFN- γ (2A ábra) és az IL-10 (2C ábra) esetében nem mutatkozott szignifikáns különbség a plazmakoncentrációkban a csoportok között. A P2rx7^{-/-} csoportban a TNF α -t a PIC stimulálta, és a 6. órában szignifikánsan emelkedett értékeket mutatott (2B ábra). A plazmában mért citokínértékek pikogramm/milliliter egységben vannak kifejezve. Minden adat átlag $\pm$ s.e.m. formájában van megadva. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

3. Kiegészítő ábra



3. Kiegészítő ábra IFN- γ , TNF α és IL-10 koncentrációk a magzati agyban 48 órával a MIA-indukció után.

A magzati agyban az IFN- γ (3A ábra), TNF α (3B ábra) és IL-10 (3C ábra) nem volt kimutatható a P2rx7^{-/-} csoportokban. A gyulladáscsökkentő IL-10 szintje szignifikánsan csökkent a PIC-kezelt csoportban (3C ábra). A magzati agyban mért citokinértékek pikogramm/teljes fehérje egységben vannak kifejezve. Minden adat átlag $\pm$ s.e.m. formájában van megadva. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

4. Kiegészítő táblázat – statisztika I.

Ábra	-	Statisztikai módszer	Interakciós F-érték	p-érték	Post-hoc teszt	p-érték	Elemzés (n)
6B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2, 50) = 2,125$	0,1301	Tukey's		12,11,5,10,9,9
					VEH-SAL vs. VEH-PIC	0,0053	
6C Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2, 44) = 0,6341$	0,2946	Tukey's		8,10,5,9,9,9
					n.s.		
6D Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2,47) = 4,653$	0,0143	Tukey's		8,9,6,9,9,9
					VEH-SAL vs. VEH-PIC	0,0494	
6E Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2, 39) = 1,739$	0,189	Tukey's		8,9,5,9,7,7
					n.s.		
6F-G Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 16) = 82,07$	<0,0001	Tukey's post-hoc test		3,8,4,5
					VEH-SAL vs. VEH-PIC	<0,0001	
					VEH-SAL vs. MCC950-SAL	0,0075	
					VEH-PIC vs. MCC950-PIC	<0,0001	
6H-I Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 81) = 29,35$	<0,0001	Tukey's post-hoc test		33,10,19,23
					VEH-SAL vs. VEH-PIC	<0,0001	
					VEH-SAL vs. MCC950-SAL	0,075	
					VEH-PIC vs. MCC950-PIC	<0,0001	
7B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 32) = 0,2811$	0,5996	Tukey's post-hoc test		7,8,14,7
					n.s.		
7C Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(3, 32) = 0,1808$	0,9087	Tukey's post-hoc test		7,8,14,7
					n.s.		
7D Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(3, 32) = 0,07931$	0,9708	Tukey's post-hoc test		7,8,14,7
					n.s.		
7E-F Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(3, 32) = 0,5808$	0,6319	Tukey's post-hoc test		7,8,14,7
					n.s.		
7G-H Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(3, 77) = 2,274$	0,0866	Tukey's post-hoc test		17,17,30,17
					n.s.		
8B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2, 40) = 0,2059$	0,8148	Tukey's post-hoc test		10,10,7,8,6,5
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7+/+ PIC	0,0483	
8C Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2, 61) = 7,931$	0,0009	Tukey's post-hoc test		14,17,7,12,9,8
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7+/+ PIC	0,0285	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0361	

					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7+/+ JNJ+PIC	0,0344	
8B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (2, 92)}} = 19,19$	<0,0001	Tukey's post-hoc test		10,17,18,24,15,14
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7+/+ PIC	<0,0001	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	<0,0001	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7+/+ JNJ+PIC	<0,0001	
					P2rx7-/- SAL vs. P2rx7-/- PIC	0,5964	
					P2rx7+/+ JNJ+SAL vs. P2rx7+/+ JNJ+PIC	0,879	
9B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 20)}} = 0,01197$	0,914	Tukey's post-hoc test		6,7,6,5
					P2rx7+/+ SAL+SAL vs. P2rx7+/+ SAL+PIC	0,0384	
					P2rx7+/+ MCC+SAL vs. P2rx7+/+ MCC+PIC	0,0461	
9C Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 29)}} = 2,857$	0,1017	Tukey's post-hoc test		9,9,8,7
					P2rx7+/+ SAL+SAL vs. P2rx7+/+ SAL+PIC	0,0251	
9D Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 37)}} = 2,700$	0,1088	Tukey's post-hoc test		13,12,9,7
					P2rx7+/+ SAL+SAL vs. P2rx7+/+ SAL+PIC	0,0311	
10B Ábra	0h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,1077	Dunn test		7,8,7,7
					n.s.		
	6h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		10,9,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7+/+ PIC	0,0285	
					P2rx7-/- SAL vs. P2rx7-/- PIC	0,0208	
	24h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0013	Dunn test		10,9,7,7
					n.s.		
	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0528	Dunn test		10,9,7,7
					n.s.		
10C Ábra	0h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0009	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0455	
	6h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0001	Dunn test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0018	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0429	

	24h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0025	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0196	
	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0002	Dunn test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,017	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0056	
10D Ábra	0h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 0,4053$	0,5316	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	<0,0001	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	<0,0001	
	6h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 2,296$	0,1453	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7+/+ PIC	0,0293	
					P2rx7-/- SAL vs. P2rx7-/- PIC	<0,0001	
	24h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 1,689$	0,2086	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0385	
					P2rx7-/- SAL vs. P2rx7-/- PIC	0,026	
	48h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 9,577$	0,0057	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	<0,0001	
					P2rx7-/- SAL vs. P2rx7-/- PIC	0,0018	
10E Ábra	0h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 0,4825$	0,4953	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					n.s.		
	6h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 21) = 5,408$	0,0301	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	0,0368	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0297	
					P2X7-/- SAL vs. P2X7-/- PIC	<0,0001	
	24h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 3,899$	0,0623	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	0,0115	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0329	
	48h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 8,105$	0,01	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	0,0076	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0006	
					P2X7-/- SAL vs. P2X7-/- PIC	>0,9999	
10F Ábra	0h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 2,630$	0,1205	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					n.s.		
	6h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(1, 20) = 44,28$	<0,0001	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	<0,0001	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	<0,0001	
					P2X7-/- SAL vs. P2X7-/- PIC	<0,0001	

	24h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 20)}} = 6,919$	0,016	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	<0,0001	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0192	
					P2X7-/- SAL vs. P2X7-/- PIC	0,0228	
	48h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 20)}} = 14,65$	0,0011	Tukey's post-hoc test		5,5,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	<0,0001	
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7-/- SAL	<0,0001	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	<0,0001	
10G Ábra	0h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0002	Dunn test		5,5,7,7
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0018	
	6h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0001	Dunn test		8,6,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7-/- SAL	0,0039	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0164	
	24h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		7,6,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7-/- SAL	0,0197	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0007	
	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		7,6,7,7
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7-/- SAL	0,0016	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	0,0159	
11A Ábra	48h	Two-way ANOVA following a logarithmic transformation	$F_{\text{interaction (1, 69)}} = 5,203$	0,0256	Tukey's post-hoc test		11,26,21,21
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	0,0047	
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7-/- SAL	<0,0001	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	<0,0001	
11B Ábra	48h	Two-way ANOVA following a logarithmic transformation	$F_{\text{interaction (1, 52)}} = 33,42$	P<0,0001	Tukey's post-hoc test		10,26,18,19
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	<0,0001	
					P2X7+/+ PIC vs. P2X7-/- PIC	<0,0001	
					P2X7-/- SAL vs. P2X7-/- PIC	0,0184	
11C Ábra	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,155	Dunn test		7,11,18,18
					n.s.		
11D Ábra	48h	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 73)}} = 14,74$	0,0003	Tukey's post-hoc test		11,26,19,21
					P2X7+/+ SAL vs. P2X7+/+ PIC	0,0225	

					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	<0,0001	
11E Ábra	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		6,14,19,19
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	<0,0001	
					P2rx7-/- SAL vs. P2rx7-/- PIC	0,0023	
11F Ábra	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0004	Dunn test		11,12,21,21
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0385	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0251	
12B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 79)}} = 10,7055$	0,001585	Tukey's post-hoc test		25,23,20,15
					SAL-VEH vs. PIC-VEH	0,044496	
					PIC-VEH vs. PIC-JNJ	0,000507	
12C Ábra	-	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0129	Dunn test		25,23,20,15
					SAL-VEH vs. PIC-VEH	0,0183	
12D Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 79)}} = 5,2416$	0,024722	Tukey's post-hoc test		25,23,20,15
					SAL-VEH vs. PIC-VEH	0,046225	
					PIC-VEH vs. PIC-JNJ	0,005494	
					PIC-VEH vs. SAL-JNJ	0,026462	
12E Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 79)}} = 0,0005781$	0,980878	Tukey's post-hoc test		25,23,20,15
					n.s.		
12F-G Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 8)}} = 31,3368$	0,000511	Tukey's post-hoc test		3,3,3,3
					SAL-VEH vs. PIC-VEH	<0.0001	
					PIC-VEH vs. PIC-JNJ	0.0003	
					PIC-VEH vs. SAL-JNJ	<0.0001	
12H-I Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction (1, 33)}} = 0,3257$	0,5721	Tukey's post-hoc test		10,13,6,8
					n.s.		
Kieg. 1A Ábra	0h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		5,6,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0592	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0013	
	6h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0067	Dunn test		5,6,7,7
					n.s.		
	24h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		5,6,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,01	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0039	

	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		5,6,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0084	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0046	
Kieg. 1B Ábra	0h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,1096	Dunn test		5,5,7,7
					n.s.		
	6h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0322	Dunn test		5,5,7,7
					n.s.		
	24h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,2839	Dunn test		5,5,7,7
					n.s.		
	48h	All the values are zero, so no statistical test is needed		-	-		5,5,7,7
Kieg. 1C Ábra	0h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,0415	Dunn test		5,5,7,7
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,034	
	6h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,2839	Dunn test		5,5,7,7
					n.s.		
	24h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,4485	Dunn test		5,5,7,7
					n.s.		
	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	0,3119	Dunn test		5,5,7,7
					n.s.		
Kieg. 2A Ábra	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		8,12,21,21
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	<0,0001	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	<0,0001	
Kieg. 2B Ábra	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		7,12,21,18
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	0,0088	
					P2rx7+/+ PIC vs. P2rx7-/- PIC	0,0015	
Kieg. 2C Ábra	48h	Nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis)	-	<0,0001	Dunn test		8,12,20,20
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7+/+ PIC	0,0043	
					P2rx7+/+ SAL vs. P2rx7-/- SAL	<0,0001	

Kieg. 3A Ábra	-	Unpaired t test (Two-tailed)	-	0,7709	-	-	13, 11
Kieg. 3B Ábra	-	Unpaired t test (Two-tailed)	-	0,1171	-	-	12, 11
Kieg. 3C Ábra	-	Unpaired t test (Two-tailed)	-	0,7609	-	-	13, 11
Kieg. 3D Ábra	-	Unpaired t test (Two-tailed)	-	0,9573	-	-	13, 11

5. Kiegészítő táblázat – statisztika II.

Ábra	-	Statisztikai módszer	Chi square	-	df	p-érték	Elemzés (n)
13A Ábra	-	Log-rank (Mantel-Cox) test	7.242	-	1	0.007	6, 30
Ábra	-	Statisztikai módszer	Interakciós F-érték	p-érték	Post-hoc teszt	p-érték	Elemzés (n)
13B Ábra	-	Repeated two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (10, 140) = 10.90$	$P < 0,0001$	Sidak	3-7. nap: $< 0,0001$; 8. nap: 0,0012; 9. nap: 0,0156	6, 10
14B Ábra	-	Unpaired t-test	-	0.0181	-	-	8, 6
14C Ábra	-	Unpaired t-test	-	0.2115	-	-	8, 6
14D Ábra	-	Mann-Whitney test following log transformation	-	0.0152	-	-	8, 6
14E Ábra	-	Unpaired t-test	-	0.0456	-	-	8, 6
14F Ábra	-	Unpaired t-test	-	0.3163	-	-	8, 6
15A Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 3912$	0.047	Tukey's		
					SARS-CoV2 MA10 vs. SARS-CoV2 MA10 + JNJ	0,0376	6, 6, 4
15B Ábra	-	One-way ANOVA after log transformation	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 6720$	0.01	Tukey's		
					SARS-CoV2 MA10 vs. SARS-CoV2 MA10 + JNJ	0,0080	6, 6, 4
15C Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} [(2, 13) = 0,07175]$	0.931	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
15D Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 22,15$	$p < 0.001$	Tukey's		
					Control vs. SARS-CoV2 MA10	$< 0,0001$	6, 6, 4
					SARS-CoV2 MA10 vs. SARS-CoV2 MA10 + JNJ	0,0006	6, 6, 4
15E Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 5498$	0,019	Tukey's		
					Control vs. SARS-CoV2 MA10	0,0144	6, 6, 4
15F Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 1038$	0.382	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
16A Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 0,8595$	0.446	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
16B Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}} (2, 13) = 1657$	0.229	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4

16C Ábra	-	One-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(2, 13) = 0,2746$	0.764	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
17A Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(16, 117) = 0,3450$	0.991	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
17B ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(16, 117) = 0,9799$	0.483	Tukey's		
					Control vs. SARS-CoV2 MA10 + JNJ	0,0263	6, 6, 4
18A Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(4, 39) = 0,5839$	0.6762	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
18B Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(4, 39) = 0,08208$	0.9874	Tukey's		
					n.s.		6, 6, 4
18C Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(4, 39) = 0,3742$	0.8256	Tukey's		
					SARS-CoV2 MA10 vs. SARS-CoV2 MA10 + JNJ	0,0432	6, 6, 4
18D Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(4, 39) = 2,889$	0.0346	Tukey's		
					Control vs. SARS-CoV2 MA10	0,0008	6, 6, 4
					SARS-CoV2 MA10 vs. SARS-CoV2 MA10 + JNJ	0,0127	6, 6, 4
18E Ábra	-	Two-way ANOVA	$F_{\text{interaction}}(4, 39) = 0,7728$	0.5496	Tukey's		
					Control vs. SARS-CoV2 MA10	0,0313	6, 6, 4