A TRPA1 receptor, mint potenciális gyógyszer-célpont neurodegeneratív és neuroinflammációs betegségek

kezelésében

PhD-értekezés



Dr. Kriszta Gábor

gyógyszerész

Gyógyszertudományok Doktori Iskola Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika Témavezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet Szentágothai János Kutatóközpont Pécs, 2022

1	٦ ا	Fartalon	n	
2	F	Rövidíté	sek jegyzéke	4
3	E	śs	6	
	3.1	Neu	ırodegeneratív és neuroinflammációs betegségek	6
	3.2	Scle	rosis Multiplex	7
	Э	3.2.1	Klinikailag izolált szindróma (CIS)	7
	3	3.2.2	Relapszáló-remittáló forma (RRMS)	7
	-	3.2.3	Másodlagos progresszív forma (SPMS)	8
	Э	3.2.4	Primer progresszív forma (PPMS)	8
	Э	3.2.5	Az SM patológiája	8
	3.3	Álla	tetikai megfontolások	9
4	S	Sclerosis	multiplex állatmodelljei	. 10
	4.1	Α ςι	uprizone indukálta demielinizációs modell jellemzői	. 10
5	ļ	A TRPA-1	1 receptor (Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1) szerepe és jelentősége a	
d	emie	elinizáci	ó folyamatában	. 12
6	C	Célkitűzé	śsek	. 16
7 Anyagok és módszerek 1		Anyagok	és módszerek 1	. 17
	7.1	. TRP	A-1 teljes génhiányos egér-modell	. 17
	7.2	A kí	sérleti protokoll	. 17
	7.3	Оре	n Field teszt	. 18
	7.4	Y-m	aze teszt	. 19
	7.5	Me	chanociceptív küszöb és motoros teljesítőképesség mérése	. 20
	7.6	Mot	toros teljesítőképesség teszt	. 21
	7.7	MR	I-vizsgálat (Mágneses Magrezonanciás Képalkotás)	. 23
	7.8	Szöv	vettani vizsgálatok	. 25
	7	7.8.1	Luxol Fast Blue (LFB)	. 26
7.8.2 Adap		7.8.2 Adaptor	Immunhisztokémia, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) és Ionized Calcium-binding Molecule – 1 (Iba-1)	. 26
	7.9	Elek	tronmikroszkópia	. 27
	7.1	0 Stat	isztika	. 27
8	E	Eredmér	nyek 1 (teljes TRPA-1 génhiányos egerek)	. 28
	8.1	Álta	lános állapot leírása	. 28

	8.2	Mechanociceptív küszöb mérés és motoros teljesítőképesség	28
	8.3	Y-maze teszt	29
	8.4	Open-field teszt	30
	8.5	T2-súlyozott ¹ H MRI mérések	31
	8.6	Luxol-Fast-Blue festés a demielinizáció fokának megállapítására a 3. héten	32
	8.7	Asztrocita és mikroglia/makrofág akkumuláció és aktiváció	33
	8.8	Elektronmikroszkópos vizsgálat	34
9	TR	PA-1 szelektív antagonistával történő gátlásának hatása	35
10) Dis	szkusszió 1	36
11	. TR	PA-1 GFAP-Cre kondicionált KO egérmodell	42
12	2 An	yagok és módszerek 2	43
	12.1	Genotipizálás	43
	12.2	TRPA-1 kvantitatív RT-PCR	43
	12.3	Szövettani vizsgálatok	44
	12.4	MRI-vizsgálat (Mágneses Magrezonanciás Képalkotás)	44
	12.5	MR spektroszkópia fejlesztése	44
13	Ere	edmények 2 (GFAP-Cre TRPA-1 kondicionált KO)	49
	13.1	TRPA-1 kvantitatív RT-PCR eredmények	49
	13.2	MRI eredmények	50
	13.3	A demielinizáció fokának vizsgálata LFB festéssel és MBP immunhisztokémiával	51
	13.4	Mikroglia/makrofág aktiváció és akkumuláció vizsgálata immunhisztokémiával	53
	13.5	MR spektroszkópia	54
14	Dis	szkusszió	56
15	i Új	eredmények összesítése	58
16	6 Az	értekezés alapjául szolgáló publikációk listája	58
17	' To	vábbi publikációk listája	59
18	S Kö	szönetnyilvánítás	60
19) Hiv	vatkozások	61

2 Rövidítések jegyzéke

- Bcl-2 B-cell Lymphoma 2
- BNO Betegségek Nemzetközi Osztályozása
- BSA Bovine Serum Albumine
- CIS Clinically Isolated Syndrome
- Cr+pCr Creatine + phosphocreatine
- CV Cresyl Violet
- DICOM Digital Image Communication
- DPA Dynamic Plantar Aesthesiometer
- DRG Dorsal Root Ganglion
- EAE Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
- ERK Extracellular Signal-Regulated Kinases
- FGF-2 Fibroblastic Growth Factor 2
- FOV Field of View
- GABA Gamma Amino Butter Acid
- GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein
- HLSVD Hankel Lánczos Single Value Decompositon
- IBA-1 Ionized Calcium-binding Adaptor Molecule
- ICH Intracerebral Hemorrhage
- ICV Intracerebroventricular
- IGF-1 Inzuline-like Growth Factor
- LFB Luxol Fast Blue
- LILFU Low Intensity Low Frequency Ultrasound
- MAO Monoamine Oxidase
- MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase
- MBP Myelin basic protein
- MR Magnetic Resonance
- MRI Magnetic Resonance Imaging

- NAA N-acethyl aspartate
- NFKB Nuclear Factor Kappa-B
- OPC Oligodendroglia Prekurzor Cell
- **OVS Outer Volume Suppression**
- PBS Phospahte Buffered Saline
- PDGFa Platelet Derived Growth Factor Subunit A
- PPMS Primary Progressive Multiple Sclerosis
- QPCR Qunatitative Polymerase Chain Reaction
- RARE Rapid Aquisition with Relaxation Enhancement
- ROI Region Of Interest
- SM Sclerosis Multiplex
- RRMS Relapsing Remitting Multiple Sclerosis
- SPMS Secondary Progressive Multiple Sclerosis
- TRPA Transient Receptor Potential Ankyrin
- WT Wild Type

3 Bevezetés

3.1 Neurodegeneratív és neuroinflammációs betegségek

Az egészségügyi ellátás javulásával a világban egyre inkább előtérbe kerülnek az elsősorban időskorban kialakuló idegrendszert érintő betegségek. Ezek a kórképek általában erősen lerontják az életminőséget, hosszan tartó ápolást és gyógyszeres kezelést tesznek szükségessé, amelyek komoly terhet jelentenek mind az egészségügyi ellátórendszernek, mind pedig a beteg családjának, környezetének.

A legnagyobb probléma ezekkel az elváltozásokkal hogy jelenlegi tudásunk szerint nem létezik végleges és hatékony terápia. Kutatásaink során nem a "Bölcsek kövét" kerestük, csupán hozzá szeretnénk tenni néhány új kísérletes eredményt, ezen betegségek korai felismeréséhez, tüneteik enyhítéséhez, a kialakult patológiás folyamatok lassításához, megfékezéséhez, visszafordításához. Munkánk során a sclerosis multiplex állatmodelljén tanulmányoztuk a patomechanizmust, a kialakuló tüneteket, illetve olyan vizsgálati protokollokat fejlesztettünk ki, amelyek egyszerűbbé teszik a progresszió nyomon követését és lehetőséget biztosítanak a potenciális intervenciós pontok azonosítására.

PhD munkám megkezdésekor a sclerosis multiplex-et választottam kutatásaim tárgyává. Intézetünkben nem előzmények nélküli a téma iránti érdeklődés, a korábban folyó munkálatokra támaszkodva kezdem el kutatásaimat. A neurodegeneratív folyamatok és a TRPA (tranziens receptor potenciál ankyrin) ioncsatornák közötti kapcsolatról is közöltek a kollégák korábban jeles publikációkat (Sághy, Sipos et al. 2016). Abban a szerencsés helyzetben vagyok, hogy munkáim kezdetén még segítségemre volt Szolcsányi János professzor, aki a szenzoros neurofarmakológia világszinten is elismert szakértője volt. Komoly tudományos műhelybe volt tehát szerencsém bekapcsolódni.

Erős igény mutatkozott egy olyan komplex vizsgálati módszer kidolgozására, amely lehetővé teszi a különböző neurodegeneratív modellek tanulmányozását. Korábban az egyetemi évek alatt már elkezdtem mágneses magrezonanciás módszerekkel dolgozni (szakdolgozatomat is ebben a témában írtam), így rendelkeztem némi tapasztalattal a

6

metodika alkalmazásában. A mágneses magrezonanciát kiterjedten alkalmazzák a humán SM diagnosztikájában is mind funkcionális, mind morfológiai vizsgálatok kivitelezéséhez.

3.2 Sclerosis Multiplex

A sclerosis multiplex (SM), a központi idegrendszert érintő krónikus gyulladásos autoimmun betegség, amely károsítja az agy és gerincvelő idegrostjait borító mielinhüvelyt. Az idegrendszer változatos területein gyulladások keletkeznek, ahol az immunrendszer aktivációja folyamán az idegsejtek végső soron elpusztulnak. A gyulladások után ezek a területek hegesednek, amelyeknek nagy része nem okoz tüneteket. Az egyre elhatalmasodó kórfolyamatot a későbbiekben multifokális tünetek jellemzik, amelyek érinthetik az agytörzs, a látóideg, a kisagy és a gerincvelő idegeit is (Sand 2015). Patomechanizmusát a váltakozó relapszusok és remissziók, illetve a folyamatos, lassú progresszió jellemzik. Kezelését jelenleg a relapszusok tüneti kezelése és a krónikus autoimmun folyamatok fékezése jelenti. Az SM nem klasszikus időskori idegrendszeri betegség, mivel az alarmírozó tünetek leggyakrabban már fiatal felnőttkorban jelentkeznek. A kórlefolyás élethosszig tart és előbb-utóbb rokkantsághoz vezet. Klinikai képe alapján több típusa azonosítható (NMSS 2022) (National Multiple Sclerosis Society, USA).

3.2.1 Klinikailag izolált szindróma (CIS)

A CIS a neurológiai tünetek első epizódja, amelyet a központi idegrendszer gyulladása és demielinizációja okoz. Ennek az epizódnak legalább 24 órán át kell tartania, a szklerózis multiplexre jellemzően, azonban nem elégséges a diagnózis felállításához. Ha a CIS-t az agyi MRI-vel is kimutatható elváltozások kísérik, akkor az érintett személynél nagy a valószínűsége a neurológiai tünetek második epizódjának és a relapszáló-remittáló MS kialakulásának. A CIS-ben szenvedő, az MS kialakulásának magas kockázatának kitett egyének kezelhetők olyan betegségmódosító terápiával, amely késlelteti az MS kialakulását.

3.2.2 Relapszáló-remittáló forma (RRMS)

Ezt a formát jellegzetes rohamok jellemzik, amelyeket részleges vagy teljes gyógyulás (remisszió) időszakai követik. A remissziók során akár az összes tünet eltűnhet. A betegség azonban a remissziós időszakok alatt is progrediál. Az RRMS-t tovább lehet jellemezni aktívnak

vagy nem aktívnak (MRI-eredmények alapján), valamint romlónak (az életminőség romlása esetén) vagy nem romlónak.

3.2.3 Másodlagos progresszív forma (SPMS)

Az SPMS kezdetben relapszáló-remittáló lefolyású. Az RRMS-sel diagnosztizált betegek egy része idővel átmegy a másodlagos progresszív lefolyásba, amelyben a neurológiai funkciók fokozatos lassú hanyatlása következik be.

3.2.4 Primer progresszív forma (PPMS)

A PPMS-t a tünetek megjelenésétől kezdve a neurológiai funkciók gyors romlása jellemzi, korai remissziók nélkül. A betegség legagresszívebb és legrosszabb prognózisú formája.

3.2.5 Az SM patológiája

A sclerosis multiplex esetén a központi idegrendszerben plakkok alakulnak ki. Ezek a plakkok az agyban és a gerincvelőben, elsősorban a kamrák körüli fehérállományban, a látóidegekben és -pályákban, a corpus callosumban, a kisagyi pedunculusokban, a hosszú pályákban és a gerincvelőben illetve az agytörzsben alakulnak ki, de a szürkeállományban is megtalálhatók. A betegség minden formájában megfigyelhetőek, de mennyiségükben és összetételükben eltérnek a betegség egyes formái között, illetve a progresszió során változnak is. Ezek a plakkok bár heterogének, általában demielinizált axonokat és maradványaikat, oligodendrocitákat, asztrocitákat, valamint perivenularis, illetve parenchymás infiltrátumokat (limfociták és makrofágok is) tartalmaznak. A progresszív fázisban a szürke- és fehérállomány-atrófiája mutatható ki, gyulladás és mikroglia-aktiváció jellemző a plakkok határainál, a plakkokon kívüli normálisnak tűnő fehérállomány diffúz károsodásával karöltve. A minden forma esetében kialakuló demielinizáció minden esetben immunológiai reakció eredménye is. A mielinhüvely különösen sérülékeny az immunsejtek által termelt nem specifikus termékekkel szemben, mint például a citotoxikus citokinek, az excitotoxinok, a reaktív oxigén- vagy nitrogén-oxid speciesek. Gyakran megfigyelhetőek az antitest- és komplement-asszociált elváltozások, valamint a hipoxia-szerű szöveti sérülés, amelyben a demielinizáció megindulása az oligodendrociták apoptózisának tulajdonítható. Az asztrociták megváltozott jelátvitele szintén a mielinizáció zavaraihoz vezet (Huang, Chen et al. 2017).

Az esetek nagyjából 85%-a relapszáló-remittáló osztályba sorolható. Magyarországon a prevalencia 3-5/100 000 (BNO alapján, G35H0) tehát nagyságrendileg 8000 pácienst érint és évente 300-500 új diagnózis születik, ez hozzávetőleg megegyezik az évente elvesztett betegek számával (OEP 2010)

A betegség kezelésére világszerte komoly erőforrásokat fordít a tudományos közösség. A megoldás megtalálásához természetesen a pontos kórlefolyás ismerete elengedhetetlen, PhD munkám ehhez a feladatkörhöz csatlakozott.

3.3 Állatetikai megfontolások

Mivel az SM egy igen komplex és változatos kórkép, így nem állnak rendelkezésünkre megfelelő in silico, in vitro eljárások a kutatásokhoz. Jelenleg az egyetlen járható út, transzlálható állatmodellek alkalmazása. Ez természetesen számos etikai és lelkiismereti kérdést felvet, ezért munkám során különösen fontos volt a lehető legkisebb számú élő állat felhasználása. Egyik fontos előnye az általam alkalmazott képalkotó eljárásoknak, hogy ismételhetőek, így lehetőséget adnak arra, hogy egyetlen állat felhasználása árán többszöri mérési adatot nyerhessünk, illetve önkontrollos elrendezésre is alkalmasak. A munkám során természetesen mindig a hatályos állatvédelmi törvények és az általános tudomány-etikai kódex megfontolásai alapján dolgoztam.

4 Sclerosis multiplex állatmodelljei

Table 1

Az SM esetében sajnos nem áll rendelkezésre olyan állatmodell, amely minden elemében reprodukálni tudná a humán SM patológiáját, tüneteit és kórlefolyását, így mindig az adott

Model of MS	Mechanism	Application	Involved cells	Translational value	Main references
Relapsing remitting EAE in SJL/J mice	Immunization of SJL/J mice with $PLP_{139-151}$	Study of neuroinfimmation and immune system activation	CD8, CD4, Th17, monocytes, macrophages, B cells, Treg cells	Relapsing-remitting MS, study of the relapse rate, testing therapeutical agents	Zamvil et al., 1985; McRae et al., 1995; Whitham et al., 1991; Miyagawa et al., 2010; Adlard et al., 1999
Chronic EAE in C57BL/6J mice	Immunization of C57BL/6J mice with MOG_{35-55}	Study of neuroinflmmation and immune system activation	CD8, CD4, Th17, monocytes, macrophages, B cells, Treg cells	Primary progressive MS, secondary progressive MS, testing therapeutical agents	Mendel et al., 1995; Berard et al., 2010; Hjelmstrom et al., 1998; Bullard et al., 2007; Koh et al., 1992; Baron et al., 1993
EAE in transgenic mice	T cell clone (2D2) expressing Va and V β chains reacting specifically to MOG ₃₅₋₅₅ , or B cell heavy chain knock-in mouse strain (IgH MOG)	Study of neuroinfimmation and immune system activation	CD8, CD4, Th17, monocytes, macrophages, B cells, Treg cells	In vitro study of immune cell activation and function	Bettelli et al., 2003; Litzenburger et al., 1998; Jäger et al., 2009; Encinas et al., 1999; Anderson et al., 2012
Theiler's murine encephalomyeli- tis virus (TMEV)	Infection with picornavirus, such as Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	Study of axonal damage and inflammatory- induced demyelination	Macrophage/ microglia, oligodendrocyte, astrocytes and CD4, CD8	Primary progressive MS, study of brain, brainstem and spinal cord lesions, study of new therapeutic approaches targeting adhesion molecules, axonal degeneration	Tsunoda and Fujinami, 2010; Libbey and Fujinami, 2003; Owens, 2006; Tsunoda et al., 1996; Tsunoda et al., 2003
Cuprizone- induced MS	Feeding C57BL/6 mice with 0.2% cuprizone for 6 weeks	Study of the de- and re- myelination processes	Oligodendrocytes, astrocytes, microglia	Therapeutical trials designed to repress demyelination or accelerate remyelination	Matsushima and Morell, 2001; Blakemore and Franklin, 2008; Lucchinetti et al., 2000
Lysolecithin- induced MS	Lysolecithin injection in SJL/J mice	Study of the de- and re- myelination	Oligodendrocytes, astrocytes, microglia	Therapeutical trials designed to repress demyelination or accelerate remyelination	Jeffery and Blakemore, 1995; Shields et al., 1999; Bieber et al., 2003

1. Ábra. (Procaccini, De Rosa et al. 2015)

tudományos kérdésnek megfelelően kell megválasztani az alkalmazott modellt. Az irodalomban több eljárás is meghonosodott, amely alkalmas lehet erre a feladatkörre. A jelenleg használatos modellekről Procaccini és munkatársai készítettek egy szemléletes összefoglaló táblázatot 2015-ben (Procaccini, De Rosa et al. 2015).

Mivel intézetünkben első sorban a mielinizáció változásaival foglalkoztunk, így vizsgálatainkhoz a cuprizone indukálta demielinizációs modellt választottuk (Matsushima and Morell 2001).

4.1 A cuprizone indukálta demielinizációs modell jellemzői

A cuprizone által kiváltott kísérleti demielinizáció megfelelő rágcsálómodell (egérben) a mielin elvesztéséhez vezető folyamatok tanulmányozására. A modellben jelentős limfocita válasz nem alakul ki (Remington, Babcock et al. 2007). A legfőbb szövettani jellemzők jól egyeznek a humán III típusú SM lefolyásánál megfigyelteknél (Torkildsen, Brunborg et al. 2008, Kipp, Clarner et al. 2009, Acs and Kalman 2012). A cuprizone által kiváltott hatások közül időben az első az érett oligodendrociták apoptózisa, amely az érintett területek primer demielinizációjában érhető tetten, ez a jelenség leglátványosabban a corpus callosum területén jelenik meg (Blakemore 1972, Komoly, Hudson et al. 1992, Mason, Langaman et al. 2001). A későbbiekben megfigyelhető diffúz asztrocita aktiváció, illetve mikroglia és makrofág invázió (Praet, Orije et al. 2015). Ezen reakciók mögött kettős szerep sejthető, egyfelől szerepük van a demielinizáció kialakulásában, másfelől a kísérletek későbbi szakaszában remielinizációs folyamatok is megfigyelhetőek (Pasquini, Calatayud et al. 2007, Kang, Liu et al. 2012, Voß, Škuljec et al. 2012). Minden valószínűség szerint a két folyamat párhuzamosan indul el és egyfajta elbillent egyensúly alakulhat ki a két ellentétes előjelű jelenség között.

A korábbi években fény derült néhány növekedési faktor szerepére is a patogenezisben (Gudi, Gingele et al. 2014). Az aktivált asztrociták és makrofágok többféle növekedési faktort is termelhetnek a kórlefolyás alatt, amelyek a különböző sejttípusokra más és más hatásokat képesek kifejteni, továbbá egymás hatásaival is interferálnak. Lényeges eleme a rendszernek az oligodendrocita progenitor sejtek proliferációjának serkentése, továbbá az érett oligodenrociták differenciációjának szabályozása is. A növekedési faktorok alapvetően meghatározzák a környező sejtek apoptózis/túlélés esélyeit is. A fibroblaszt eredetű növekedési faktor 2 (FGF-2), illetve a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGFα) a differenciálódás irányába tolja a sejteket és visszafogja a proliferációt. Az inzulinszerű növekedési faktor ezzel szemben (IGF-1) az oligondendrocita differenciációt lassítja (Gudi, Gingele et al. 2014).

Tovább árnyalja a helyzetet, hogy a folyamatba beavatkozhatnak a Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) géncsalád tagjai mind pro,- mind antiapoptotikus oldalon (Itoh, Itoh et al. 2003). Lindsten és munkatársai már 2000-ben leírták, hogy képesek lehetnek például citokróm C felszabadításra (Lindsten, Ross et al. 2000). Li és munkatársai pedig in vitro oligodendrocita tenyészetben mutatták ki, hogy a p53-nak rendkívül erős proapoptotikus hatásai vannak, melynek következtében kiterjedt sejtelhalás és következetes demielinizáció lép fel, mikroglia aktivációval kísérve (Li, Zhang et al. 2008).

Mindezekkel együtt nyilvánvalóvá válik, hogy mennyire sokrétűen szabályozott folyamatok zajlanak a háttérben és mennyire komplex rendszert próbálunk meg feltérképezni. Másik oldalról azonban kitűnik az is, hogy sok lehetőségünk lehet az intervencióra. Mindezeket mérlegelve döntöttünk a cuprizone modell alkalmazása mellett.

A TRPA-1 receptor (Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1) szerepe 5 és jelentősége a demielinizáció folyamatában

A TRPA-1 receptor a TRP receptor szupercsalád egyik tagja, amely magában foglal összesen 28 hasonló receptort, nem szelektív kationcsatorna (Clapham, Runnels et al. 2001). Többféle exogén stimulus is aktiválhatja, allicin, mustárolaj, allil-izotiocianát, fahéjaldehid, és egyéb elektrofil ágensek (Bandell, Macpherson et al. 2007, Bautista 2015). Ezen felül endogén anyagok is képesek aktiválni, például a teljesség igénye nélkül; 8-iso-prosztaglandin, 15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin (Cruz-Orengo, Dhaka et al. 2008, Andersson, Gentry et al. 2012, Andersson, Gentry et al. 2013), hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (Motter and Ahern 2012), formaldehid, hidrogénszulfid és a hidrogén-peroxid is (Andersson, Gentry et al. 2012, Andersson, Gentry et al. 2013).



PLA2 pathway

2. Ábra. (Gouin, L'herondelle et al. 2017)

Fiziológiás szerepe ezek alapján a gyulladásos folyamatok jelzésében és jelátvitelében lehet jelentős, mivel a felsorolt – egyébként nagyrészt toxikus – metabolitok jellemzően nem az egészséges, sokkal inkább a gyulladt, károsodott szövetben halmozódnak fel. Az irodalomban fellelhető információk alapján a TRPA-1 egyfajta "oxidatív stressz szenzor" szerepet tölthet be. A mechanikai vagy hidegártalom szintén képes megnyitni a csatornát (Story, Peier et al. 2003, Andersson, Gentry et al. 2012, Andersson, Gentry et al. 2013) és meghatározó szerepe van a fájdalom érzékelésében is. Szerteágazó folyamatokban vehet részt a különböző fiziológiás és patológiás folyamatok jelátvitelében, kapcsolatba hozták már korábban colitisszel (Engel, Leffler et al. 2011), asztmával (Grace, Baxter et al. 2014), migrénnel (Dussor, Yan et al. 2014), cisztitisszel (DeBerry, Schwartz et al. 2014), de még a viszketés érzésének kialakulásával is (Wilson and Bautista 2010).

Első sorban a primer afferens szomatoszenzoros kéregben jelenik meg nagyobb mennyiségben. Kifejeződését leírták már a trigeminusban, ganglionokban, DRG-ben (Nagata 2007). Az idegrendszeren kívül is jelen van több helyen, keratinocitákban, tüdő fibroblastban, illetve vaszkuláris endothel sejtekben is (Nilius, Voets et al. 2005).

Az elektrofiziológiai vonatkozásban leginkább a Ca2⁺-áram kialakításában van a legjelentősebb szerepe (nem szelektív kationcsatorna). Shigetomi és munkatársai leírták, hogy a TRPA-1 gátlásával – akár antagonistával, akár silencing RNS-sel meggátolható a Ca2⁺- beáramlás primer asztrocita tenyészetben (Shigetomi, Jackson-Weaver et al. 2013). Ugyancsak megfigyelték, hogy a TRPA-1 gátlás GABA-erg tónusfokozódással jár a hippocampus interneuronjaiban (Shigetomi, Tong et al. 2012). Patkányban is kimutatták GFAP pozitív asztrocitákban (Lee, Cho et al. 2012).

Oligodendrocitákon való megjelenését először 2016-ban írták le in situ hibridizációs technikával (Hamilton, Kolodziejczyk et al. 2016). Szintén Hamilton csoportja írta le, hogy a TRPA-1 gátlása csökkenteni tudta az ischaemia hatására kialakuló, Ca2⁺-áram mediálta mielinpusztulást in vitro vizsgálatokban, ezért potenciálisan célpontja lehet egy demielinizáció ellenében ható gyógyszer fejlesztésének. Nemrég jelent meg egy új cikk a témában, amely

13

leírja hogy a gliális TRPA1 szabályozhatja a neuronális excitatibilitást a fehérállományban mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között (Lajoso, Flower et al. 2021).

Intézetünkben már korábban publikálásra került egy közlemény, amelyben bizonyítást nyert, hogy a TRPA-1 receptor széles körben kifejeződik az egér központi idegrendszerében, illetve hogy knockout állatokban enyhébbek a cuprizone hatására megjelenő demielinizációs tünetek (Sághy, Sipos et al. 2016). A korábbiakban leírtak alapján fontos kitérni arra, hogy a károsodás hatására azzal feltehetően egy időben, vagy időben szorosan követve azt, megindul egy spontán remielinizáció is (Mason, Langaman et al. 2001, Acs and Kalman 2012, Gudi, Gingele et al. 2014). Az viszont egyelőre nem világos, hogy a demielinizáció enyhítésén, vagy esetleg a spontán kialakuló remielenizáció erősítésén, elősegítésén keresztül alakul ki a TRPA-1 gátlása vagy hiánya által létrehozott protektív hatás. Korábbi eredményeink alapján arra jutottunk, hogy a cuprizone adagolása érdemben nem növeli az OPC (oligodendroglia prekurzor sejt) sejtek számát vagy differenciációját, annak ellenére sem, hogy a mielinvesztés és oligodendrocita pusztulás önmagukban is képesek mind az asztrociták, mind a microglia/makrofág sejtek aktivációjára. Ugyancsak bizonyítást nyert, hogy a TRPA-1 receptor hiányában megváltozik a makrofág inváziós mintázat, illetve kevésbé erős aktiváció figyelhető meg asztrocita vonalon egyaránt (Sághy, Sipos et al. 2016). Ezen gyulladásos reakciók enyhébb lefutásával korrelál a kisebb mérvű mielinvesztés is. Ezek az eredmények vezettek minket arra a következtetésre, hogy a TRPA-1 receptornak szerepe lehet az oligodendroglia – asztrocita jelátvitelben és a következményesen kialakuló immunmediált mielinvesztésben is. Ezt a teóriát erősíti az a tény is, hogy fiziológiás körülmények között leírták a TRPA-1 szerepét az asztrocita funkciók modulálásában (Shigetomi, Tong et al. 2012, Shigetomi, Jackson-Weaver et al. 2013), illetve, hogy az asztrociták által felszabadított gyulladásos faktorok közvetlenül és alapvetően befolyásolják az oligodendroglia apoptotikus hajlamát is (Linares, Taconis et al. 2006, Zeger, Popken et al. 2007, Kang, Liu et al. 2012, Gudi, Gingele et al. 2014). A cuprizone indukálta apoptózis minden valószínűség szerint ERK1/2 – p38-MAPK jelátviteli útvonal zajlik, amihez azonban Ca²⁺-influx szükséges, amelyet részben a TRP csatornák hoznak létre. Ezen csatornák hiánya, csökkent száma, vagy működésképtelensége megnehezítheti az apoptotikus jelétvitel lefolyását (Veto, Acs et al. 2010, Sághy, Sipos et al. 2016).



3. Ábra. (Sághy, Sipos et al. 2016)

Meg kell jegyezni továbbá, hogy sokáig az oligodendrocitákon nem sikerült TRPA-1 kifejeződést kimutatni (Hamilton, Kolodziejczyk et al. 2016), a hatást tehát a közelmúltig kizárólag egy asztrocita-oligodendrocita irányú juxtakrin és/vagy parakrin kommunikációnak tulajdonították, amelyben az asztrocita proapoptotikus jeleket küld a környezetében lévő oligodendrocitáknak, ezzel kiváltva azok pusztulását. Mivel a károsodás jóval kisebb mértékben és némileg modulálva, de megjelenik TRPA-1 receptor hiányában is, így nagy valószínűséggel több, végeredményében redundáns proapoptotikus jelátviteli útvonal is elindul, ezek egyikének gátlásával alakul ki a protektív hatás.

6 Célkitűzések

Az eddig leírtak alapján látható, hogy mennyire komplex és szerteágazó területről van szó, amelyben komoly gyógyszerfejlesztési potenciál rejlik. Gyógyszerészként ez különösen izgalmas.

Az irodalmat áttekintve az látszik, hogy ez a modell alkalmas lehet egy valódi preklinikai gyógyszerfejlesztési rendszernek, ha megfelelő vizsgálati módszereket teszünk mellé. Munkánk egyik első lépéseként ki kellett fejlesztenünk egy olyan komplex vizsgálati protokollt, amely kellően robosztus és megfelelő áteresztő képességgel is rendelkezik ahhoz, hogy jobban megvizsgálhassuk a kórfolyamatokat. Mivel az irodalomban nem volt ismert olyan vizsgálati protokoll, amely időben feloldva, önkontrollos elrendezésben lehetővé tenné a neurodegenerációs modellek vizsgálatát a rendelkezésünkre álló műszeres lehetőségek mellett, ezért célul tűztük ki egy ilyen vizsgálati keretrendszer felállítását.

Célunk volt, hogy feltérképezzük a cuprizone modell lefolyása alatt végbemenő morfológiai, mikrostrukturális változásokat elektronmikroszkópiával és MRI-vel, illetve a magatartásbeli eltéréseket is. Mivel a metabolikus változások kapcsán gyakorlatilag sötétben tapogatózunk, ezért kísérletet teszünk az anyagcsere eltérések nyomon követésére is in vivo, ezt MR-spektroszkópiával terveztük véghez vinni, amelyre jelenleg rendkívül kevés példa van az irodalomban (Orije, Kara et al. 2015), az is más fókusszal készült. Ez a módszer reményeink szerint alkalmas lehet korai diagnosztikára is, amelyre jelenlegi ismereteink szerint nincs lehetőség a humán SM klinikai gyakorlatában. A TRPA-1 receptor szerepét a kialakuló elváltozásokban genetikailag módosított – TRPA-1 teljes és GFAP-Cre kondicionális KO - egér modellen terveztük megfigyelni, ehhez szükséges volt létrehoznunk magát a TRPA-1 GFAP-Cre kondicionált KO egér-törzset, mivel jelenleg ilyen törzs nem áll rendelkezésre.

A kísérletsorozatot 2 jól lekülöníthető fázisra lehet bontani, az abban felhasznált egerek genetikai kondíciója alapján, ezért értekezésemet is két részre bontottam.

7 Anyagok és módszerek 1

7.1 TRPA-1 teljes génhiányos egér-modell

Első körben teljes KO egér törzsön vizsgáltuk meg a TRPA-1 szerepét a cuprizone modellben.

A TRPA-1 ^{+/+} és TRPA-1 ^{-/-} állatokat egyaránt intézetünkben tenyésztettük és tartottuk a kísérletek alatt. Legfeljebb 8 állat volt egy szabványos polikarbonát rekeszben. Az eredeti törzsből a heterozigóta párokat Pierangelo Geppetti professzortól kaptuk ajándékba (University of Florence, Olaszország). A törzs alapját C57/Bl6 egér adja és semmilyen káros fenotípusra utaló jelet nem írtak le az irodalomban, illetve mi magunk sem tapasztaltunk eltérést egyik vizsgálati módszerrel sem a TRPA-1 ^{+/+} és TRPA-1 ^{-/-} állatok között. Káros magatartásbeli eltérést sem mutattak az állatok sem a kontroll TRPA-1 ^{+/+} sem pedig a "standard" C57/Bl6 törzs egyedeivel összevetve.

7.2 A kísérleti protokoll

Egy széles körben elfogadott kísérleti eljárást alkalmaztunk (Hiremath, Saito et al. 1998, Matsushima and Morell 2001, Kipp, Clarner et al. 2009, Praet, Orije et al. 2015). A cuprizone-t (Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone) a porított rágcsáló táphoz keverve adagoltuk az állatoknak 0,2 m% koncentrációban, ad libitum 6 héten keresztül. Az állatokat a kísérletek végén feláldoztuk, perfundáltuk és a kipreparált agyakon kiterjedt szövettani vizsgálatokat végeztünk. A modellhez 8-12 hetes hím egereket használtunk fel. Az állatok fizikai/jóléti paramétereit minden kísérletben napi szinten monitoroztuk, testsúly mérést is végeztünk. Munkám során az állatokon fájdalomjelek, illetve egyéb neurológiai tünetek általában nem mutatkoztak, azonban az irodalom ismer ilyen jelenségeket (Liebetanz and Merkler 2006, Franco-Pons, Torrente et al. 2007), így erre külön figyelmet fordítottunk. Amennyiben bármi olyan jelet fedeztünk fel, amely az állatok jólétét a szükségesnél erősebben befolyásolta, kivontuk őket a kísérletből, de ez extrém ritkán fordult elő. Néhány tanulmányban leírtak azonban magatartásbeli, illetve szociális változásokat. Elsősorban alacsonyabb szociális interakciós készséget, illetve szorongást, továbbá fokozott exploratív viselkedést is megfigyeltek korábban (Xiao, Xu et al. 2008, Makinodan, Yamauchi et al. 2009, Xu, Yang et al. 2009, Xu and Li 2011). Ezeket a tényezőket én is vizsgáltam munkám során.

7.3 Open Field teszt

Az általános szorongás meghatározásának egyik módszere az Open Field teszt, amelynek során az állatok egy viszonylag nagyméretű arénába helyeztük (59 cm x 59 cm x 52 cm) 10 perc időtartamra. Az állatok nyílt téren történő tartózkodása és a fal mentén/sarkokba húzódva töltött idejének aránya korrelál az általános szorongásos viselkedéssel. Minél több időt tölt el az egér a fal mentén behúzódva, annál erősebb a szorongása. Ezzel a módszerrel vizsgálhatók például a humán szorongáscsökkentők hatásai is állatkísérletben, mint pozitív kontroll. Az állatok mozgását digitális kamerával rögzítettük, majd viselkedés analizáló szoftverrel kiértékeltük. Ezzel a módszerrel lehetőség van nem csak az adott pozíciókban eltöltött idő kvantifikálására, de a mozgással töltött idő és a mozgás átlagos sebességének meghatározására is. A szoftveresen kinyert adatokat minden kísérletben szúrópróbaszerűen validáltuk manuálisan is, több állat felvétele alapján.



4. Ábra. Open-field arénáról Noldus viselkedésanalizáló rendszerrel készített "heat-map", amely reprezentálja az állat által a területen eltöltött időt.

7.4 Y-maze teszt

A munkamemória működőképességének meghatározására használt teszt az "Yútvesztő". Ebben a kísérletben az állatok egy Y-alakú arénában töltenek el 5 percet, amely alatt alternálnak az Y három karja között. Az alternációk számából és minőségéből következtetni lehet a munkamemória funkcióképességére (Kraeuter, Guest et al. 2019). A teszt alatt videofelvételt készítettünk, amelyet viselkedésanalizáló szoftverrel kiértékeltünk (Noldus), majd a helyes alternációk számát, illetve az összes alternációt összevetettük a csoportok között.



5. Ábra. Egér az Y-maze útvesztőben.

7.5 Mechanociceptív küszöb és motoros teljesítőképesség mérése

Két módszerrel is mértük ezt a paramétert, von Frey filamentum módszerrel, illetve dinamikus plantáris aeszteziométerrel (DPA). Az egerek egy emelt, rácsos vizsgáló platformra kerültek és nyugalomban hagytuk őket, legalább 15 percig. A két mérést "egy menetben" végeztük el, köztük nem távolítottuk el az állatokat a vizsgálati modulból.

Először a von Frey filament vizsgálatot végeztük el, amelyben az egér talppárnájának nyomtunk 5 alkalommal egy adott vastagságú és merevségű filamentumot. Ha 5-ből 2-szer elhúzta az állat a lábát, azt pozitív válasznak értkeltük és az adott vastagságú filamenthez tartozó értéket rögzítettük, mint fájdalomküszöb értéket.



6. Ábra: von Frey filament (Ugobasile)

Néhány perccel az első vizsgálat után elvégeztük a DPA mérést is. Ebben a vizsgálatban egy tompa végű tűvel, emelkedő nyomóerővel terheltük az állat talppárnáját addig, amíg el nem húzta. A válasznál rögzített nyomóerőt rögzítettük, mint küszöbértéket. A nyomóerőt 10 g-nak megfelelő értéknél maximalizáltuk a sérülések elkerülésének érdekében. Minden lábnál elvégeztük a mérést 3 egymást követő alkalommal, majd átlagoltuk a kapott értékeket.

Fontos kiemelni, hogy ezekben a kísérletekben valódi fájdalmat, vagy sérülést nem okozunk az állatoknak, inkább csak kellemetlenségként élik meg a tesztet.



7. Ábra: A DPA készülék felépítése (AnimaLab)

7.6 Motoros teljesítőképesség teszt

A motoros erőt szintén kétféle módszerrel határoztuk meg. Először egy saját súllyal történő kapaszkodási teszttel mértük. Az állatokat egy rácsra helyeztük, amelyen kényelmesen meg tudnak kapaszkodni, majd a rácsot megfordítottuk, amelyen az egerek így lefelé lógva kapaszkodtak. Ezt e testhelyzetet az állatok önszántukból is gyakran felveszik, kedvelik. A rács kb. 30 cm magasságban volt elhelyezve egy alommal vastagon kibélelt doboz felett. Azt az időt mértük, amíg az állat képes volt a saját súlyát megtartani a doboz felett és ott rögzítettük az időt, amikor leugrott a dobozba. A tesztet maximum egy perc hosszan végeztük. A kísérlet megkezdése előtt 3 alkalommal habituáltuk az állatokat a kísérleti körülményekhez. A második teszthez egy úgynevezett RotaRod készüléket használtunk. Ez egy gyorsuló sebességgel forgó henger, amelyen az egérnek egyensúlyozva kell haladnia. A sebesség 4-ről 40 fordulat/percre nőtt 5 perc alatt. A cut-off értéket a leesés ideje adta meg. A forgó henger alatt ebben az esetben is puha padozatot helyeztünk el. A teszthez ebben az esetben is 3 alkalommal habituáltuk az állatokat.



8. Ábra: Rotarod készülék (AnimaLab)

A cuprizone kezelés alatt a motoros teszteket hetente egyszer végeztük el.

7.7 MRI-vizsgálat (Mágneses Magrezonanciás Képalkotás)

Mivel a korábban leírt vizsgálati eljárásokat nem tartottam kellően precíznek, így az is a céljaim között volt, hogy egy modern, a kor elvárásainak megfelelő, robosztus és ismételhető képalkotó eljárást dolgozzak ki a modell vizsgálatára.

Az MRI vizsgálat mindig egy kompromisszum az idő – felbontás – jel/zaj viszony között. Bármelyiket a másik kettő rovására tudjuk csak növelni. Mivel in vivo eljárásról van szó, így minimalizálni kell az állatokat ért terhelést, kiváltképp akkor, ha ismételt vizsgálatokat akarunk elvégezni minden állaton. A Szentágothai János kutatóközpontban rendelkezésre álló kisállat MRI (Bruker PharmaScan, 4,7 T) készüléken végeztem el a vizsgálatokat. A kísérletek egy több hetes fejlesztési periódus előzte meg, amelynek során fantomokon, illetve később élő állatokon is nagyszámú pilot mérést végeztem el. Ezen mérések során meg kellett határoznom a megfelelő FOV-ot (Field of View, az agy azon területét, amelyen a vizsgált paramétereket mérjük, praktikusan ahonnan az MRI-jel származik), ki kellett választani a megfelelő mérési szekvenciát (T2 RARE – Rapid Aquisition with Relaxation Enhancement) a megfelelő kiértékeléshez szükséges felbontást, a szeletkiosztás geometriáját, a szükséges és elégséges "average-ek" számát (azon egyedi mérési periódusok, amelyek összegzése alapján a végső mért értéket megkapjuk). Az így előállított vizsgálati setup-ot optimalizálni kellett továbbá a konkrét kísérleti kérdésfelvetéshez, illetve ki kellett dolgozni a kinyert nyers adatok reprodukálható kvantifikációjához szükséges post-processing lépéseket is. A változó mérési paraméterek igen nagy száma miatt ez egy hosszadalmas és kihívásokkal teli feladatnak bizonyult.

Az MRI mérés jellegéből adódóan az állatokat a mérések alatt altatni szükséges, amelyhez izoflurán (1mg/ml) vaporizációs altatóberendezést használtam, légzés monitorozás és testhőmérséklet kontroll mellett. Az állatokat a mérés alatti kihűléstől megóvandó, a műszer egy temperálható plate-tel rendelkezik. Az indukció 3%-os (V/V) izofluránnal, a mérés alatti altatás 1-3% izofluránnal történt a légzésszám függvényében, rágcsáló altató maszkon keresztül. A vivőgáz $O_2 - N_2O$, 1:2 arányú keveréke volt. A méréseket azonos beállításokkal, ugyanazon napszakban végeztem a kísérletsorozat adott napjain. A vizsgálatok tervezésénél fontos szempont volt az önkontrollos elrendezés, így minden állatról készült egy kezelés előtti "baseline" mérés. A további méréseket eredményeit mindig a saját individuális baseline értékhez hasonlítottam.

Az pilot mérések és az optimalizációs folyamat végén a következő setup bizonyult megfelelőnek;

TR/TE: 3000/50 ms, FOV: 16 x 16 mm, szeletvastagság: 0,80 mm, Gap: 0,2 mm, matrix 160 x 160, averages: 4, RARE factor: 4.

A mérések előtt minden esetben B₀ térképet készítettem. Az így kialakított képalkotó protokoll időigénye hozzávetőlegesen 30 perc/állat.

A szeletkiosztást 7 db szeletben határoztam meg, úgy elhelyezve, hogy lefedjék a teljes corpus callosum területét, mivel ott számítottunk a legmarkánsabb elváltozásra. Ebben a képalkotási metódusban a szeletek nem fekszenek teljesen egymásnak, van közöttük 0,2 mm gap (hézag). Ezekről a területekről sajnos nem kapunk információt. Ezt a problémát ki lehetne küszöbölni egy úgynevezett 3D képalkotó szekvenciával, azonban a pilot mérések alatt arra jutottam, hogy cost-benefit arányban a rendkívül jelentős időigénye miatt a 3D (önamagában 45 perc) mérés nem járható út, mivel az állatokat többször is kiteszem az altatás és a vizsgálat terhelésének. Az volt a tapasztalat, hogy 45 percnél tovább nem szerencsés altatásban tartani az egereket egy-egy mérés alatt, mert a kísérlet előre haladtával nehezen viselik az altatást. Azt nem szerettem volna kockáztatni, hogy esetleg a túlzott altatási terhelés miatt veszítsek el állatot a kísérlet során. Ezt a problémát kompenzálva néhány állatról külön kísérletsorozatban készítettem 3D képeket, publikációs és demonstrációs céllal, egy rövidebb 3 hetes kezelés segítségével.

Az analízis elvégzéséhez az adatokat először DICOM (Digital Imaging Communications in Medicine) formátumba konvertáltam. Minden további kiértékelési lépéshez külső szoftvereket használtam (Fedorov, Beichel et al. 2012). A kvantifikációhoz manuálisan kijelöltem a ROI-kat (Region Of Interest, a vizsgálni kívánt terülelet) a mediális corpus callosum területén, majd az itt mért pixelintenzitások változását vetettem össze hétről-hétre. A T2-súlyozott ¹H mérés jellegéből adódóan a felvételen a magasabb víztartalmú szövet jelentkezik világosabb (magasabb pixelintenzitású) területként. A mielinben gazdag egészséges corpus callosum sötéten jelenik meg a felvételen, mivel a mielin egy meglehetősen apoláros, lipid-jellegű fehérje, igen alacsony víztartalommal. A cuprizone kezelés hatására ez a mielin fellazul, majd elpusztul és a helyét a liquor veszi át egyre nagyobb arányban. Ez a víztartalom gyarapodás figyelhető meg a T2 felvételen, ahol a pixelintenzitás növekedése arányos a víztartalom növekedéssel, így tehát a mielin mennyiségének csökkenésével is. A szövettani kép alapján a károsodás mértéke jól korrelál az MRI-vel meghatározott értékekkel.

Meg kell azonban jegyezni, hogy mivel ez egy közvetett jelenség mérésén alapul, ha méréstechnikailag korrekten akarunk eljárni, akkor csak félkvantitatívnak, közvetettnek nevezhetjük az eljárást. Az adott területen a liquor felszaporodását elméletileg más folyamatok is okozhatják, nem zárható ki tehát teljesen, hogy a mért intenzitásnövekedés esetleg nem a cuprizone hatásból ered. Ezt a kérdést azonban több különböző szövettani, illetve elektronmikroszkópos vizsgálattal is kizártuk, továbbá ha más egyéb kóros, a mielint pusztító kórfolyamat is zajlana az állatok agyában, azt legkésőbb a végső termináció utáni vizsgálatokban felfedeznénk. Ennek a jelenségnek a kizárására szolgált az is, hogy minden sorozatban teljesen intakt kontroll egyedeket is bevontunk a vizsgálatba, az egyéb idegen hatások monitorozására. Egyetlen esetben sem fedeztünk fel idegen mielinkárosító hatást.

7.8 Szövettani vizsgálatok

A kísérletek végeztével az állatokat feláldoztuk pentobarbitál túlaltatásban (70 mg/ttkg), majd transcardiális perfúzióval fixáltuk a szöveteiket (PBS pH7,4, majd 4%-os paraformaldehidoldat) az agyakat kipreparáltuk majd egy éjszakán át postfixáltuk a paraformaldehid oldatban. Paraffinba ágyazás után 8 μm-es koronális metszeteket készítettünk, majd szilánozott tárgylemezre vittük.

7.8.1 Luxol Fast Blue (LFB)

Az LFB festéssel a szövetben található mielin jelölhető meg (Acs and Kalman 2012). A festés egy fixálási lépéssel kezdődik, -20 °C-on 2 percre metanolba helyezzük a metszetet, majd 96% ethanol és 4% ecetsav keverékébe 5 percre. Ezután a metszetek 24 órára 0,1%-os Luxol oldatba kerülnek 56°C-on, amely után egy etanolos és egy vizes mosás történik. A metszeteket ezután mikroszkóp kontroll alatt differenciáljuk 0,05%-os lítium-karbonáttal (70%-os etanolban), majd vízbe kerülnek. A sejtmagokat 0,1%-os cresyl-viola oldattal jelöljük, majd vízmentesítés és fedés következik.

Az így megfestett metszeteket két egymástól független operátor értékeli ki, egy 0-3 közti skálán, félkvantitatív módon. A 0 az intakt mielint jelöli, a 3 pedig a mielin teljes hiányát. Minden állatból 3 metszet került kiértékelésre a corpus callosum területéről.

7.8.2 Immunhisztokémia, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) és Ionized Calcium-binding Adaptor Molecule – 1 (Iba-1)

Az akkumulálódott és aktiválódott asztrocita (GFAP), illetve mikroglia/makrofág (Iba-1) populáció jelöléséhez ezen sejtek specifikus markereit használtuk. A fentebb leírt módon elkészített metszeteket citrátos feltárás alá vetettük, majd 3%-os hidrogén-peroxiddal kezeltük az endogén peroxidáz aktivitás leállításának érdekében, ezután a nem specifikus kötőhelyek lekötésére BSA-t adtunk a rendszerhez. A mintákat egy órán át inkubáltuk 1:1000 hígításban anti-GFAP vagy 1:500 hígításban anti-Iba-1 antitesttel. (Az antitestek pontos megjelölése mindig az adott kísérletsorozatból megjelent publikációban található (Bölcskei, Kriszta et al. 2018, Kriszta, Nemes et al. 2020). Az előhívást 3,3'-diaminobenzidine reakcióval végeztük. A metszeteket ezután digitális kamerával szerelt mikroszkóppal fotóztuk, (Olympus BX51 mikroszkópváz és Olympus DP50 kamera, 200x nagyítás). A kiértékelést vakon végeztük a mediális corpus callosum területére helyezett egyenlő nagyságú ROI-k optikai denzitását alapul véve, ImageJ szoftverrel (Schneider, Rasband et al. 2012).

7.9 Elektronmikroszkópia

Az Elektronmikroszkópos vizsgálatra a kezelés végeztével – a korlátozott mintaszám miatt –olyan állatok mintáit vittük, amelyekről teljes MRI sorozat készült. A vizsgálatokat a PTE-ÁOK Orvosi Biológiai Intézetében végeztük. Az 5.8-as pontban leírt perfúziós eljárás után következett egy 2,5%-os glutáraldehides fixálás foszfátpufferben. Az agyak kipreparálása után egy kb. 1 mm³-es blokkot vágtunk ki a medialis corpus callosum területéről a chiasma opticum magasságában (-0,2 és +0,3mm között), amit postfixáltunk egy éjszakán át. A blokkok ezután transzfixálásra kerültek 1%-os ozmium-tetroxiddal 35 percen át, 0,1M foszfát pufferben. Felszálló alkoholsoros dehidráció után 1%-os uranyl-acetáttal kontrasztosítottuk őket, majd a minták elektronmikroszkópos vizsgálatát végeztük el, Jeol 1200EX-II elektronmikroszkóppal. A kvantifikáció alapját a látótérben elhelyezkedő mielinizált/demielinizált axonok aránya képezte, illetve az axonok keresztmetszetének mérete. Az operátor és kiértékelést végző személy előtt nem volt ismert a csoportbeosztás.

7.10 Statisztika

Az eredmények statisztikai elemzését minden esetben a GraphPad Prism szoftver segítségével végeztük el (GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA). Az ábrákon minden esetben az átlag +/- a középérték közepes hibája (S.E.M.) került feltüntetésre. A qPCR eredmények, illetve az MRI eredmények összevetésénél egyutas ANOVA-t és Tukey-féle összehasonlító tesztet hajtottunk végre a szignifikancia értékek meghatározásához. A szövettani eredmények összevetésénél páros T-tesztet alkalmaztunk és az egyedi p-értékeket mindenhol feltüntettük.

8 Eredmények 1 (teljes TRPA-1 génhiányos egerek)

8.1 Általános állapot leírása

A kezelés hatására az irodalomból és a saját korábbi kísérleteinkből ismert moderált súlyvesztést figyeltük meg, igaz ennek a nagy része inkább gyarapodás elmaradást jelent, mintsem valódi fogyást. A TRPA1 vad és KO csoport között szignifikáns különbséget nem figyeltünk meg (két-utas ANOVA Bonferroni post-hoc teszttel).

A teljes kísérletsorozat alatt (összesen 90 egér) 2 egér mutatott "betegség jeleket" (kevés mozgás, agitáltság, rossz étvágy, súlyos fogyás, agresszió a társakkal szemben), őket kivontuk a kísérlet alól és kíméletes eutanáziában részesítettük.

8.2 Mechanociceptív küszöb mérés és motoros teljesítőképesség

A fájdalomküszöb vizsgálatokban, sem a von-Frey filamentumokkal végzett, sem a (DPAval) végzett – egyébként sokkal kisebb variabilitású – vizsgálatok esetén sem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (két-utas ANOVA Bonferroni post-hoc teszttel).

A hetente végzett vizsgálatok - mind a kapaszkodás, mind pedig a RotaRod esetében – rendkívül robosztusnak és jól reprodukálhatónak bizonyultak, azonban szignifikáns eltérést ezekben a vizsgálatokban sem találtunk (két-utas ANOVA Bonferroni post-hoc teszttel).



9. Ábra. A hetente történő mechanociceptív küszöb és motoros teljesítőképesség teszt eredményei. A mechanociceptív küszüböt von Frey filament módszerrel (A) és DPA-val (B) is megmértük. A motoros teljesítőképességet RotaRod berendezéssel (C), illetve horizontális kapaszkodási teszttel (D) határoztuk meg. Az adatok az átlagot és S.E.M.-et jelölnek (n=8-9/csoport)

E negatív eredmények üzenete számunkra kettős. Egyik oldalról rávilágít a cuprizone modell korlátaira, hiszen a humán SM-ben viszonylag korai fázisban is kimutatható az izomerő gyengülése és az egyensúlyozás zavarai is.

Másik oldalról azonban megerősít minket abban, hogy a kísérletbe bevont állatok jóléte nem sérül súlyosan, így nem idézünk elő olyan mértékű diszkomfortot, vagy szenvedést, amely önmagában is hatással lehetne az állatok fizikai állapotára, illetve lehetetlenné tennék a magatartásvizsgálatok kivitelezését. Összességében nézve megítélésem szerint a modell preklinikai használhatóságának szempontjából inkább pozitívnak tekinthetőek ezek az eredmények.

8.3 Y-maze teszt

Korábban leírták (Xu, Yang et al. 2009), hogy sikerült kimutatni különbséget a cuprizonnal kezelt és az egészséges egerek munkamemóriája között, ezért mi is elvégeztük ezeket a kísérleteket. Igaz találunk olyan tanulmányt is, mely szerint intakt maradt ez a funkció (Zhang, Zhang et al. 2013). Nem sikerült szignifikáns különbséget találnunk, ellenben több olyan jelenségre is felfigyeltünk, amely ezt megmagyarázhatja. A hetente ismételt kísérletekben az állatok a harmadik-negyedik alkalomra már habituálódtak a vizsgálati körülményekhez, így elvesztették érdeklődésüket a kísérleti környezet iránt, illetve mindkét cuprizonos csoportban jóval magasabbak voltak az alternációs számok kezdetben a korábban leírt és általunk is megfigyelt fokozott explorációs viselkedés miatt. A kísérleteket több helyszínen és operátorral is elvégeztük, de minden alkalommal erre jutottunk. Ez a két jelenség olyan mértékben torzította az adatokat, hogy azt a következtetést kellett levonnunk, hogy ez a vizsgálat korrekten nem használható a cuprizone modellben.

8.4 Open-field teszt

A cuprizone kezelt WT egerek több időt töltöttek mozgásban és az átlagsebességük is magasabb volt, mint a kezeletlen WT egereké a 2. és 3. héten. (p<0,01 és p<0,001, két utas ANOVA és Bonferroni post hoc teszt)



10. Ábra. A hetente mért spontán aktivitás eredményei. A mozgással töltött idő (A), a vizsgálat ideje alatt megtett teljes távolság (B), az átlagos sebesség (C) és az ágaskodások száma (D) jelenik meg a grafikonokon. (Az adatok átlagot és S.E.M.-et jelölnek, n= 13-17/csoport) *(p <0,05),**(p<0,01), ***(p<0,001)-al a kontroll (CTRL) és a cuprizonnal kezelt (CPZ) csoport közötti szignifikáns eltérést jeleztük. #-el a a vad (WT) és total KO (KO) csoportok közti szignifikáns különbséget jeleztük.

A kezelt és kontroll TRPA1 KO állatok viselkedése között kizárólag a 3. héten volt szignifikáns a különbség a mozgással töltött időben (p<0,05) és a 2. héten volt különbség az átlagsebességben (p<0,1) és a megtett távolságban (p<0,01). Ezekben a paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget a kezelt TRPA-1 WT és KO csoportok között. Másrészt szignifikánsan magasabb "ágaskodás" számokat hozott létre a cuprizone kezelés a WT

csoportban már a 2. héttől, amely fenn is maradt egészen az 5. hétig, mint a KO csoportban. A nyílt téren töltött időben nem találtunk különbséget egyik csoportban sem.

8.5 T2-súlyozott ¹H MRI mérések

A modell időbeni lefutásának követésére a legalkalmasabb módszernek a T2-súlyozott MR-képalkotás bizonyult. A baseline mérést követően a 2. héttől a 6. hétig követtük nyomon a folyamatot. A kontroll csoportok – mind a TRPA-1 KO mind a WT – a teljes kísérlet során nem mutattak érdemi változást a mért pixelintenzitásban a corpus callosum területén. A kísérlet előrehaladtával, a vizsgált 6 hetes időtávban tehát az állatok természetes öregedése nem változtatja meg érdemben a mielinizáltság fokát.

A cuprizone kezelés azonban a WT csoportban a 2. héttől a kísérlet végéig szignifikáns intenzitásnövekedést okozott a kontroll csoporthoz viszonyítva (p<0,001, minden időpontban). Ezzel szemben a cuprizone csak szignifikánsan kisebb változást tudott létrehozni a TRPA-1 KO csoportban és az különbség a teljes kísérlet alatt megfigyelhető. A legnagyobb protektív hatást a 3. héten figyeltük meg 149% a WT csoportban vs. 126% a KO csoportban.



11. Ábra. A T2-súlyozott MRI felvételeken megjelenő intenzitásváltozások a kísérlet 2. és 6. hete között. Az ábra A részén reprezentatív képeket jelenítettünk meg a kísérlet 3 hetéről. Az ábra B részén a kísérlet teljes ideje alatt elkészített képek alapján meghatározott jelintenzitások szerepelnek. Az adatok az átlagot és S.E.M.-et jelönek, n=3/csoport. Minden állat minden eredménye a saját individuális baseline mérésére lett normalizálva és %-os értékekben kifejezve. *(p <0,05),**(p<0,01), ***(p<0,001)-al a kontroll (CTRL) és a cuprizonnal kezelt (CPZ) csoport közötti szignifikáns eltérést jeleztük. #-el a a vad (WT) és total KO (KO) csoportok közti szignifikáns különbséget jeleztük.

A %-os meghatározás az adott egyed alapvonal méréséhez viszonyított intenzitásnövekedés mértéke, 100%-nak a kezdeti állapotot vettem. A vizsgált agyterület víztartalma a kísérlet későbbi szakaszában párhuzamosan csökkent mindkét kezelt csoportban, de a protektív hatás a kísérlet teljes ideje alatt kimutatható.

8.6 Luxol-Fast-Blue festés a demielinizáció fokának megállapítására a 3. héten

A corpus callosum LFB vizsgálata a 3. héten a WT csoportban gyakorlatilag teljes mielinvesztést jelzett a cuprizone hatására. A TRPA1 KO állatokban is megfigyelhető, a demielinizáltság foka ellenben sokkal moderáltabb mértékű. A szövettani vizsgálat tehát alátámasztotta a kísérlet során előállított MRI eredményeket.



12. Ábra. Az LFB/CV festés eredményei a kezelés 3. hete után. Az árba A részén reprezentatív képeket jelenítettünk meg (koronális síkú metszet, -0,1 mm a bregmától, Scale Bar 100μm). A kék szín jelöli az intakt mielin mennyiségét. *(p <0,05),**(p<0,01), ***(p<0,001)-al a kontroll (CTRL) és a cuprizonnal kezelt (CPZ) csoport közötti szignifikáns eltérést jeleztük. #-el a a vad (WT) és total KO (KO) csoportok közti szignifikáns különbséget jeleztük.

8.7 Asztrocita és mikroglia/makrofág akkumuláció és aktiváció

A GFAP és Iba-1 jelölés szignifikáns emelkedést mutatott a mikroglia/makrofág, illetve asztrocita aktiváció kapcsán a 3. hét végén. A TRPA-1 KO csoportban ez a mutató is lényegesen alacsonyabb értéket vett fel. Az immunhisztokémiai vizsgálatok tehát egyértelműen alátámasztják, hogy szignifikáns védő szerepe van a TRPA-1 receptor hiányának a cuprizone hatásával szemben.



13. Ábra. Az asztrocita és mikroglia/makrofág akkumuláció és aktiváció megjelenítése GFAP és Iba1 immunhisztokémiával, a kezelés 3. hete után. Az A és B szegmenseken reprezentatív képeket helyeztünk el (koronális síkú metszetek, -0,22 mm a bregmától, Scale bar 50 μm). A C szegmensen a GFAP jelölés, a D szegmensen az Iba1 jelölés eredményei láthatóak. n=5-6/csoport *(p <0,05),**(p<0,01), ***(p<0,001)-al a kontroll (CTRL) és a cuprizonnal kezelt (CPZ) csoport közötti szignifikáns eltérést jeleztük. #-el a a vad (WT) és total KO (KO) csoportok közti szignifikáns különbséget jeleztük.

8.8 Elektronmikroszkópos vizsgálat

Az elektronmikroszkópos vizsgálat során a mielin-vesztett axonok számát, illetve az axonok átmérőjét vizsgáltuk. Mindkét értékben drámai csökkenést okozott a kezelés a kontroll csoportokhoz viszonyítva, ezzel együtt azonban sokkal súlyosabb az elváltozás a TRPA-1 WT csoportban.



14. Ábra. Az axonok és a mielin állapotának mikrostrukturális jellemzésére elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Az A szegmensen reprezentatív képek láthatóak a kezelés 3. hete után. Mind a WT, mind a KO csoportban komoly károsodás figyelhető meg, azonban a TRPA-1 receptor hiányában fellépő protektív hatás így is szembetűnő. A B szegmensen megjelenített adatok 10-10 kép kiértékeléséből adódnak össze csoportonként 3 állatból. *(p <0,05),**(p<0,01), ***(p<0,001)al a kontroll (CTRL) és a cuprizonnal kezelt (CPZ) csoport közötti szignifikáns eltérést jeleztük. #-el a a vad (WT) és total KO (KO) csoportok közti szignifikáns különbséget jeleztük.

9 TRPA-1 szelektív antagonistával történő gátlásának hatása

Miután az eddig leírt eredmények alapján bizonyítható, hogy a TRPA-1 receptor fontos modulátor lehet a neurogén gyulladással járó demieleinizációs betegségekben, kézenfekvő volt, hogy kísérletet tegyünk a receptor gátlására egy gyógyszerjelölttel, így egy pilot preklinikai vizsgálatot végeztünk az AMG0902 jelű vegyülettel.

rTRPA1 ⁴⁵Ca²⁺ Flux IC₅₀: 0.071 μM hTRPA1 ⁴⁵Ca²⁺ Flux IC₅₀: 0.131 μM

15. Ábra. Az AMG0902 szerkezete (Schenkel, Olivieri et al. 2016)

Az irodalomban fellelhető adatok alapján ez a vegyület potens, teljes antagonistának mutatkozik in vitro vizsgálatokban, továbbá nem toxikus jellege alkalmassá teheti az in vivo tesztek elvégzésére. Patkányon elvégzett kísérletek során sikerült korábban leírni a TRPA-1 in vivo gátlásának tulajdonított hatásokat (Lehto, Weyer et al. 2016). Meg kell itt jegyezni, hogy az agyba való bejutása a szernek relatíve alacsony (liquor/plasma megoszlás 0,2), illetve egéren végzett vizsgálatokra nincs adat az irodalomban, de a receptorok szerkezetének vizsgálata alapján hasonló hatásokra számíthatunk (Bianchi, Zhang et al. 2012).

A cuprizone kezelést a 7.2 pontban leírtaknak megfelelően végeztük el ismét, annyi változtatással, hogy ez esetben csak a 3. hétig folytattuk a vizsgálatot, majd termináltuk az állatokat és a 7.8 fejezetben leírt vizsgálatokat végeztük el. Az AMG0902 jelű vegyületet napi kétszeri orális szondázás útján juttattuk be a kísérleti állatokba. Az adatok alapján semmilyen hatást nem tudtunk kimutatni a szer hatására, sem önmagában a kontroll állatokban, sem pedig a cuprizonnal kezelt csoportban.

A kísérlet végére arra jutottunk, hogy egérben, a korlátozott mennyiségű gyógyszerbeadás miatt, nem tudtunk kellő koncentrációt létrehozni az agyban. Ezt a problémát egy szofisztikáltabb hatóanyag beadási móddal kívántuk eliminálni a kísérleti rendszerünkből.

A következő periódusban intracerebroventrikuláris (ICV) beadásmóddal próbálkoztunk, egyszer használatos, steril, bőr alá ültethető ozmotikus pumpa segítségével (ALZET Osmotic Pumps, 10260 Bubb Road Cupertino, CA 95014-4166). Ebben az esetben azonban a szer nem kielégítő oldhatósága jelentett gátat az effektív koncentráció létrehozásában. Nem volt lehetséges megfelelő mennyiségű anyag beoldása és bejuttatása az ozmotikus pumpa mátrixába, így ezzel a beadási móddal is azonos eredményre jutottunk.

Azt sem zárhatjuk ki teljesen, hogy azzal az igen ritka esettel állunk szemben, hogy az egér és a patkány TRPA-1 receptor szerkezetében mutatkozó igen kis eltérés megváltoztatja az AMG0902 receptorhoz való affinitását, annak ellenére, hogy ezen állatfajok esetében a szerkezet és ezért a farmakológiai karakterisztika is nagyon hasonló (Bianchi, Zhang et al. 2012).

10 Diszkusszió 1

Az eddigiekben leírt munkám során sikerült megerősíteni azt a korábban leírt felvetést (Sághy, Sipos et al. 2016), amely szerint a TRPA-1 receptornak közvetítő szerepe lehet a cuprizone indukálta demielinizációs modellben. Mivel a receptor minden testi sejtből hiányzik, a kialakuló elváltozás inkább arra enged következtetni, hogy a protektív hatás inkább a demielinizáció enyhébb fokában, sem mint a potensebb remielinizációban nyilvánul meg, alátámasztja, hogy a 6 hetes protokollban is látható érett oligodendrocita szám emelkedés a total KO állatok esetében.

Munkám eddig bemutatott részében több új információra is fény derült. A cuprizone kezelt WT és KO állatok között kialakuló különbség nyomon követhető MRI-vel, már a 2. héten megjelenik és a kísérlet teljes ideje alatt fennmarad. Ugyanez a szignifikáns különbség nyomon
követhető LFB festéssel is, továbbá az asztrocita és mikroglia aktiváció is kimutatható. Bizonyítottuk, hogy az MRI-vel és szövettani/immunhisztokémiai vizsgálatokkal detektált elváltozásokhoz mikrostrukturális eltérések is tartoznak, amelyek ugyancsak szignifikánsan kisebb mértéket öltenek TRPA-1 receptor hiányában. Kijelenthető tehát, hogy mind a szövettan mind az MRI alkalmas a mielinizáció és a gyulladás vizsgálatára, továbbá eredményeik egybevágnak. Az elektronmikroszkópos felvételek mind a mielinvesztett axonok számában, mind az átmérők terén szignifikáns eltérést mutatott.

A viselkedésbeli elváltozások nyomon követésére tett kísérletünk részben zárult sikerrel. Meggyőző különbséget kizárólag az "ágaskodások" számában sikerült kimutatni, a többi vizsgált paraméter esetében nem. Ezen negatív eredmények okai, a gyakorlati tapasztalatok alapján nem feltétlenül a különbségek hiányában keresendőek, sokkal inkább magatartásvizsgálatok azon tulajdonságában, hogy a finomabb elváltozások detektálására nem tökéletesen alkalmasak, illetve az állatok természetes habituációjában.

Munkám során nem sikerült kimutatnom érdemi eltérést a motoros funkcióban sem, (kapaszkodási és RotaRod teszt) igaz irodalmi adatok alapján ez nem meglepő, a modell többékevésbé ismert restrikciói közé tartozik. Ebben a tekintetben a cuprizone modell éles ellentétben áll a többi SM állatmodellel, mivel például az EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) modell egyik legsúlyosabb és legjellemzőbb tünete a korán jelentkező és gyorsan progrediáló paralízis (Pachner 2011, Kipp, Nyamoya et al. 2017). Meg kell jegyezni, hogy ezen hatások miatt a többi modell használhatósága lényegesen korlátozott az állatok fizikai állapotromlása miatt.

A mechanociceptív küszöb vizsgálatával eddig adós volt a tudományos közösség, mivel a humán SM-ben ez szintén egy ismert tünet. Ebben a kérdésben is negatív eredményre jutottunk, ami szintén nem meglepő, figyelembe véve, hogy a cuprizone leginkább a központi idegrendszeri tünetek modellezésére alkalmas (Árnyalja a képet, hogy mindezek ellenére hideg allodyniát írtak már le ebben a modellben, igaz csak egyetlen tanulmányban (Olechowski, Truong et al. 2009). Ezt támasztja alá egy korábbi cikk is, amely leírta, hogy a gerincvelőben nem történik oligodendrocita vesztés (Herder, Hansmann et al. 2011). A modell erősségének tekinthető, hogy a jól reprodukálható demielinizáció mind képalkotással, mind pedig szövettani vizsgálatokkal jól tanulmányozható, miközben a kísérletbe vont egereket megtartják kielégítő fizikai kondíciójukat.

A magatartásvizsgálatok során megemelkedett exploratív viselkedést figyeltünk meg mindkét kezelt csoportban, amely mind az ágaskodásban mind pedig a lokomócióban tetten érhető volt. Hasonló viselkedésmintázatot korábban is leírtak, emelkedett mászási hajlandóságot és csökkent szorongást figyeltek meg, igaz más módszerekkel vizsgálták az állatokat (Franco-Pons, Torrente et al. 2007, Xu, Yang et al. 2009).

Az eddig leírtak alapján kitűnik, hogy mennyire változatos képet mutat az állatok viselkedési, illetve fizikai állapota. A modellről jelenleg rendelkezésre álló ismeretek alapján ezek az eltérések nem is magyarázhatóak könnyen. Tudjuk azt, hogy a cuprizone leginkább csak az agyban, ott is főleg a corpus callosum területén hoz létre elváltozásokat, tt azonban igen erőteljes hatás figyelhető meg. Tudjuk azt is, hogy a corpus callosum átvágása érdemi funkciócsökkenést önmagában nem okoz egérben (Schalomon and Wahlsten 2002). Különböző, egymással nem egyértelműen kapcsolatba hozható képletekben is megfigyelhető demielinizáció a szürkeállomány egyes területein (Skripuletz, Lindner et al. 2008, Koutsoudaki, Skripuletz et al. 2009, Skripuletz, Bussmann et al. 2010, Gudi, Gingele et al. 2014), továbbá demielinizáció nélkül fellépő metabolikus változásokra utaló jeleket is leírtak egyes területek vizsgálata során (Goldberg, Clarner et al. 2015).

Mivel vizsgálataink középpontjában a corpus callosum áll, nem zárhatjuk ki, hogy a védőhatás sem egyenletesen alakul ki az agy egyes területein, ezt azonban igen nehéz vizsgálni, hiszen nem igazán írtak le még jól körülhatárolható, reprodukálható elváltozásokat sem más agyterületeken, így ezen bizonytalan elváltozások meg,- vagy távollétének vizsgálata önmagában is egy sor metodikai problémát vet fel. A corpus callosumot jelentős rosttömege és az azon megfigylehető markáns elváltozások teszik alkalmassá a modell hatásainak vizsgálatára. Ez a kérdéskör azonban feltétlenül további vizsgálatokat igényel.

A neurotranszmisszióban beállt változásokat is leírtak korábban, MAO-oxidáz és dopaminβ-hidroxiláz aktivitás csökkenés, illetve dopamin szint emelkedés mutatható ki a prefrontális cortexben (Xu, Yang et al. 2009), továbbá a GABA/glutamát egyensúly zavarait is leírták (Praet, Orije et al. 2015). Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy egyes tanulmányok szerint a cuprizone kezelés alkalmas lehet skizofrénia modellezésére is (Herring and Konradi 2011, Xu and Li 2011), igaz, véleményem szerint ezek a hangok még nem nyertek kellő bizonyítást, még akkor sem, ha vannak hasonlóságok a viselkedésben megfigyelt eltérésekben a humán skizofréniával összevetve. Ezen állítások alátámasztására az egér agy fehérállományának alaposabb vizsgálatára lenne szükség, ez azonban jelenlegi munkámnak nem tárgya.

A morfológiai elváltozásokat pontosan nyomon tudtuk követni az MRI-vel. Időben feloldott vizsgálatokat végeztünk, feltérképeztük a corpus callosum területén kialakuló demielinizációt és az következményesen kialakuló T2-jelintenzitás növekedését. Az így kapott eredményeket validáltuk a szövettani, immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is. Arra a jelenségre is fény derült az MRI segítségével, hogy valójában a 3-4. héten a legsúlyosabb az elváltozás, utána némi remielinizáció figyelhető meg a modellben. Ez is megerősített minket abban, hogy az időben ismételhető in vivo képalkotó metodika mennyire értékes eszköz ezekben a kísérletekben szemben a csak egyetlen pontból információt adó post mortem szövettani eljárásokkal. Az időbeli lefolyásról a hagyományos módszerekkel csak igen nagyszámú állat feláldozása árán juthattunk volna információhoz. Az adatok részletes vizsgálata azt is megmutatta, hogy a kezdeti állapotban is viszonylag nagy egyedek közötti variancia mutatkozott, így az önkontrollos elrendezés rendkívül nagymértékben növelte az eredmények megbízhatóságát.

A kutatócsoportunk korábban leírta, hogy a 6. héten szignifikáns különbség mutatkozik a TRPA-1 vad és KO állatok között. Jelenlegi munkám pedig bizonyította, hogy a különbség számos vizsgált paraméterben a korábbi időpontokban is fennáll. Az eredményekből az is kitűnik, hogy a kísérlet késői szakaszában fellépő remielinizáció is az asztrocita és mikroglia/makrofág aktiváció jelenlétében történik, így ezen sejtek is szükségesek lehetnek a kialakult károsodás enyhítéséhez. Ezen sejtek neurogén proinflammatorikus hatása széles körben ismert és elfogadott, de eredményeink alapján feltételezhető, hogy a reparációs folyamatokban hasonlóan hangsúlyos szerepük lehet, az általuk termelt citokineknek és növekedési faktoroknak. Szerepük még nem tisztázott a kialakuló remielinizációban, illetve az

oligodendroglia prekurzor sejtek differenciációjában. Mivel ezen folyamatok még csak részben, vagy részben sem feltérképezettek igen nehéz elhelyezni, ebben a rendkívül komplex jelátvitelben a TRPA-1 szerepét és jelentőségét, azonban a folyamatra gyakorolt meghatározó szerepe tagadhatatlan.

A TRPA-1 receptor kifejeződése több független kutatócsoport által megerősített, beleértve a mi csoportunk korábbi munkáját is (Shigetomi, Tong et al. 2012, Shigetomi, Jackson-Weaver et al. 2013, Lee, Lee et al. 2016, Sághy, Sipos et al. 2016), továbbá vizsgálták a Ca²⁺ permeábilis csatornák szerepét a demielinizáció kialakulásában is (Hamilton, Kolodziejczyk et al. 2016). Egér Alzheimer modellben kimutatták, hogy a TRPA-1 csatorna mediálja az asztrocitákból történő citokin felszabadulást NFĸB hatására (Lee, Lee et al. 2016), továbbá azt is tudjuk, hogy az NFĸB jelátvitel gátlása képes csökkenteni a neurotoxinok által kiváltott demielinizáció fokát (Brück, Pförtner et al. 2012). Másrészről Skripuletz és munkatársai leírták, hogy a proliferáló asztrociták ablációja nem képes csökkenteni az oligodendroglia pusztulást, csupán a mikorglia/makrofág aktivációt késlelteti, amely időben eltolt mielinvesztében manifesztálódik (Skripuletz, Hackstette et al. 2013).

Eredményeinket összegezve arra jutottunk, hogy a TRPA-1 receptor kapcsolatot teremt az aktivált asztrocita és az oligodendrocita között, amely létrejön a cuprizone okozta oxidatív stressz következményeképpen és emelkedett citoszolikus Ca²⁺-szintet hoz létre az oligondendrocitában, amely súlyos proinflammatorikus folyamatokat indít el mindkét sejttípusban. Ezek a gyulladásos folyamatok csúcsosodnak ki a súlyos oligodendroglia pusztulásban és a következményes mielinvesztésben is. A TRPA-1 receptor szerep ugyanakkor továbbra sem tisztázott a remielinizáció folyamatában sem.

40





Nem szabad elfeledkeznünk arról sem, hogy a kísérleteket TRPA-1 teljes KO állatokon végeztem, ami azt jelenti, hogy az egerek teljes életében, minden testi sejtükből hiányzik a TRPA-1 receptor. A nem teljesen koherens eredményeket is ennek a ténynek a fényében kell értékelnünk. Az a tény, hogy a TRPA-1 receptor hiánya önmagában ilyen markáns protektív hatást képes kifejteni, megerősített minket abban, potenciális gyógyszercélpontként további vizsgálódást igényel.

Annak érdekében tehát, hogy ezt a rendkívül komplex képet kezelhetőbbé tegyük, az első lépésként az tűnik kézenfekvőnek, hogy egy TRPA-1 hatások tekintetében specifikusabb modellrendszert válasszunk. Mivel in vivo kísérletekről van szó, így minden további vizsgálatnak az előfeltétele a megfelelően megválasztott modellállat kell hogy legyen. Az eddig leírt megfontolások mentén arra a döntésre jutottunk, hogy kondicionált KO állatokra térünk át a vizsgálatok további szakaszában.

11 TRPA-1 GFAP-Cre kondicionált KO egérmodell

Munkánk második szakaszában mGFAP-Cre kondícionált TRPA-1 deletált egereken vizsgáltuk a TRPA-1 receptor hiányát, amelyeket magunk hoztunk létre az intézet állatházában.

A floxolt TRPA-1-et homozigótán hordozó állatokat (B6.129S-Trpa1tm2Kykw/J, stock number #008650) kereszteztünk GFAP promoterrel irányított Cre rekombináz gént hemizigótán hordozó egerekkel ((B6.Cg-Tg(Gfap-cre) 77.6Mvs/2J, stock number #024098), amelyeket a Jackson Laboratory-tól vásároltunk (Bar Harbor, ME, USA). Csak a nőstény egerek hordozták a GFAP-Cre transzgént, hogy elkerüljük a nem specifikus Cre aktivációt a spermatogenezis során, illetve a GFAP-Cre transzgént csak egy kópiában hordozták, az aspecifikus rekombináció elkerülése miatt. Első lépésben a GFAP-Cre heterozigóta (GFAP-Cre^{+/-}) nőstényeket pároztattuk a floxolt TRPA-1 homozigóta (TRPA-1^{FI/FI}) hímekkel. Az ebből született mindkét génre heterozigóta nőstényeket visszakereszteztük a TRPA-1^{FI/FI} hímekkel. Az ebből a konstellációból született Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} hímek képezták a vizsgálataink alapját, illetve az alomtestvéreik (Cre^{+/-} TRPA-1^{FI/-} és Cre^{-/-} TRPA-1^{FI/FI}) hetero és floxolt kontrollként szolgáltak. Miden állat genotípusát meghatároztuk a farokból vett szövetminta segítségével. A Flox-Cre eljárás egyik jellemzője a ritkán, de előforduló teljes egyedre kiterjedő total KO genotípus. Ezeket az állatokat genotipizálása után kizártuk a további kísérletekből.



17. Ábra. A tenyésztés legfontosabb lépései

12 Anyagok és módszerek 2

12.1 Genotipizálás

A genotipizálás a forgalmazó által ajánlott protokoll alapján történt. A floxolt TRPA-1 genotípus meghatározásra került olMR9168 forward primerrel és olMR9169 reverse primerrel, amelyek 359 bázis hosszúságú "floxolt" és/vagy 472 bázis hosszúságú "vad" PCR termékeket eredményeztek. A GFAP-Cre genotípust 15831-es forward és 15832-es reverse primerrel teszteltük, belső pozitív kontrollal (forward primer olMR8744, reverse primer olMR8745) amely kb 200 bázis hosszúságú pozitív kontroll terméket, illetve kb 400 bázis hosszúságú GFAP-Cre pozitív terméket eredményezett. A kondicionált TRPA-1 KO genotipizálást exon21 forward és olMR9169 reverse primerrel végeztük, amely vagy 609 bázis hosszban KO, vagy 359 bázis hosszban intakt floxolt, és/vagy 472 bázis hosszban intakt vad genotípust meghatározó terméket eredményezett.

A kondicionált TRPA-1 KO messenger RNS analízist is elvégeztük RT-PCR módszerrel, exon21 forward, illetve exon25 reverse primerrel, amelyek 573 bázis hosszúságú (intakt) vagy 191 bázis hosszúságú (KO) termékeket hoztak létre.

12.2 TRPA-1 kvantitatív RT-PCR

Teljes RNS izolációt is végeztünk homogenizált cortex mintákból (TRI-reagenssel és Direct-Zol RNS izoláló kittel) a gyártói ajánlás szerint. A tisztított RNS-t kvantifikáltuk spektrofotométerrel (NanoDrop ND-1000), illetve kezeltük a mintát DNAse I enzimmel (ThermoScientific) a genomiális DNS kontamináció megszüntetésére. Az első cDNS szálat Maxima First Strand cDNS Kit segítségével szintetizáltuk. A PCR reakcióban SensiFastProbe Lo-ROX Kitet alkalmaztunk. A forward primer a 23-as, a reverse primer pedig a 24-es exonon van kötve, illetve a jelölt próba (56FAM/tgggcagct/ZEN/tattgccttcacaat/3IABkFQ) szintén a 23-as exonon van kötve. A futtatást egy Applied Biosystems Quantstudio5 quantitative PCR berendezésen végeztük, a következő paraméterekkel; 3 perc denaturáció 95°C, 40 ciklus 95°Con 30 másodperccel, annealing reakció 62°C-on 30 másodpercig, majd extenzió 72 °C-on 1 percig. Mivel úgy terveztük meg a reakciót, hogy a primer és a próba komplementere a rekombináció során kiesik, ezért csak az intakt TRPA-1 mRNS lesz képes detektálható jelet adni. Az egér β -aktint vettük referenciaként és az expresszió meghatározására Prime Time Std qPCR Assay-t használtunk, azonos setup mellett. Minden qPCR reakciót duplikálva végeztünk el a Ct értékek meghatározásához. A dCt értékek meghatározásához a referencia β -aktin Ct értékét kivontuk a TRPA-1 Ct értékéből. A ddCt értéket pedig úgy számítottuk ki miden mintára, hogy kivontuk a Cre^{-/-} dCt értékét (100%) az adott mintáéból. Végezetül pedig a relatív expressziós szintet jelenítettük meg a következő formulával; 100/(2^{ddCt}).

12.3 Szövettani vizsgálatok

A kísérlet második szakaszában is a 7.8 fejezetben leírt vizsgálatokat hajtottuk végre Luxol-Fast-Blue, GFAP és Iba-1 tekintetében, illetve egy további immunhisztokémiai tesztet is végeztünk a mielin bázisos protein (MBP) kimutatására. Az előkészítés után 1 órán át inkubáltuk a mintákat primer anti-MBP (1:100, egér MAB, Novocastra No.: AB_563893). Az eredmények kvantifikálását az LFB esetében 0-3 közti score-okkal, az Iba-1, GFAP és MBP esetében pixel-intenzitás alapon végeztük el, ImageJ szoftverrel.

12.4 MRI-vizsgálat (Mágneses Magrezonanciás Képalkotás)

A vizsgálatokat a korábban a 7.7 fejezetben leírtak szerint végeztük el.

12.5 MR spektroszkópia fejlesztése

Mivel a cuprizone által kiváltott neurotoxicitás metabolomikai hátteréről még ma is igen keveset tudunk, célunk volt egy in vivo MR spektroszkópiai eljárás kifejlesztése is, amely képes feltérképezni az energiametabolizmusban beálló változásokat is. A PTE-n rendelkezésre álló kisállat MRI berendezés a kis térereje miatt (4,7T) erre a feladatra csak igen korlátozottan alkalmas. Az irodalom jelenleg ilyen hardveres setup mellett nem ír le egéren végrehajtott in vivo spektroszkópiai eljárást. Nagyobb térerőn is igen kevés és más profilú vizsgálatok állnak rendelkezésre (Praet, Orije et al. 2015).

Ismert jelenség, hogy a humán neurodegenerációs kórképekben – akárcsak a cuprizone modellben – a korai fázisban nem látható elváltozás sem a T1, sem a T2 súlyozott felvételeken. A humán diagnosztikában használatosak még demielinizációs kórképekben diffúzió súlyozott eljárások – ezeknek részleteire most nem térnék ki – amelyek viszont rendkívül körülményes és időigényes eljárások, diagnosztikus értékük pedig alulmarad a hagyományos strukturális képalkotó módszerekhez képest. E problémák ismeretében egy spektrális eljárás kifejlesztése mellett döntöttünk, amely talán korábban képes jelezni az kórfolyamatot, mintsem az strukturális elváltozást okozna. Irodalmi adatokat ezen a vonalon nem találtunk, de a korábbi évek tapasztalata, illetve a témában elvégzett számos kísérlet alapján úgy értékeltük, érdemes belefogni egy ilyen irányú fejlesztésbe is. Amennyiben sikerrel járunk, úgy a kezünkben lehet egy in vivo, nem invazív korai diagnosztikus eszköz a demielinizációs kórképek vizsgálatához.

Mivel a rendelkezésre álló műszerünk kifejezetten képalkotó eljárásokra lett fejlesztve a gyártó által, így nem áll rendelkezésre hozzá a spektroszkópiához megfelelő szekvencia. A berendezés szoftvere ugyan ismeri a spektrális vizsgálatokhoz szükséges technikai folyamatokat, ellenben nem rendelkezik – a gyártó saját bevallása szerint sem - az elvégzésükhöz szükséges megfelelő paraméterkészlettel. Ennek tükrében igen komoly kihívást jelent a vizsgálatok elvégzéséhez alkalmas szekvencia beállítása, a hozzá tartozó nagyságrendileg 100, egymásra ható, mátrixba rendeződő paraméterösszeállítás megtalálása. Tovább nehezítette a helyzetünket, hogy bár a berendezés a specifikációja alapján, hardveresen alkalmas az általunk kívánt vizsgálatok elvégzésére, de ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy több alkatrészt is a tűrőképessége határán fogunk használni. A nem megfelelő beállítások alkalmazása potenciálisan veszélyezteti a műszer épségét, ennek tudatában minden egyes mérési szekvencia indítását gondos mérlegelés, számítások és szimulációk előzték meg. Nem mellékes szempont a műszer által képviselt igen magas kutatási és anyagi érték sem. Az eddig leírtak alapján nem meglepő tény, hogy ezen műszeres setup mellett, az in vivo spektroszkópiának gyakorlatilag nincs irodalma, így nem igazán volt mire támaszkodnunk.

A fejlesztést egy sor gyárilag mellékelt, illetve később saját magunk által készített fantomon elvégzett pilot ¹H méréssel kezdtük. Ezekkel a mérésekkel sikerült hozzávetőleg

45

meghatároznunk a szükséges relaxációs és repetíciós időket, a kivitelezhető térbeli felbontást, a mérési idők korlátait, a műszer által elszenvedett driftet, a létrehozható jel/zaj viszonyt és annak időigényét. Az általunk létrehozott koncentrikus fantomokon ki kellett dolgoznunk a külső térfogati elnyomást (OVS), amely szükséges az általunk kiválasztott voxel vagy VOI (az a térrész, ahonnan a jelet kívánjuk gyűjteni az egér agyán belül) határain kívülről érkező jelek kizárásához, vagy minimalizálásához. Amennyiben ezt nem – vagy nem megfelelően – végezzük el, elveszítjük a lokalizáltságot, hiszen a környező, számunkra irreleváns szövetből (az agy szomszédos részei, koponyacsont, izom és bőrszövet, stb) idegen jelek érkeznek. Anélkül, hogy a mágneses magrezonanciás mérések fizikai és technikai jellemzőire itt mélyebben kitérnék (nem tárgya a dolgozatnak) meg kell jegyezni, hogy a valóságban itt nyilván nem térfogati szeparáció történik, hanem a kiolvasott FID-ek jellemzői alapján számítással jutunk egy adott jel térbeli pozíciójához, tehát nem megfelelő beállítások mellett azt kockáztatjuk, hogy artefaktokkal terheljük a mérésünket. Az OVS paramétereinek meghatározása komplex minták esetén a gyakorlatban mindig úgy nevezett "try and error" módszerrel történik, nem tehetünk mást, mint pilot mérések során megkeressük az optimális beállításokat, belátható, hogy az élő szervezetnél komplexebb minta pedig nem létezik.

A ¹H-mérések jellemzőiből adódóan az élő szervezetekből és vizes oldatokból nagyságrendekkel több vízjel érkezik, mint bármilyen számunkra érdekes molekula jele. Ez azt eredményezi, hogy a víz protonjai által létrehozott oldószerjel elnyom minden más – hozzá képest lényegesen gyengébb – jelet és lehetetlenné teszi a vizsgálatokat. A kémiai spektroszkópiában ezt oldószer-hatásnak nevezzük. Ennek a problémának a kezeléséhez a víz jelét mesterségesen egy modulátor pulzussal el kell nyomnunk, lehetőleg úgy, hogy a legnagyobb hatékonysággal csökkentse a víz jelét, de hatására a lehető legkisebb mértékben torzuljon a spektrum többi része. A pilot vizsgálatok alapján a VAPOR-eljárás (Tkáč, Henry et al. 2004) bizonyult a legmegfelelőbbnek.

A spektroszkópiás módszerek megkövetelik az igen pontos B₀-térkép előállítást is, kiváltképp in vivo vizsgálatok esetén. A B₀-térkép lényegében a műszer elektromágnese által létrehozott rendkívül homogén elektromágneses tér, minta (az élő, altatott állat maga) általi torzítását számszerűsíti, amellyel a mérés során számolnunk kell. Itt az értékek pontosítása jelentős mérési idő növekményt eredményez, így itt is meg kellett találnunk a szükséges és elégséges szintet.

A rendelkezésre álló alap szekvenciák közül a pilot mérések során a RARE (Rapid Aquisition with Relaxation Enhancement) eljárás bizonyult a leghatékonyabbnak (Hennig, Nauerth et al. 1986).

Az optimalizált eljárással egy-egy állatot hozzávetőleg 1 órán át volt szükséges altatásban tartani. Ez tapasztalataink alapján – ebben a modellben - az általuk elviselhető idő határán van, ezért úgy döntöttünk, hogy két részre bontjuk a spektroszkópiai mérést, majd matematikailag összegezzük őket. A kiválasztott módszer erre lehetőséget is ad, így ha esetleg az állatok nem viselnék el ilyen hosszan a terhelést, akkor megszakított mérés esetén is nyerhetünk némi adatot (természetesen rosszabb minőségben). A kísérlet során szerencsére kiderült, hogy erre nincs szükség.

Az így előállított nyers adatokat egy külső szoftverrel dolgoztuk fel (jMRUI). Mivel a szoftver gyártója nem ajánlja az alapvonal korrekciót, így ezt a lépést kihagytuk. 2048 pontos zero filling, manuálisan történő fáziskorrekció és 1 Hz-el végrehajtott apodizáció (Lorentz függvény szerint) után, Hankel-Lánczos féle Singular Value Decomposition (HLSVD) (Pijnappel, Van den Boogaart et al. 1992) eljárást hajtottunk végre, amely arra hivatott, hogy lehetőleg elkülönítse a spektrumban megjelenő egyedi komponenseket, így lehetőséget adva azok kvantifikációjára.



18. Ábra. Az eredeti spektrum (D), a dekonvoluált spektrum (C), az egyedi kmponensek (B), a visszamaradt jelek az extrakció után (A)

Az ilyen módon extrahált egyedi csúcsokat nem abszolút, hanem relatív értékekben fejeztük ki, mivel az ilyen módon számolt értékkel robosztusabbá tehető a mérés.

Egy korábbi publikációban – igaz más műszeres setup mellett - széles metabolikus profilt kíséreltek meg feltérképezni (Orije, Kara et al. 2015) a cuprizone hosszú távú hatásairól, alig néhány metabolit változását sikerült kimutatniuk (nagyobb térerejű, erre dedikált műszeren). Erre támaszkodva úgy döntöttünk, hogy arra a néhány metabolitra (NAA, kreatin és foszfokreatin, taurin) koncentrálunk, így ezen a metabolikus változások kimutatására kíséreltük meg optimalizálni a saját setupot.

13 Eredmények 2 (GFAP-Cre TRPA-1 kondicionált KO)

13.1 TRPA-1 kvantitatív RT-PCR eredmények

Az intakt mRNS szinteket határoztuk meg RT-qPCR módszerrel, egér cortex mintákból.

Mind a Cre^{+/-} TRPA-1^{FI/-} csoportban (68%), mind pedig a Cre^{+/-} TRPA-1^{FI/FI} csoportban (77%) szignifikáns csökkenés figyelhető meg a képződő mRNS mennyiségében. Ez az eredmény arra utal, hogy a Cre-Lox rekombináció hatására jelentősen lecsökkent az érintett gén kifejeződése.



TRPA1 expression in mouse brain

19. Ábra. Az intakt TRPA-1 mRNs relatív expressziós mintázata. n=7-9/csoport, *(p <0,05), **(p<0,01)

13.2 MRI eredmények

A kezelés hatására létrejövő T2 jelintenzitás változását követtük a 2. és 6. hét között.



20. Ábra. Reprezentatív felvételek a kezelés 4. hetéből. A fehér ellipszis jelöli a kvantifikáció alapját képező medialis corpus callosum területét.

A kezeletlen kontroll csoportban az intenzitás gyakorlatilag nem változott és más elváltozást sem fedeztünk fel a teljes kísérlet alatt. (21. Ábra. A T2-súlyozott képeken meghatározott jelintenzitás változás a 2. és 6. hét között. Az értékek az átlagot és S.E.M.-et jelölik (n=4/ csoport). 100%-nak az adott egyed baseline értékét vettük. *(p <0,05),**(p<0,01)

Ezzel szemben az intenzitások szignifikánsan emelkedtek a cuprizone kezelt GFAP-Cre^{-/-} TRPA-1^{FI/-} csoportban a GFAP-Cre^{+/-}TRPA-1^{FI/-} és GFAP-Cre^{+/-}TRPA-1^{FI/FI} csoportokhoz hasonlítva a 3. és 4. héten egyaránt. (21. Ábra) A legnagyobb eltérés a negyedik héten mutatkozott a GFAP-Cre^{-/-}TRPA-1^{FI/-} csoport (179,75%) és a GFAP-Cre^{+/-}TRPA-1^{FI/-} csoport között (134,75%). Ez az eredmény azt mutatja, hogy mind a homozigóta, mind pedig a heterozigóta GFAP-Cre kondicionált KO állatokban jelentősen enyhébb demielinizáció alakult ki a kezelés hatására. A későbbi időpontokban a különbség ebben az esetben is csökken, akár csak korábbi kísérleteink során, a total KO genotípus esetén. A kísérlet végére nem mutatható ki szignifikáns különbség a cuprizone kezelt GFAP-Cre^{-/-}TRPA-1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-}TRPA-1^{FI/-} és GFAP-Cre^{+/-}TRPA-1^{FI/FI} állatok között. Lényeges megjegyezni azonban, hogy minden cuprizone kezelt csoport szignifikáns különbséget mutat a saját kezeletlen kontroll csoportjával szemben a kísérlet 3. hetétől a kísérlet végéig.



21. Ábra. A T2-súlyozott képeken meghatározott jelintenzitás változás a 2. és 6. hét között. Az értékek az átlagot és S.E.M.-et jelölik (n=4/ csoport). 100%-nak az adott egyed baseline értékét vettük. *(p <0,05),**(p<0,01)

13.3 A demielinizáció fokának vizsgálata LFB festéssel és MBP immunhisztokémiával

A kísérlet végén – az MRI eredményekkel összhangban – mindhárom genotípusban szignifikáns demielinizáció mutatkozott a cuprizone hatására a saját kezeletlen csoporthoz viszonyítva. Ezzel ellentétben a három genotípusban egymáshoz viszonyítva nem mutatható ki szignifikáns különbség. Ez arra utal, hogy a demielinizációval szemben protektívnek mutatkozó mGFAP kondicionált KO genotípus hatása, a kísérlet végére lecsökken, illetve a szignifikancia szint alá esik. Mind az LFB festés score, mind pedig az MBP immunhisztokémia szoftveres kvantifikációja ezt a képet mutatja. Az eredmények kiértékelése természetesen vakított



operátorokkal történt, egymástól függetlenül, két operátor párhuzamos munkája nyomán.

22. Ábra. A mielin mennyiségének meghatározása LFB-CV festéssel a kísérlet végén (reprezentatív képek), illetve a metszetek félkvantitatív kiértékelése (7.8.1 fejezet). Scale bar 100μm, n=3-5/csoport, *(p <0,05).



23. Ábra. A mielin bázisos protein mennyiségének meghatározása anti-MBP immunhisztokémiával a kísérlet végén (reprezentatív képek), illetve a metszetek kvantitatív szoftveres kiértékelése (7.8.2 fejezet). Scale bar 100µm, n=3-5/csoport, *(p <0,05).

13.4 Mikroglia/makrofág aktiváció és akkumuláció vizsgálata immunhisztokémiával

A 6. hét végén a mielinizáltság fokával szorosan korreláló eredményekre jutottunk az Iba-1 és GFAP immunhisztokémiával. Minden cuprizone kezelt csoportban szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető mindkét vizsgált marker esetében. A három eltérő genotípus estében viszont nem volt kimutatható szignifikáns különbség a kezeletlen csoportokban. Az mGFAP kondicionált KO genotípus sem volt képes létrehozni szignifikáns különbséget a 6. héten a cuprizonnal kezelt csoportokban a kontrollhoz viszonyítva.



24. Ábra. A mikroglia aktiváció meghatározása anti-Iba1 immunhisztokémiával a kísérlet végén (reprezentatív képek), illetve a metszetek kvantitatív szoftveres kiértékelése (7.8.2 fejezet). Scale bar 100μm, n=3-5/csoport, *(p <0,05).



25. Ábra. Az asztrocita aktiváció meghatározása anti-GFAP immunhisztokémiával a kísérlet végén (reprezentatív képek), illetve a metszetek kvantitatív szoftveres kiértékelése (7.8.2 fejezet). Scale bar 100μm, n=3-5/csoport, *(p <0,05).

13.5 MR spektroszkópia

A Spektroszkópiával nyert méréseink eredménye kettős. Az in vivo ¹H RARE mérések elvégzése után arra jutottunk, hogy már a kezelés korai szakaszában – az első héten is – megfigyelhető egy jelentős NAA (N-acetil-aszpartát) mennyiség csökkenés, amely kitart a továbbiakban is. (A kontroll csoportban nincs változás)





Az NAA mennyiségét a Cr+pCr (kreatin, foszfo-kreatin) csúcsához viszonyítva adjuk meg (a baseline mérés esetén 1,00-ra normáljuk), mivel korábbi kutatásokból tudjuk (Orije, Kara et al. 2015), hogy az a kísérletsorozat alatt végig konstans marad. Ha egy belső standardhez viszonyítjuk az eredményt, akkor a kvantifikáció kevésbé lesz érzékeny a külső zavaró tényezőkre, illetve a biológiai diverzitásra az állatok között. Kompenzálja továbbá az állatok természetes öregedéséből esetlegesen származó metabolikus eltéréseket is.

Sajnálatos módon az is kiderült, hogy a korábban említett műszeres korlátok miatt más metabolitok mennyiségében beálló változásokat nem sikerült megbízhatóan kimutatni.



27. Ábra. Reprezentatív spektrumok a cuprizone kezelt csoportban az idő előrehaladtával

Ez a felfedezés azt jelenti, hogy kimutatható a metabolikus változás már az előtt is, hogy a morfológia megváltozása látható lenne T2-súlyozott MR képalkotással. Ez a tény mindenképp további kutatást igényel, egy a feladatra specifikált műszerrel, mivel tovább fejlesztve potenciálisan egy korai diagnosztikus eszközt adhat a kezünkbe, nem csak preklinikai de később akár klinikai relevanciával is. Megítélésem szerint azonban mindenképp értékes eredmény az is – elsősorban az MR-es közösség számára – hogy lehetséges egy ilyen vizsgálat kivitelezése a számunkra rendelkezésre álló műszeres setup mellett is. Ezzel támpontot adva a hasonló lehetőségekkel rendelkező kutatócsoportok számára az alkalmazható metodikák tekintetében. Munkám ezen részét, épp ebből a megfontolásból egy MR fókuszú metodikai lapban szeretném közölni, amely jelenleg is folyamatban van.

14 Diszkusszió

Munkám során behatóan megvizsgáltam a TRPA-1 receptor szerepét a neurogén gyulladással járó, demielinizációs folyamatokban, teljes KO, illetve mGFAP kondicionált KO egéren egyaránt. A GFAP az irodalomban széles körben elfogadott, mint asztrocita marker, továbbá a különböző neurodegeneratív kórképek rendre aktivált asztrocita akkumulációt okoznak, amely következményes GFAP túltermeléssel jár (Siracusa, Fusco et al. 2019).

A kísérletsorozatok elvégzésével sikerült bizonyítani, hogy a TRPA-1 receptornak fontos szerepe van a neurogén gyulladás kialakulásában, a demielinizáció és a következményesen kialakuló oligodendroglia pusztulás kialakulásában. A receptor genetikailag determiált hiányában egyértelműen protektív hatás alakul ki a cuprizone indukálta demielinizációs egérmodellben a 3. és 5. hét között. A hatás mind MR és elektronmikroszkópos képalkotással, mind pedig szövettani, immunhisztológiai tesztekkel igazolható. A szignifikáns protektív hatás a kísérletek 6. hetére azonban eltűnik.

Munkám első periódusában bizonyítottam, hogy a TRPA-1 total KO genotípus képes csökkenteni az érett oligodendrociták apoptotikus hajlamát. Mivel nemrég leírták az oligodendroglián megjelenő TRPA-1 expresszió, így ez egy közvetlen hatást feltételez (Hamilton, Kolodziejczyk et al. 2016). Mivel az asztrocitán lényegesen nagyobb mennyiségben expresszálódik a TRPA-1 receptor, így a közvetett hatásnak is lényeges hatása lehet a folyamatokra az asztrocita gyulladásos citokinek és növekedési faktorok felszabadításának szabályozásával. Fiziológiás körülmények között is fontos szerepe van az asztrocita-oligodendroglia kommunikációnak. Mivel a TRPA-1 receptor aktiválódhat különböző stimulusok által – gyulladás, szövetkárosodás, oxidatív stressz – illetve az asztrocita képes a toxinok által kiváltott proapoptotikus folyamatok közvetítésében és felerősítésében, így a receptor legalább két úton involválódhat a patomechanizmusban.

Számos korábbi tanulmányban leírták, hogy a TRPA-1 receptor fiziológiás állapotban részt vesz a normális Ca²⁺ -szint szabályozásában (Lee, Cho et al. 2012, Shigetomi, Tong et al. 2012, Shigetomi, Jackson-Weaver et al. 2013, Lee, Lee et al. 2016, Bosson, Paumier et al. 2017).

Egy friss tanulmányban Oh és munkatársai leírták, hogy az asztrocitákon expresszálódó TRPA-1 receptorok a célpontjai az alacsony intenzitású és alacsony frekvenciájú ultrahang (LILFU) segítségével kiváltott neuromodulációnak (Oh, Lee et al. 2019). A neuromoduláció ebben az esetben a TRPA-1 csatornán az ultrahang hatására létrejövő Ca²⁺ áram következményeként jön létre. A megnyíló csatorna hatására glutamát szabadul fel az asztrocitából, amely ingerületbe hozza a környező neuronok NMDA receptorait.

Egy másik szintén friss publikációban leírták, hogy a TRPA1 részt vesz az egér intracerebrális hemorrágiás (ICH) modell során kialakuló következményes demieliinizáció kialakulásában. Az ICH által létrehozott oxidatív stressz aktiválja a csatornát, amelynek hatására létrejön a Ca²⁺ influx és a következményes NOX1 és Calpain1 felszabadulás, amely súlyosbítja a mielinpusztulást (Xia, Chen et al. 2019).

Az a tény, hogy a total KO állatokban erősebb protektív hatás jött létre, mint az mGFAP kondicionált KO genotípus estén, arra utal, hogy nem csak a GFAP pozitív sejtek (legnagyobb részben az asztrociták) vesznek részt a folyamat szabályozásában, hanem több egyéb GFAP negatív, de TRPA1 receptort expresszáló (oligodendrocita, microglia, egyéb neuronok) sejttípusnak is fontos szerep juthat. A kísérlet késői fázisában a szignifikáns hatás eltűnése is azt a teóriát erősíti, hogy többlépcsős, több sejttípusra kiterjedő és komplexen modulált folyamatok zajlanak a háttérben. A továbbiakban mindenképp figyelmet érdemelnek e sejttípusok.

Munkám során sikerült kifejleszteni egy olyan jól reprodukálható MRI eljárást mely kiválóan alkalmas a demielinizáció követésére és félkvantitatív értékelésére. Ezen eljárást mind az elektronmikroszkópiával előállított mikrostrukturális elemzés, mind pedig a széleskörűen elvégzett robosztus és redundáns szövettani és immunhisztokémiai adatok validálták. Lehetővé vált nem csak a cuprizone modell, hanem bármely más demielinizációval járó pathomechanizmus időben feloldott követése is, hiszen a képalkotás tekintetében a demielinizációt kiváltó ágens vagy folyamat lényegében irreleváns.

Igaz, hogy az NAA mennyiségében beállt változást sikerült megfigyelni, de annak kiváltó okára jelenleg még nincs kellő információnk, mivel az irodalomban ellentmondásos

eredményeket látunk, illetve nincs meggyőző magyarázat a jelenségre (Praet, Orije et al. 2015) (Orije, Kara et al. 2015). Kutatócsoportunk az NAA-metabolizmus felderítésének irányába eddig nem végzett kísérleteket, ezek jelenleg is tervezés alatt állnak.

15 Új eredmények összesítése

- Egy új, robosztus és jól reprodukálható kísérleti eljárás kifejlesztése, amely standardként használható a demielinizációs kórképekben alkalmazni kívánt gyógyszerjelöltek preklinikai tesztelésére (Ilyen projektek azóta már zajlottak is, külső gyógyszeripari K+F cégek megrendelésére, ezek kapcsán azonban titoktartási kötelezettség terhel)
- Új genetikai konstellációval rendelkező, indukált GFAP-Cre TRPA1-KO kísérleti egérmodell létrehozása és tenyésztése az intézetben
- A cuprizone modell időbeni lefolyásának feltérképezése, súlyosságának kvantifikálása in vivo MRI segítségével, nem destruktív, önkontrollos eljárással
- In vivo MR-spektroszkópiás eljárás fejlesztése alacsony térerő mellett, amellyel nyomon követhetőek és félkvantitatív módon kiértékelhetőek a cuprizone által előidézett demielinizációs folyamatok metabolikus változásai
- •

16 Az értekezés alapjául szolgáló publikációk listája

- Kriszta, G., Nemes, B., Sándor, Z., Ács, P., Komoly, S., Berente, Z., Bölcskei, K., and Pintér, E. (2020). Investigation of cuprizone-induced demyelination in mGFAP-driven conditional transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor knockout mice. *Cells* 9, 81.
- Bölcskei, K., Kriszta, G., Sághy, É., Payrits, M., Sipos, É., Vranesics, A., Berente, Z., Ábrahám, H., Ács, P., and Komoly, S. (2018). Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *Journal of neuroimmunology* 320, 1-10.

Kriszta G., Pintér E., Berente Z.

In vivo magnetic resonance spectroscopy in cuprizone mouse model, an early diagnostic tool for demyelination. Beküldés alatt; Cells Special Issue "Mechanisms of Neurodevelopment and Neurodegeneration"

17 További publikációk listája

Kriszta, G., Kriszta, Z., Váncsa, S., Hegyi, P. J., Frim, L., Erőss, B., ... & Pintér, E. (2021).

Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on angiotensin-converting enzyme 2 levels: A comprehensive analysis based on animal studies. Frontiers in pharmacology, 12, 254.

Botz, B., Kriszta, G., Bölcskei, K., Horváth, Á. I., Mócsai, A., & Helyes, Z. (2021).

Capsaicin-Sensitive peptidergic sensory nerves are anti-inflammatory gatekeepers in the hyperacute phase of a mouse rheumatoid arthritis model. International Journal of Molecular Sciences, 22(4), 1682.

Bencze, N., Schvarcz, C., Kriszta, G., Danics, L., Szőke, É., Balogh, P., ... & Botz, B. (2021).
Desensitization of capsaicin-sensitive afferents accelerates early tumor growth via increased vascular leakage in a murine model of triple negative breast cancer. Frontiers in Oncology, 2597.

18 Köszönetnyilvánítás

Ez a munka nem jöhetett volna létre a következő emberek nélkül:

prof. Dr. Pintér Erika, témavezetőm, aki mindig időt és energiát nem kímélve segítette a munkámat mind szakmailag, mind emberileg,

Dr. Berente Zoltán, aki megtanított mindenre, amit az MR-ről tudok,

Dr. Bölcskei Kata, aki felbecsülhetetlen szakmai segítséget nyújtott a munkához

prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, aki a Szentágothai János Kutatóközpont tudományos igazgatójaként segítette a munkámat a műszeres facilitások rendelkezésemre bocsátásával,

továbbá számtalan kolléga az intézetben és azon kívül is akik munkájukkal és szaktudásukkal hozzájárultak ezen dolgozat elkészítéséhez.

Szeretném megköszönni Nyisztor Zsoltnak és Jánosi Lászlónak, hogy a tudományos pálya felé tereltek és példájukkal perspektívát mutattak diákéveim alatt.

Köszönettel tartozom a Richter Gedeon Centenáriumi alapítványnak a munkámhoz nyújtott anyagi támogatásért.

Külön köszönet jár a feleségemnek Dr. Kriszta Zsófiának, aki elviselte a sokszor hétvégébe és éjszakába nyúló munkákat és mindvégig támogatott.

19 Hivatkozások

Acs, P. and B. Kalman (2012). Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. <u>Autoimmunity</u>, Springer: 403-431.

Andersson, D. A., et al. (2012). "TRPA1 has a key role in the somatic pro-nociceptive actions of hydrogen sulfide."

Andersson, D. A., et al. (2013). "Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1." <u>PloS one</u> **8**(10): e77986.

AnimaLab. from <u>https://animalab.hu/dinamikus-plantaris-eszteziometer-dpa-mechanikai-stimulaciohoz</u>.

Bandell, M., et al. (2007). "From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs." <u>Current opinion in neurobiology</u> **17**(4): 490-497.

Bautista, D. M. (2015). Spicy science: David Julius and the discovery of temperature-sensitive TRP channels, Taylor & Francis. **2:** 135-141.

Bianchi, B. R., et al. (2012). "Species comparison and pharmacological characterization of human, monkey, rat, and mouse TRPA1 channels." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **341**(2): 360-368.

Blakemore, W. (1972). "Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice." <u>Journal of neurocytology</u> **1**(4): 413-426.

Bosson, A., et al. (2017). "TRPA1 channels promote astrocytic Ca2+ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide." <u>Molecular Neurodegeneration</u> **12**(1): 1-19.

Bölcskei, K., et al. (2018). "Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice." <u>Journal of Neuroimmunology</u> **320**: 1-10.

Brück, W., et al. (2012). "Reduced astrocytic NF-κB activation by laquinimod protects from cuprizoneinduced demyelination." <u>Acta neuropathologica</u> **124**(3): 411-424. Clapham, D. E., et al. (2001). "The TRP ion channel family." <u>Nature Reviews Neuroscience</u> **2**(6): 387-396.

Cruz-Orengo, L., et al. (2008). "Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1." <u>Molecular Pain</u> **4**: 1744-8069-1744-1730.

DeBerry, J. J., et al. (2014). "TRPA1 mediates bladder hyperalgesia in a mouse model of cystitis." <u>PAIN®</u> **155**(7): 1280-1287.

Dussor, G., et al. (2014). "Targeting TRP channels for novel migraine therapeutics." <u>ACS chemical</u> <u>neuroscience</u> **5**(11): 1085-1096.

Engel, M. A., et al. (2011). "TRPA1 and substance P mediate colitis in mice." <u>Gastroenterology</u> **141**(4): 1346-1358.

Fedorov, A., et al. (2012). "3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network." <u>Magnetic resonance imaging</u> **30**(9): 1323-1341.

Franco-Pons, N., et al. (2007). "Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination." <u>Toxicology letters</u> **169**(3): 205-213.

Goldberg, J., et al. (2015). "Anatomical distribution of cuprizone-induced lesions in C57BL6 mice." Journal of Molecular Neuroscience **57**(2): 166-175.

Gouin, O., et al. (2017). "TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: proinflammatory response induced by their activation and their sensitization." <u>Protein & cell</u> **8**(9): 644-661.

Grace, M., et al. (2014). "Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease." <u>British journal of pharmacology</u> **171**(10): 2593-2607.

Gudi, V., et al. (2014). "Glial response during cuprizone-induced de-and remyelination in the CNS: lessons learned." <u>Frontiers in cellular neuroscience</u> **8**: 73.

Hamilton, N. B., et al. (2016). "Proton-gated Ca2+-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia." <u>Nature</u> **529**(7587): 523-527.

Hennig, J., et al. (1986). "RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR." <u>Magnetic resonance in</u> <u>medicine</u> **3**(6): 823-833.

Herder, V., et al. (2011). "Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system." <u>Neuropathology and applied neurobiology</u> **37**(6): 676-684.

Herring, N. R. and C. Konradi (2011). "Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia." <u>Frontiers in bioscience (Scholar edition)</u> **3**: 23.

Hiremath, M., et al. (1998). "Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice." Journal of Neuroimmunology **92**(1-2): 38-49.

Huang, W. J., et al. (2017). "Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments." <u>Experimental</u> and therapeutic medicine **13**(6): 3163-3166.

Itoh, T., et al. (2003). "Bcl-2-related protein family gene expression during oligodendroglial differentiation." Journal of neurochemistry **85**(6): 1500-1512.

Kang, Z., et al. (2012). "IL-17-induced Act1-mediated signaling is critical for cuprizone-induced demyelination." Journal of Neuroscience **32**(24): 8284-8292.

Kipp, M., et al. (2009). "The cuprizone animal model: new insights into an old story." <u>Acta</u> <u>neuropathologica</u> **118**(6): 723-736.

Kipp, M., et al. (2017). "Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective." <u>Brain pathology</u> **27**(2): 123-137.

Komoly, S., et al. (1992). "Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences</u> **89**(5): 1894-1898.

Koutsoudaki, P. N., et al. (2009). "Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model." <u>Neuroscience letters</u> **451**(1): 83-88.

Kraeuter, A.-K., et al. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. <u>Pre-clinical models</u>, Springer: 105-111.

Kriszta, G., et al. (2020). "Investigation of cuprizone-induced demyelination in mGFAP-driven conditional transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor knockout mice." <u>Cells</u> **9**(1): 81.

Lajoso, W., et al. (2021). "Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) Block Protects against Loss of White Matter Function during Ischaemia in the Mouse Optic Nerve." <u>Pharmaceuticals</u> **14**(9): 909.

Lee, K.-I., et al. (2016). "Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease." Journal of Neuroinflammation **13**(1): 1-16.

Lee, S. M., et al. (2012). "An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus." <u>Journal of chemical</u> <u>neuroanatomy</u> **45**(1-2): 45-49.

Lehto, S. G., et al. (2016). "Selective antagonism of TRPA1 produces limited efficacy in models of inflammatory-and neuropathic-induced mechanical hypersensitivity in rats." <u>Molecular Pain</u> **12**: 1744806916677761.

Li, D.-H., et al. (2008). "Advances on mutant p53 research." <u>Yi chuan= Hereditas</u> **30**(6): 697-703.

Liebetanz, D. and D. Merkler (2006). "Effects of commissural de-and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis." <u>Experimental neurology</u> **202**(1): 217-224.

Linares, D., et al. (2006). "Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination." Journal of Neuroscience **26**(49): 12672-12681.

Lindsten, T., et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." <u>Molecular cell</u> **6**(6): 1389-1399.

Makinodan, M., et al. (2009). "Demyelination in the juvenile period, but not in adulthood, leads to long-lasting cognitive impairment and deficient social interaction in mice." <u>Progress in Neuro-</u><u>Psychopharmacology and Biological Psychiatry</u> **33**(6): 978-985.

Mason, J., et al. (2001). "Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre." <u>Neuropathology and applied neurobiology</u> **27**(1): 50-58.

Matsushima, G. K. and P. Morell (2001). "The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system." <u>Brain pathology</u> **11**(1): 107-116.

Motter, A. L. and G. P. Ahern (2012). "TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals." <u>PloS</u> one **7**(6): e38439.

Nagata, K. (2007). "TRP channels as target sites for insecticides: physiology, pharmacology and toxicology." <u>Invertebrate Neuroscience</u> **7**(1): 31-37.

Nilius, B., et al. (2005). "TRP channels in disease." Science's STKE 2005(295): re8-re8.

NMSS (2022). "National MS Society, USa." from <u>https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS</u>.

Noldus. from https://www.noldus.com/index.php/ethovision-xt.

OEP (2010). "A sclerosis multiplex diagnosztikája és kezelése." from <u>http://site.oep.hu/prot2/23_A_sclerosis_multiplex_diagnosztikaja_es_kezelese_finanszirozasi_protok_oll_hatteranyag.pdf</u>.

Oh, S.-J., et al. (2019). "Ultrasonic neuromodulation via astrocytic TRPA1." <u>Current Biology</u> **29**(20): 3386-3401. e3388.

Olechowski, C. J., et al. (2009). "Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." <u>PAIN®</u> **141**(1-2): 156-164.

Orije, J., et al. (2015). "Longitudinal monitoring of metabolic alterations in cuprizone mouse model of multiple sclerosis using 1H-magnetic resonance spectroscopy." <u>Neuroimage</u> **114**: 128-135.

Pachner, A. R. (2011). "Experimental models of multiple sclerosis." <u>Current opinion in neurology</u> **24**(3): 291-299.

Pasquini, L. A., et al. (2007). "The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia." <u>Neurochemical research</u> **32**(2): 279-292.

Pijnappel, W., et al. (1992). "SVD-based quantification of magnetic resonance signals." <u>Journal of</u> <u>Magnetic Resonance (1969)</u> **97**(1): 122-134.

Praet, J., et al. (2015). "Cuprizone-induced demyelination and demyelination-associated inflammation result in different proton magnetic resonance metabolite spectra." <u>NMR in Biomedicine</u> **28**(4): 505-513.

Procaccini, C., et al. (2015). "Animal models of multiple sclerosis." <u>European journal of pharmacology</u> **759**: 182-191.

Remington, L. T., et al. (2007). "Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination." <u>The American journal of pathology</u> **170**(5): 1713-1724.

Sághy, É., et al. (2016). "TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination—A new target against oligodendrocyte apoptosis." <u>Glia</u> **64**(12): 2166-2180.

Sand, I. K. (2015). "Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis." <u>Current</u> opinion in neurology **28**(3): 193-205.

Schalomon, P. M. and D. Wahlsten (2002). "Wheel running behavior is impaired by both surgical section and genetic absence of the mouse corpus callosum." <u>Brain research bulletin</u> **57**(1): 27-33.

Schenkel, L. B., et al. (2016). "Optimization of a novel quinazolinone-based series of transient receptor potential A1 (TRPA1) antagonists demonstrating potent in vivo activity." <u>Journal of medicinal</u> <u>chemistry</u> **59**(6): 2794-2809.

Schneider, C. A., et al. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." <u>Nature methods</u> **9**(7): 671-675.

Shigetomi, E., et al. (2013). "TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release." Journal of Neuroscience **33**(24): 10143-10153.

Shigetomi, E., et al. (2012). "TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3." <u>Nature neuroscience</u> **15**(1): 70-80.

Siracusa, R., et al. (2019). "Astrocytes: role and functions in brain pathologies." <u>Frontiers in</u> <u>Pharmacology</u>: 1114.

Skripuletz, T., et al. (2010). "Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model." <u>Brain</u> <u>pathology</u> **20**(2): 301-312.

Skripuletz, T., et al. (2013). "Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination." <u>Brain</u> **136**(1): 147-167.

Skripuletz, T., et al. (2008). "Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent." <u>The American journal of pathology</u> **172**(4): 1053-1061.

Story, G. M., et al. (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." <u>Cell</u> **112**(6): 819-829.

Tkáč, I., et al. (2004). "Highly resolved in vivo 1H NMR spectroscopy of the mouse brain at 9.4 T." <u>Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine</u> **52**(3): 478-484.

Torkildsen, \emptyset ., et al. (2008). "The cuprizone model for demyelination." <u>Acta Neurologica Scandinavica</u> **117**: 72-76.

Ugobasile. from <u>https://www.ugobasile.com/products/catalogue/pain-and-inflammation/item/52-37450-275-von-frey-hairs</u>.

Veto, S., et al. (2010). "Inhibiting poly (ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death." <u>Brain</u> **133**(3): 822-834.

Voß, E. V., et al. (2012). "Characterisation of microglia during de-and remyelination: can they create a repair promoting environment?" <u>Neurobiology of disease</u> **45**(1): 519-528.

Wilson, S. R. and D. M. Bautista (2010). "16 Role of Transient Receptor Potential Channels in Acute and Chronic Itch."

Xia, M., et al. (2019). "TRPA1 activation-induced myelin degradation plays a key role in motor dysfunction after intracerebral hemorrhage." <u>Frontiers in Molecular Neuroscience</u> **12**: 98.

Xiao, L., et al. (2008). "Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes." <u>Molecular psychiatry</u> **13**(7): 697-708.

Xu, H. and X.-M. Li (2011). "White matter abnormalities and animal models examining a putative role of altered white matter in schizophrenia." <u>Schizophrenia Research and Treatment</u> **2011**.

Xu, H., et al. (2009). "Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone." <u>Behavioral neuroscience</u> **123**(2): 418.

Zeger, M., et al. (2007). "Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination." <u>Glia</u> **55**(4): 400-411.

Zhang, H., et al. (2013). "Locomotor activity and anxiety status, but not spatial working memory, are affected in mice after brief exposure to cuprizone." <u>Neuroscience bulletin</u> **29**(5): 633-641.

Contents lists available at ScienceDirect





Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice



Kata Bölcskei^{a,b}, Gábor Kriszta^{a,b,c}, Éva Sághy^{a,b,d}, Maja Payrits^{a,b}, Éva Sipos^e, Anett Vranesics^{c,f}, Zoltán Berente^{c,f}, Hajnalka Ábrahám^g, Péter Ács^e, Sámuel Komoly^e, Erika Pintér^{a,b,*}

^a Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

^b Molecular Pharmacology Research Group, János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary

^c Research Group for Experimental Diagnostic Imaging, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

^d Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University, Budapest, Hungary

e Department of Neurology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

f Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

⁸ Department of Medical Biology and Central Electron Microscopy Laboratory, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords: Cuprizone TRPA1 receptor Demyelination Magnetic resonance imaging Electron microscopy Open field test

ABSTRACT

We have recently reported that the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor deficiency significantly attenuated cuprizone-induced demyelination by reducing the apoptosis of mature oligodendrocytes. The aim of the present study was to gather additional data on the role of TRPA1 by investigating the time course of behavioural alterations and morphological changes in cuprizone-treated TRPA1 receptor gene-deficient mice.

Demyelination was induced by feeding male wild-type (WT) and TRPA1 gene-deleted (TRPA1 KO) mice with 0.2% cuprizone for 6 weeks. Behavioural tests were performed once per week to follow cuprizone-induced functional changes. Mechanonociceptive thresholds were investigated by a dynamic plantar aesthesiometer and von Frey filaments. Motor performance was assessed by accelerating RotaRod and horizontal grid tests. For the study of spontaneous activity, the open field test was used. The time course of corpus callosum demyelination was also followed weekly by magnetic resonance imaging (MRI). Histological analysis of myelin loss was performed with Luxol Fast Blue (LFB) staining at week 3 and electron microscopy (EM) at week 6. Astrocyte and microglia accumulation at week 3 was assessed by immunohistochemistry (IHC).

Cuprizone treatment induced no changes in mechanonociception or motor performance. In the open arena, cuprizone-treated mice spent more time with locomotion, their mean velocity was significantly higher and the distance they travelled was longer than untreated mice. No statistical difference was detected between WT and TRPA1 KO mice in these parameters. On the other hand, significantly increased rearing behaviour was induced in WT mice compared to TRPA1 KO animals. Morphological changes detected with MRI, LFB, IHC and EM analysis revealed reduced damage of the myelin and attenuated accumulation of astrocytes and microglia in cuprizone-treated TRPA1 KO animals, at each examined time point.

Our recent data further suggest that inhibition of TRPA1 receptors could be a promising therapeutic approach to limit central nervous system damage in demyelinating diseases.

1. Introduction

Cuprizone is a copper-chelating compound known to exert selective toxicity on oligodendrocytes resulting in apoptosis and subsequent demyelination in several brain regions, such as the corpus callosum and the superior cerebellar peduncles, as well as various cortical and subcortical grey matter areas (Kipp et al., 2009; Matsushima and Morell, 2001; Praet et al., 2014). In C57Bl/6 mice, standardization of the cuprizone treatment protocol (0.2% mixed into food for 6 weeks) achieved that well-reproducible demyelinated lesions were formed while animals remained in good general condition without developing severe neurological defects and lethality (Hiremath et al., 1998). While

Abbreviations: TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1; LFB, Luxol Fast Blue; CV, Cresyl Violet; DPA, dynamic plantar aesthesiometer; IHC, immunohistochemistry * Corresponding author at: Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School, H-7624 Pécs, Szigeti út 12., Hungary. *E-mail address:* erika.pinter@aok.pte.hu (E. Pintér).

https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.03.020

Received 25 November 2017; Received in revised form 24 March 2018; Accepted 25 March 2018 0165-5728/ @ 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal of Neuroimmunology 320 (2018) 1-10

the precise mechanism of cuprizone toxicity is still not clear, it has been repeatedly shown that cuprizone exposure induces apoptosis of mature oligodendrocytes and demyelination accompanied by astrocyte and microglia accumulation. The histological appearance and characteristics of cuprizone-induced oligodendrocyte loss highly resemble type III lesion of multiple sclerosis which is characterized by astrogliosis and microgliosis but only few lymphocytes are present (Lucchinetti et al., 2000). Therefore, the cuprizone model is now an accepted animal model of multiple sclerosis for the study of the mechanisms of oligodendrocyte apoptosis and remyelination (Ács and Kálmán, 2012; Kipp et al., 2017).

Although the administration of the standard 0.2% cuprizone rarely leads to serious disability, functional assessment of mice revealed abnormal gait and impaired motor coordination at the peak of demyelination (Franco-Pons et al., 2007; Liebetanz and Merkler, 2006), as well as several behavioural-cognitive alterations including increased exploratory behaviour, decreased anxiety-like behaviour or decreased social interaction and impaired spatial working memory, some of which appeared already after shorter cuprizone exposures (Franco-Pons et al., 2007; Makinodan et al., 2009; Xiao et al., 2007; Xu et al., 2009).

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptors are nonselective cation channels primarily expressed by small-diameter cells of dorsal root and trigeminal ganglia. They are characterized by multimodal activation since it has been shown that noxious cold temperatures, irritant chemicals (e.g. mustard oil, acrolein), as well as reactive compounds such as aldehydes or reactive oxygen species can stimulate the receptor (Chen and Hackos, 2015; Nilius et al., 2012). Their role in nociception and peripheral inflammation has been extensively studied. Focus has also turned to the non-neuronal expression of TRPA1 on the periphery (Fernandes et al., 2012), while more recently, TRPA1 channels were also located in the CNS on astrocytes (Lee et al., 2012; Sághy et al., 2016; Shigetomi et al., 2012) and oligodendrocytes (Hamilton et al., 2016). It has been suggested that TRPA1 contributes to resting Ca²⁺ levels in astrocytes and participates in the regulation of GABAergic inhibitory transmission (Shigetomi et al., 2012) as well as long term potentiation (Shigetomi et al., 2013). One of the first in vivo data on the role of TRPA1 in the CNS was obtained in our recent study in which we established that the absence of TRPA1 receptors substantially diminished demyelination of the corpus callosum produced by a 6-week cuprizone treatment (Sághy et al., 2016). Almost coincidently, another in vivo study investigating a mouse Alzheimer's disease model confirmed that astrocytic TRPA1 receptors contributed to the development of beta amyloid-induced neuroinflammation (Lee et al., 2016), while TRPA1 on oligodendrocytes was shown to contribute to ischemia-induced demyelination in an ex vivo model (Hamilton et al., 2016). Another study investigating the effect of beta amyloid oligomers on hippocampal astrocytes showed that Ca²⁺ hyperactivity induced by oligomers in astrocyte thin processes was dependent on TRPA1 receptors (Bosson et al., 2017).

To further explore the role of TRPA1 receptors in the cuprizone model we aimed to follow the course of cuprizone-induced functional and morphological changes with behavioural methods and magnetic resonance imaging, respectively and analyse ultrastructural damage by electron microscopy.

2. Methods

2.1. Animals

TRPA1^{+/+} (wild-type, WT) and TRPA1^{-/-} (knockout, KO) mice were bred and kept at the animal house of the Department of Pharmacology and the animal house of János Szentágothai Research Center, University of Pécs at 24 °C, provided with food and water ad libitum. A maximum of 8 animals were kept in standard polycarbonate cages (width: 160 mm, length: 330 mm, height: 137 mm, floor space: 530 cm²). The original heterozygous breeding pair of $TRPA1^{+/-}$ mice were kindly gifted by Prof. P. Geppetti (University of Florence, Italy).

2.2. Ethics

Experiment were designed and conducted according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes. The project was approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County (license No. BA02/2000–17/2015).

2.3. Cuprizone treatment protocols

Male, 8 to 9-week-old mice were supplied with 0.2% cuprizone mixed into finely-ground standard rodent chow ad libitum. Demyelination induced by 0.2% cuprizone treatment has proved to be reproducible for this age group (Hiremath et al., 1998). Control mice were fed the same milled chow without the addition of the drug. The powdered food was placed into the cages in small ceramic bowls. Fresh powder was provided daily, while at the same time mice were observed in their home cages for signs of pain, distress or motor impediment. Monitoring of body weight changes was performed at 2-day intervals. Treatment was continued for 6 weeks with the exception of one series when animals were sacrificed after 3 weeks in order to obtain histological samples at an earlier time. In the first 6-week cohort, all mice were subject to tests of nociception, motor function and spontaneous behaviour distributed evenly during the week with each test performed on the same day of the week. Measurements performed after the completion of one week of treatment (between days 8 and 12) were considered as "week 1" of treatment and the following weeks' measurements were scheduled likewise. Animals were euthanized after completing 6 weeks of treatment (day 42). In the second series, only the spontaneous behaviour assessment was repeated to replicate the results of the first cohort without the potential interference of other tests. The third 6week cohort was assessed weekly with MRI from the completion of week 2 to week 6.

2.4. Measurement of the mechanonociceptive threshold

Mechanonociception of the hind paws of mice was investigated by von Frey filaments and a Dynamic Plantar Aesthesiometer (DPA, Ugo Basile, Comerio, Italy). Mice were placed in an elevated observation chamber on a wire mesh platform and allowed to habituate for at least 15 min. The animals were not removed from the chamber between the two measurements; the two methods were used consecutively after a short interval. First, von Frey filaments were pressed 5 times onto the plantar surface of the paw in an ascending order until paw withdrawal occurred. Two withdrawals out of 5 trials were considered as a positive response and the force corresponding to the filament was recorded as the threshold. The DPA device can be used to apply an increasing force of pre-set parameters to press a blunt metal needle to the animals paw. For mice, a ramp of 2 g/s and a cut-off value of 10 g were set. At the moment of paw withdrawal, the needle automatically falls back into the starting position and the threshold value (in grams) can be read on the display. Each paw was measured three times and the mean of the three values was recorded as the threshold. In these tests, the experimenter was not blinded to the genotype and treatment of mice.

2.5. Assessment of motor performance

Grip strength was evaluated with the horizontal wire grid method. Briefly, mice were placed on the removable wire mesh floor of the DPA device which was quickly turned over and held at a height of approximately 30 cm over a box filled with a thick layer of wooden shavings bedding until the animals fell. The cut-off time was set to 60 s. Mice were habituated to the test for 3 days before the start of the treatment.

Motor coordination was assessed with an accelerated RotaRod device (Ugo Basile, Comerio, Italy) which was set to rotate at a speed of 4 rpm and accelerate gradually to 40 rpm over a period of 5 min. Mice were trained to run on the wheel for 3 days before control measurements were made.

After the start of cuprizone treatment, repeated horizontal grid tests and RotaRod tests were performed once weekly. The experimenter was not blinded to the genotype and treatment of mice. On each occasion the latency to fall of 3 trials were averaged for both tests.

2.6. Assessment of behaviour in the open field test

For the open field test, animals were placed into an open arena (39 cm wide \times 59 cm long \times 52 cm high) and filmed for 10 min with a digital camera. Recordings were evaluated with the Ethovision XT 11 software (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) for the determination of the time, distance and velocity of locomotion, while the number of rearings was counted manually by an observer. The experimenter performing the recordings and the manual evaluation was blinded to the group allocation.

2.7. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The time course of demyelination was followed by MRI on 3–3 mice from each treatment group. Animals were scanned once before cuprizone administration and then once per week starting from week 2 of the treatment using a Bruker® PharmaScan® (4.7 T) small-animal MRI instrument. Anaesthesia was induced by 3% V/V of isoflurane in a gas mixture of 33% O₂ and 66% N₂O via rodent face mask and maintained with 1–2% isoflurane controlled by respiratory monitoring system.

The imaging protocol was performed on the same day and same time each week. After B0 mapping a multislice fast T2 RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) experiment was performed (TR/TE: 3000/50 ms, FOV: 16×16 mm, Thk: 0.8 mm, Gap: 0.2 mm, matrix: 160×160 , 4 averages, RARE factor: 4) on seven coronal slices positioned to cover the whole corpus callosum. The total imaging time was roughly 12 min per animal.

For MRI analysis, all imaging data were first converted into a DICOM (Digital Imaging Communications in Medicines) format and stored in an isolated hardware in a local system. Any further processing was performed via DICOM-handling software packages. (3D-Slicer v4.6, Onis v2.5). For the quantification of the damage, regions of interests (ROI) were manually circumscribed in the medial corpus callosum and the signal intensities (as mean \pm SEM) of ROI's have been recorded. Results were expressed in percentage of intensity ratio, compared to the pre-treatment intensity (considered as 100%) measured in the possibly identical brain area of the same individual animal.

2.8. Histology

2.8.1. Luxol Fast Blue-cresyl violet (LFB/CV) staining

Animals were anesthetized with pentobarbital (70 mg/kg i.p.) after 3 weeks of cuprizone treatment and perfused transcardially with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Brains were postfixed overnight in the same fixative. Paraffin-embedded brains were coronally sectioned to 8 μ m thickness and mounted onto silane-coated slides. Demyelination of the corpus callosum was evaluated using LFB/CV staining as described previously (Ács and Kálmán, 2012; Sághy et al., 2016) on coronal sections obtained from different regions (0.14, -0.22, -1.06, and -1.94 mm, i.e., Figs. 30, 33, 40, and 47) according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Briefly, silane-coated slides were rehydrated in graded series of alcohol to 95% and incubated in LFB solution (0.01%) overnight at 60 °C. Thereafter, sections were differentiated in lithium carbonate solution (0.05%) and counterstained with CV. LFB/CV stained sections were scored by a semiquantitative four-tiered scoring system from zero to three in a blinded manner. A score of 0 was used to indicate intact myelin, whereas score of 3 was given equivalent to totally demyelinated corpus callosum.

2.8.2. Immunohistochemistry

For quantification of astrocyte and microglia accumulation in the corpus callosum at week 3 of treatment, immunohistochemical staining was performed. Briefly, 8 µm-thick paraffin sections were deparaffinized and heat-unmasked in citrate buffer. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity, treated with BSA and incubated for 1 h with the following primary antibodies: anti-glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP, 1:1000, rabbit polyclonal, Dako, catalogue $N^{\rm o}$ Z0334; Antibody Registry $N^{\rm o}$ AB_10013382) to visualize astrocytes, anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (anti-Iba-1, 1:500, rabbit polyclonal, Wako Chemicals, catalogue Nº 019–19741; Antibody Registry Nº AB 839504) as a marker for microglia/macrophages. Incubation was performed with the HISTO-Labeling System, rabbit and the reaction was visualized using 3,3'-diaminobenzidine reaction. Sections were photographed with Olympus DP50 camera attached to a Olympus BX51 microscope under 200× magnification. Quantification was performed by determining the mean density of equal-sized regions of interest of the medial corpus callosum with the ImageJ software. The experimenter evaluating the slides was blinded to the group allocation.

2.8.3. Electron microscopy

For electron microscopy, mice which were previously followed by the MRI (n = 3/treatment or control group) were used after completing the 6-week treatment. Animals were transcardially perfused with phosphate buffer (PB 0.1 M, pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde with 2.5% glutaraldehyde in PB. After removal of the brain from the skull, blocks of approximately 1 mm³ were cut from the body of corpus callosum at the level of the optic chiasm (-0.2 to +0.3 mm from bregma) and postfixed overnight at 4 °C in the same fixative used for the perfusion. These blocks then were fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 MPB for 35 min. After dehydration in an ascending ethanol series, with uranyl acetate (1%) included in the 70% ethanol stage to increase contrast, blocks were transferred to propylene oxide before being placed into aluminium-foil boats containing Durcupan resin and then embedded in gelatin capsules containing the same resin. Semithin and serial ultrathin sections were cut with a Leica ultramicrotome, and mounted on mesh and on collodion-coated (Parlodion, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) single-slot copper grids. Additional contrast was provided to these sections with uranyl acetate and lead citrate, and they were examined in JEOL 1200EX-II electron microscope.

Quantification of myelination was performed by counting myelinated axons and cross section of unmyelinated profiles with electron density similar to that found in myelinated axons. Comparison between treatment groups was made on the percentage values of myelinated axons obtained from each field of view. The experimenter evaluating the electronmicrographs was blinded to the group allocation.

2.9. Materials

Cuprizone and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated. Pentobarbital (Euthanimal 20% injection *ad us. vet.*) was obtained from Alfasan Nederland B.V. (Woerden, Netherlands) while isofluran (Forane) was provided by the Central Clinical Pharmacy of the University of Pécs.

2.10. Statistics

In each group, means \pm S.E.M. of parameters were calculated. Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software. For comparison of behavioural results and MRI intensity values between the four treatment groups over time, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used to compare density values of immunohistological staining and percentages of myelinated axons on electron micrographs, while statistical comparison of histological score values was performed with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. In all cases, p < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. General health status of animals

Cuprizone induced mild significant weight loss in both TRPA1 WT and TRPA1 KO mice compared to their untreated counterparts. There was no statistically significant difference between the body weight changes of cuprizone-treated TRPA1 WT and TRPA1 KO animals (twoway ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; Supplementary Fig. 1).

Sickness behaviour accompanied by excessive body weight drop occurred on two occasions; both after 3 weeks of cuprizone treatment (one in the TRPA1 WT group and one in the TRPA1 KO group). These animals were promptly euthanized. Another two animals, both among the cuprizone-treated TRPA1 KO mice were severely wounded by cagemates which led to their exclusion and subsequent euthanasia.

3.2. Mechanonociceptive threshold changes during cuprizone treatment

Mechanonociceptive thresholds measured with the von Frey filaments fluctuated over time, while the DPA yielded more reproducible values with very little variability. However, no statistically significant difference was found between the nociceptive thresholds obtained with any of the methods, at any measurement times with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test (Fig. 1A, B).

3.3. Grip strength and RotaRod motor performance during cuprizone treatment

Weekly tests assessing motor functions yielded highly reproducible values with both methods in each treatment group, but no significant difference was observed between them at any of the time points with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test (Fig. 1C, D).

3.4. Cuprizone-induced changes in open field behaviour

Cuprizone-treated wild-type mice spent more time with locomotion, their mean velocity was significantly higher and the distance they travelled was also consequently longer than untreated wild-type mice at weeks 2 and 3 of treatment (p < 0.01 and p < 0.001, respectively, with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; Fig. 2A, B, C). Comparison of cuprizone-treated TRPA1 KO mice with their corresponding untreated counterparts only resulted in significant differences at week 3 for the time spent moving (p < 0.05), and week 2 for velocity and distance (p < 0.01 and p < 0.001, respectively, with twoway ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; Fig. 2A, B, C). However, no statistical difference was detected between cuprizonetreated TRPA1 WT and KO mice in these parameters at any of the measurement times. On the other hand, significantly increased rearing behaviour was induced by cuprizone treatment in WT mice starting from week 2 until week 5 (p $\,<\,$ 0.01 at weeks 2, 4, 5 and p $\,<\,$ 0.001 at week 3) which was much less pronounced in TRPA1 KO mice being significantly different at week 3 and 4 compared to WT animals (p < 0.05 with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; Fig. 2D). Analysis of the percentage time spent in the central zone of the arena revealed no statistically significant differences between any of the treatment groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; data not shown).

3.5. Detection of cuprizone-induced changes in the medial corpus callosum by MRI

The time course of demvelination was followed by the evaluation of signal intensity changes of T2 weighted images in the medial part of the corpus callosum between week 2 and 6 of treatment. The intensity values of the two untreated control groups were not significantly different and no changes were detected in any of the control animals throughout the whole experiment (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). On the other hand, signal intensity was significantly increased compared to the baseline in cuprizone-treated TRPA1 WT mice from week 2 until the end of treatment (p < 0.001 at all time points with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test), while the change in the treated TRPA1 KO group was significantly lower at each measurement time point compared to treated WT animals (p < 0.01 at week 2 and 6, p < 0.001 from week 3 to 5 with two-wayANOVA followed by Bonferroni post hoc test). The most pronounced increase was detected on the third week, 149.6% in WT and 126.0% in TRPA1 KO mice. The water content declined slightly at later measurement times, but the significant protective effect of the lack of TRPA1 receptors was detectable during the whole treatment (Fig. 3).

3.6. Histological scoring of myelin content after 3 weeks of treatment

Semiquantitative scoring of the demyelination in the corpus callosum on LFB-stained slides revealed that demyelination in cuprizonetreated TRPA1 WT mice was nearly complete at this point (Fig. 4A). Compared to their WT counterparts, the score was significantly lower in TRPA1 KO animals treated with cuprizone (p < 0.001 with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test; Fig. 4B).

3.7. Quantification of astrocyte and microglia/macrophage accumulation after 3 weeks of treatment

Immunohistochemical staining for GFAP (Fig. 5A) and Iba1 (Fig. 5B) showed that there was significant recruitment of astrocytes and microglia/macrophages at week 3 of cuprizone administration. Comparing the mean density of the colour reaction it was revealed that both astrocyte and microglia/macrophage accumulation was less severe in cuprizone-treated TRPA1 KO mice compared to their treated WT counterparts (p < 0.001 with one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, Fig. 5C, D).

3.8. Quantification of myelinated axons after 6 weeks of treatment

The majority of the fields of view of electron micrographs from the corpus callusom was occupied by myelinated axons with large diameter in both TRPA1 WT and KO mice. Cuprizone treatment caused dramatic reduction of myelinated axons' numbers both in WT and in KO animals (Fig. 6A) which was statistically significant in both groups compared to their respective untreated controls (both p < 0.001 with one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; Fig. 6B). However, cuprizone-induced demyelinated axons was found to be significantly higher in cuprizone-treated TRPA1 KO compared to WT mice (p < 0.01 with one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test; Fig. 6B).



Fig. 1. Weekly measurements of mechanonociceptive thresholds and motor performance during cuprizone treatment. Graphs show the results of untreated control (CTRL) and cuprizone-treated (CPZ) TRPA1 wild-type (WT) and gene-deleted (KO) mice. Mechanonociceptive thresholds were measured by von Frey filaments (A) or dynamic plantar aesthesiometry (B) and motor performance was assessed by the RotaRod (C) or horizontal wire grid tests (D). Data are means \pm S.E.M. of 8–9 animals.

4. Discussion

In the present study investigating the time course of cuprizone-induced functional and morphological changes we have confirmed our previous results (Sághy et al., 2016) on the role of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model by different approaches and attempted to assess the functional relevance of the protective effect of TRPA1 deficiency in the model.

Based on our prior data it can be hypothesized that the less severe myelin loss seen in TRPA1 receptor gene-deficient mice is a consequence of attenuated demyelination and not enhanced remyelination. Our present findings add the following data to further support this hypothesis: (1) repeated MRI measurements have revealed that the difference between cuprizone-treated WT and TRPA1 KO animals appeared already after 2 weeks of treatment and was maintained throughout the rest of the study; (2) the same significant difference in demyelination detected by conventional LFB staining as well as significantly less astrocyte and microglia recruitment have also been demonstrated after 3 weeks of treatment. Furthermore, we have performed an objective ultrastructural quantification of myelin loss in the corpus callosum by visualizing myelinated axons by electron microscopy which also showed that the relative decrease of myelinated axons was significantly larger in WT compared to TRPA1 KO mice.

Our aim to follow functional changes by behavioural tests ended with mixed results as we could only demonstrate significant difference between the two genotypes in one parameter: rearing behaviour in the open arena. In our study significant motor dysfunction or changes in noxious mechanosensation were not detectable after cuprizone treatment. The fact that no gross motor or somatosensory deficit developed in cuprizone-treated mice despite the profound demyelination of the corpus callosum is not entirely surprising. No previous studies investigated the changes of mechanonociceptive threshold in the

cuprizone model. The reported motor skill impairments were either the results of assessing untrained animals on the RotaRod (Franco-Pons et al., 2007) or voluntary running on a more difficult, complex wheel (Franco-Pons et al., 2007; Hibbits et al., 2009; Liebetanz and Merkler, 2006). A decline in performance in these studies could have been influenced by a number of factors other than muscle weakness and could thus reflect a deficit in adaptive motor coordination, learning and motivation. This feature of the cuprizone model is in sharp contrast with other widely-used multiple sclerosis models, such as the murine experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) which is characterized by a rapidly developing paralysis (Kipp et al., 2017; Pachner, 2011) and neuropathic mechanical and cold allodynia, as well (Olechowski et al., 2009). Of note, no substantial oligodendrocyte loss and demyelination develops in the spinal cord upon cuprizone treatment (Herder et al., 2011). While this could be considered as a weakness of the cuprizone model, the restricted anatomical distribution of lesions preventing the development of overt functional deficits makes it ethically more acceptable than the EAE models. Therefore it could be emphasized that it is a strength of the model that histological and molecular changes of demyelination can be studied in these lesions while the general condition of animals remains satisfying.

We found increased locomotion and rearing behaviour in the open field test in both cuprizone-treated WT and KO mice, indicating increased exploratory behaviour and a state of impulsivity. Similar behavioural changes along with increased climbing behaviour and reduced anxiety in the elevated plus maze test have previously been described occurring during the course of cuprizone administration (Franco-Pons et al., 2007; Xu et al., 2009). At the current stage of knowledge about cuprizone effects on the mouse brain, it is difficult to provide a straightforward explanation on these behavioural alterations. It is also not clear why we could only establish a functional improvement of TRPA1 deficiency in only one parameter. The absence or


Fig. 2. Weekly determination of spontaneous activity in the open field during cuprizone treatment. Graphs show the results of untreated control (CTRL) and cuprizone-treated (CPZ) TRPA1 wild-type (WT) and gene-deleted (KO) mice. The time spent with locomotion (A), the travelled distance (B), the mean velocity (C) and the number of rearings (D) were measured. Data are means \pm S.E.M. of 13–17 animals. Asterisks denote statistically significant differences between respective CTRL and CPZ groups (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001), while hash marks label statistically significant differences between respective WT and KO groups (*p < 0.05) as analysed with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.



Fig. 3. Changes of signal intensity in the medial corpus callosum determined by magnetic resonance imaging between weeks 2 and 6 of cuprizone treatment. (A) Representative T2-weighted images obtained after 3 weeks of treatment. (B) The time course of the relative intensity changes of untreated control (CTRL) and cuprizone-treated (CPZ) TRPA1 wild-type (WT) and gene-deleted (KO) mice. Data are means \pm S.E.M. of 5–8 images obtained from 3–3 animals. The signal intensities are normalized to the pre-treatment values for each groups. Asterisks denote statistically significant differences between respective CTRL and CPZ groups (*p < 0.05, ***p < 0.001), while hash marks label statistically significant differences between respective WT and KO groups (**p < 0.01, ***p < 0.001) as analysed with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.



Fig. 4. Evaluation of myelin content by Luxol Fast Blue-cresyl violet (LFB/CV) staining after 3 weeks of cuprizone treatment. (A) Representative images of the medial corpus callosum (coronal sections, -0.1 mm from bregma) on LFB/CV-stained slides in untreated control and cuprizone-treated wild-type (WT) and TRPA1 gene-deleted (KO) mice. Blue staining indicates intact myelin sheaths. Scale bars are $100 \,\mu\text{m}$. (B) Semiquantitative scoring of demyelination in untreated control (CTRL) and cuprizone-treated (CPZ) WT and TRPA1 KO mice. Data are means \pm S.E.M. of 12–12 images obtained from 3–3 animals. Asterisks denote statistically significant differences between respective CTRL and CPZ groups (****p < 0.0001), while hash marks label statistically significant differences between respective WT and KO groups (****p < 0.001) as analysed with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

transection of the corpus callosum in mice results in little functional deficit (Schalomon and Wahlsten, 2002). One must bear in mind that cuprizone induces demyelination not only in the corpus callosum but several prominent grey matter areas (Gudi et al., 2009; Koutsoudaki et al., 2009; Skripuletz et al., 2008, 2010) and signs of metabolic stress could also be detected in brain areas without consequent myelin loss (Goldberg et al., 2015). Since our morphological study focused on the

corpus callosum, which is traditionally evaluated in the cuprizone model, we cannot rule out that due to regional differences of TRPA1 expression the protective effect did not uniformly develop in all brain areas. Moreover, various steps of neurotransmitter synthesis or elimination can also be affected by cuprizone. It was reported that activities of monoamine oxidase (MAO) and dopamine- β -hydroxylase decreased, while dopamine levels increased in the prefrontal cortex during



Fig. 5. Evaluation of astrocyte and microglia/macrophage accumulation by immunohistochemistry after 3 weeks of cuprizone treatment. The astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the microglia/macrophage marker ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) was visualized by immunohistochemistry. (A, B) Representative images of the medial corpus callosum (coronal sections, -0.22 mm from bregma) of untreated control and cuprizone-treated wild-type (WT) and cuprizone-treated TRPA1 gene-deleted (KO) mice. Scale bars are 50 μ m. (C,D) Quantification of the mean density of equal areas in the medial corpus callosum of untreated control (CTRL) and cuprizone-treated (CPZ) WT and TRPA1 KO mice. Data are means \pm S.E.M. of 5–6 images. Asterisks denote statistically significant differences between respective CTRL and CPZ groups (***p < 0.001), while hash marks label statistically significant differences between respective WT and KO groups (^{###}p < 0.001) as analysed with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.



Fig. 6. Evaluation of myelin content by electron microscopy after 6 weeks of cuprizone treatment. (A) Representative electron micrographs showing axons in the corpus callosum in untreated control and cuprizone-treated wild-type (WT) or TRPA1 gene-deleted (KO) mice. A large number of myelinated axons (ax) as well as small diameter unmyelinated axons (asterisk) can be observed in both the WT and KO controls. In cuprizone-treated animals less myelinated axons (ax) and more unmyelinated axons (asterisk) were seen, however the decrease in percentage of axons with myelin sheath was stronger in the WT, and less dramatic in the KO animals. Scale bars in the electron micrographs are 1 μ m. (B) The percentage of myelinated axons quantified in untreated control (CTRL) and cuprizone-treated (CPZ) WT and TRPA1 KO animals. Data are means \pm S.E.M. of 10–10 images obtained from 3–3 animals. Asterisks denote statistically significant differences between respective WT and KO groups (***p < 0.01), while hash marks label statistically significant differences between respective WT and KO groups (***p < 0.01) as analysed with one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

cuprizone treatment (Xu et al., 2009). The possible imbalance between glutamate and GABA levels has also been raised (Praet et al., 2014). Intriguingly, the cuprizone model was also suggested to serve as a model of schizophrenia (Herring and Konradi, 2011; Xu and Li, 2011) supported by a more extensive behavioural assessment of cuprizonetreated mice and recent imaging data that white matter abnormalities exist in schizophrenic patients.

On the other hand, following the time course of morphological changes with the MRI proved to be a reliable and valuable method to assess the progression of cuprizone-induced damage in the corpus callosum. Myelin loss with the simultaneous water accumulation increases the signal intensity on T2-weighted MR images (Merkler et al., 2005). The intensity of T2-weighted images of ROIs corresponding to the medial corpus callosum could be reproducibly measured upon weekly repeated imaging in both untreated control groups. In both cuprizonetreated groups the signal intensity of T2-weighted images in the medial corpus callosum was significantly increased throughout the experiment. Remarkably, the method was sensitive enough to detect the attenuated severity of myelin loss in TRPA1 KO animals, as differences between the intensity percentages of cuprizone-treated WT and KO mice were significantly lower at all measurement points. The validity of the MRI analysis was also confirmed by the other morphological methods. Evaluation of myelination by LFB staining at week 3 or by electronmicroscopy at week 6 both demonstrated a strong correlation with the T2-weighted MR image intensity measurements. Percentage changes also appeared proportional to the extent of myelinated fiber loss and the semiquantitative scoring of LFB-stained slides.

Despite the increasing interest in the cuprizone model in the recent decade, the precise mechanism of cuprizone-induced oligodendrocyte loss remains to be elucidated. It has been suggested that the copperchelating nature of this compound interferes with several mitochondrial enzymes, resulting in the disruption of cellular respiration and oxidative stress (Gudi et al., 2014; Praet et al., 2014). However, investigation of the sequence of events during cuprizone administration suggested that after an initial loss of oligodendrocytes due to the direct toxicity of cuprizone, activation and proliferation of astrocytes and microglia also contributed to the progressive demyelination. The time course of astrocytosis and microgliosis closely follows the course of demyelination (Hiremath et al., 1998; Matsushima and Morell, 2001). We previously showed that both astrocyte and microglia/macrophage recruitment were significantly reduced in cuprizone-treated TRPA1 KO animals at week 6 of treatment (Sághy et al., 2016). The current results confirm the same difference for an earlier time point, occurring in parallel with the attenuated demyelination. On the other hand, it was also revealed that astrocytes and microglia were essential for the successful remyelination as well. Neuroinflammation promoted by pro-inflammatory cytokines/chemokines might initially aggravate oligodendrocyte loss but the inflammatory reaction together with other mediators such as certain growth factors (e.g. insulin-like growth factor 1 - IGF-1, fibroblast growth factor - FGF-2) and anti-inflammatory cytokines secreted by astrocytes or microglia are also necessary to initiate myelin repair by stimulating the proliferation and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. Since the precise interplay between these glial cells is still not fully deciphered, it is difficult to determine the exact role of TRPA1 receptors in this complex process. We have provided several lines of evidence that the absence of TRPA1 receptors prevents cuprizone-induced oligodendrocyte apoptosis and demyelination of the corpus callosum. Expression of TRPA1 on astrocytes has been independently reported by several groups, including ours (Lee et al., 2016, 2012; Sághy et al., 2016; Shigetomi et al., 2012, 2013). Another recent study investigating the role of Ca²⁺-permeable channels in demyelination detected TRPA1 expression on oligodendrocytes

employing in situ hybridization (Hamilton et al., 2016). In a mouse Alzheimer's disease model, TRPA1 receptors mediated the beta amyloid-induced cytokine release from astrocytes via NFkB activation (Lee et al., 2016). In the cuprizone model, inhibition of the NFKB pathway in astrocytes by laquinimod could prevent the toxicant-induced oligodendrocyte apoptosis and demyelination (Brück et al., 2012). On the other hand, ablation of proliferating astrocytes did not prevent oligodendrocyte loss, only diminished activation and recruitment of microglia resulting in delayed remyelination (Skripuletz et al., 2013). Based on the currently available data, it could be hypothesized that TRPA1 receptors localized on either oligodendrocytes or astrocytes were activated by reactive oxygen species generated in response to cuprizone challenge and the direct action of the cytosolic Ca^{2+} level rise in oligodendrocytes and the indirect effect of pro-inflammatory mediators released from astrocytes contributed to the progression of oligodendrocyte apoptosis.

In conclusion, it is evident that further investigation is needed to reveal the physiological and pathophysiological role of TRPA1 receptors on astrocytes and oligodendrocytes. One of the questions remaining is whether the lack of TRPA1 receptors impacts remyelination in vivo, since astrocytes are also involved in the recruitment of oligodendrocyte progenitor cells. Nevertheless, our current in vivo data provide evidence on the potential value of TRPA1 receptor as a future drug target in the pharmacotherapy of disorders involving demyelination.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.03.017.

Acknowledgements

The study was funded by Hungarian grant National Brain Research Program-A (KTIA_NAP_13-1-2013-0001). Erika Pintér was supported by National Excellence ProgramA2-SZJÖ-TOK-13-0149, Éva Sághy by New National Excellence Program of the Ministry of Human CapacitiesÚNKP-16-4-I. and Zoltan Berente by the grant GINOP-2.3.2-15-2016-00049. The authors express their gratitude to Prof. Dr. Pierangelo Geppetti (University of Florence, Italy) for gifting the TRPA1^{+/-} breeding pair.

References

- Ács, P., Kálmán, B., 2012. Pathogenesis of Multiple Sclerosis: What Can We Learn from the Cuprizone Model. In: Perl, A. (Ed.), Autoimmunity. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 403–431.
- Bosson, A., Paumier, A., Boisseau, S., Jacquier-Sarlin, M., Buisson, A., Albrieux, M., 2017. TRPA1 channels promote astrocytic Ca2+ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid-β peptide. Mol. Neurodegener. 12, 53. http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0194-8.
- Brück, W., Pförtner, R., Pham, T., Zhang, J., Hayardeny, L., Piryatinsky, V., Hanisch, U.-K., Regen, T., van Rossum, D., Brakelmann, L., Hagemeier, K., Kuhlmann, T., Stadelmann, C., John, G.R., Kramann, N., Wegner, C., 2012. Reduced astrocytic NFκB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. Acta Neuropathol. (Berl.) 124, 411–424. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-012-1009-1.
- Chen, J., Hackos, D.H., 2015. TRPA1 as a drug target—promise and challenges. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 388, 451–463. http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1088-3.
- Fernandes, E., Fernandes, M., Keeble, J., 2012. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. Br. J. Pharmacol. 166, 510–521. http://dx.doi. org/10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M.T., Vilella, E., 2007. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. Toxicol. Lett. 169, 205–213. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.01.010.
- Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C., Kipp, M., 2015. Anatomical distribution of Cuprizoneinduced lesions in C57BL6 mice. J. Mol. Neurosci. 57, 166–175. http://dx.doi.org/ 10.1007/s12031-015-0595-5.
- Gudi, V., Moharregh-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P.N., Kotsiari, A., Skuljec, J., Trebst, C., Stangel, M., 2009. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. Brain Res. 1283, 127–138. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.brainres.2009.06.005.
- Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T., Stangel, M., 2014. Glial response during cuprizoneinduced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. Front. Cell. Neurosci. 8, 73. http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00073.

Hamilton, N.B., Kolodziejczyk, K., Kougioumtzidou, E., Attwell, D., 2016. Proton-gated

Ca2+ – permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. Nature 529, 523–527. http://dx.doi.org/10.1038/nature16519.

- Herder, V., Hansmann, F., Stangel, M., Skripuletz, T., Baumgärtner, W., Beineke, A., 2011. Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 37, 676–684. http://dx.doi. org/10.1111/j.1365-2990.2011.01168.x.
- Herring, N.R., Konradi, C., 2011. Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia. Front. Biosci. Sch. Ed. 3, 23–40.
- Hibbits, N., Pannu, R., John Wu, T., Armstrong, R.C., 2009. Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. ASN NEURO 1. http://dx.doi.org/10.1042/ AN20090032.
- Hiremath, M.M., Saito, Y., Knapp, G.W., Ting, J.P.-Y., Suzuki, K., Matsushima, G.K., 1998. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. J. Neuroimmunol. 92, 38–49. http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00168-4.
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., Beyer, C., 2009. The cuprizone animal model: new insights into an old story. Acta Neuropathol. (Berl.) 118, 723–736. http://dx.doi. org/10.1007/s00401-009-0591-3.
- Kipp, M., Nyamoya, S., Hochstrasser, T., Amor, S., 2017. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. Brain Pathol. Zurich Switz. 27, 123–137. http://dx.doi.org/10.1111/bpa.12454.
- Koutsoudaki, P.N., Skripuletz, T., Gudi, V., Moharregh-Khiabani, D., Hildebrandt, H., Trebst, C., Stangel, M., 2009. Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. Neurosci. Lett. 451, 83–88. http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet. 2008.11.058.
- Lee, S.M., Cho, Y.S., Kim, T.H., Jin, M.U., Ahn, D.K., Noguchi, K., Bae, Y.C., 2012. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. J. Chem. Neuroanat. 45, 45–49. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.07.003.
- Lee, K.-I., Lee, H.-T., Lin, H.-C., Tsay, H.-J., Tsai, F.-C., Shyue, S.-K., Lee, T.-S., 2016. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. J. Neuroinflammation 13, 92. http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0557-z.
- Liebetanz, D., Merkler, D., 2006. Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. Exp. Neurol. 202, 217–224. http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.05.032.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann. Neurol. 47, 707–717.
- Makinodan, M., Yamauchi, T., Tatsumi, K., Okuda, H., Takeda, T., Kiuchi, K., Sadamatsu, M., Wanaka, A., Kishimoto, T., 2009. Demyelination in the juvenile period, but not in adulthood, leads to long-lasting cognitive impairment and deficient social interaction in mice. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 33, 978–985. http://dx.doi.org/10.1016/i.pnpbb.2009.05.006.
- Matsushima, G.K., Morell, P., 2001. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. Brain Pathol. Zurich Switz. 11, 107–116.
- Merkler, D., Boretius, S., Stadelmann, C., Ernsting, T., Michaelis, T., Frahm, J., Brück, W., 2005. Multicontrast MRI of remyelination in the central nervous system. NMR Biomed. 18, 395–403. http://dx.doi.org/10.1002/nbm.972.
- Nilius, B., Appendino, G., Owsianik, G., 2012. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. 464, 425–458. http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1158-z.
- Olechowski, C.J., Truong, J.J., Kerr, B.J., 2009. Neuropathic pain behaviours in a chronicrelapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Pain 141, 156–164. http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.11.002.
- Pachner, A.R., 2011. Experimental models of multiple sclerosis. Curr. Opin. Neurol. 24, 291–299. http://dx.doi.org/10.1097/WCO.0b013e328346c226.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A., Ponsaerts, P., 2014. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. Neurosci. Biobehav. Rev. 47, 485–505. http://dx.doi.org/10. 1016/j.neubiorev.2014.10.004.
- Sághy, É., Sipos, É., Ács, P., Bölcskei, K., Pohóczky, K., Kemény, Á., Sándor, Z., Szőke, É., Sétáló, G., Komoly, S., Pintér, E., 2016. TRPA1 deficiency is protective in cuprizoneinduced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. Glia 64, 2166–2180. http://dx.doi.org/10.1002/glia.23051.
- Schalomon, P.M., Wahlsten, D., 2002. Wheel running behavior is impaired by both surgical section and genetic absence of the mouse corpus callosum. Brain Res. Bull. 57, 27–33.
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., Khakh, B.S., 2012. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. Nat. Neurosci. 15, 70–80. http://dx.doi.org/10.1038/nn.3000.
- Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R.T., O'Dell, T.J., Khakh, B.S., 2013. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. J. Neurosci. 33, 10143–10153. http://dx. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5779-12.2013.
- Skripuletz, T., Lindner, M., Kotsiari, A., Garde, N., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C., Stangel, M., 2008. Cortical demyelination is prominent in the murine Cuprizone model and is strain-dependent. Am. J. Pathol. 172, 1053–1061. http://dx.doi.org/10. 2353/ajpath.2008.070850.
- Skripuletz, T., Bussmann, J.-H., Gudi, V., Koutsoudaki, P.N., Pul, R., Moharregh-Khiabani, D., Lindner, M., Stangel, M., 2010. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. Brain Pathol. Zurich Switz. 20, 301–312. http://dx.doi.org/10.

K. Bölcskei et al.

1111/j.1750-3639.2009.00271.x.

- Skripuletz, T., Hackstette, D., Bauer, K., Gudi, V., Pul, R., Voss, E., Berger, K., Kipp, M., Baumgärtner, W., Stangel, M., 2013. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. Brain 136, 147–167. http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws262.
- Xiao, L., Xu, H., Zhang, Y., Wei, Z., He, J., Jiang, W., Li, X., Dyck, L.E., Devon, R.M., Deng, Y., Li, X.M., 2007. Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes. Mol. Psychiatry 13, 697–708.

http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4002064.

- Xu, H., Li, X.-M., 2011. White matter abnormalities and animal models examining a putative role of altered white matter in schizophrenia. Schizophr. Res. Treat. 2011, 1–16. http://dx.doi.org/10.1155/2011/826976.
- Xu, H., Yang, H.-J., Zhang, Y., Clough, R., Browning, R., Li, X.-M., 2009. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. Behav. Neurosci. 123, 418–429. http://dx.doi.org/10.1037/a0014477.



Article

Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in mGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice

Gábor Kriszta ^{1,2,3}, Balázs Nemes ¹, Zoltán Sándor ¹, Péter Ács ⁴, Sámuel Komoly ⁴, Zoltán Berente ^{3,5}, Kata Bölcskei ^{1,2,†} and Erika Pintér ^{1,2,*,†}

- ¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary; gabor.kriszta@aok.pte.hu (G.K.); balazs.nemes@aok.pte.hu (B.N.); zoltan.sandor@aok.pte.hu (Z.S.); kata.bolcskei@aok.pte.hu (K.B.)
- ² Molecular Pharmacology Research Group and Center for Neuroscience, János Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary
- ³ Research Group for Experimental Diagnostic Imaging, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary; zoltan.berente@aok.pte.hu
- ⁴ Department of Neurology, University of Pécs Medical School, Pécs H-7623, Hungary; acs.peter@pte.hu (P.Á.); komoly.samuel@pte.hu (S.K.)
- ⁵ Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary
- * Correspondence: erika.pinter@aok.pte.hu
- + These authors contributed equally to this work.

Received: 7 November 2019; Accepted: 20 December 2019; Published: 28 December 2019



Abstract: Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors are non-selective cation channels responsive to a variety of exogenous irritants and endogenous stimuli including products of oxidative stress. It is mainly expressed by primary sensory neurons; however, expression of TRPA1 by astrocytes and oligodendrocytes has recently been detected in the mouse brain. Genetic deletion of TRPA1 was shown to attenuate cuprizone-induced oligodendrocyte apoptosis and myelin loss in mice. In the present study we aimed at investigating mGFAP-Cre conditional TRPA1 knockout mice in the cuprizone model. These animals were generated by crossbreeding GFAP-Cre^{+/-} and floxed TRPA1 (TRPA1^{Fl/Fl}) mice. Cuprizone was administered for 6 weeks and demyelination was followed by magnetic resonance imaging (MRI). At the end of the treatment, demyelination and glial activation was also investigated by histological methods. The results of the MRI showed that demyelination was milder at weeks 3 and 4 in both homozygous (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI}) and heterozygous (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-}) conditional knockout animals compared to Cre^{-/-} control mice. However, by week 6 of the treatment the difference was not detectable by either MRI or histological methods. In conclusion, TRPA1 receptors on astrocytes may transiently contribute to the demyelination induced by cuprizone, however, expression and function of TRPA1 receptors by other cells in the brain (oligodendrocytes, microglia, neurons) warrant further investigation.

Keywords: transient receptor potential ankyrin 1; cuprizone; demyelination; astrocyte; conditional knockout; magnetic resonance imaging

1. Introduction

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors are non-selective cation channels which are responsive to a variety of exogenous and endogenous stimuli including mustard oil, cinnamaldehyde, irritant chemicals such as formalin or acrolein, as well as reactive oxygen species



and oxidized lipid molecules [1–3]. Apart from being a nocisensor for exogenous irritant compounds, it has been suggested to work as a sensor for oxidative stress [4]. Originally described to be localized on a subgroup of nociceptive primary afferent neurons [5,6], it was later revealed that TRPA1 is also expressed at lower levels by various non-neuronal cells including keratinocytes, endothelial cells and cells of the gastrointestinal mucosa [1–3,7]. More importantly, several studies have supported the presence of TRPA1 receptors in the brain on astrocytes [8–10], as well as oligodendrocytes [11]. A recent cell-specific transcriptome analysis of the mouse cortex revealed low level expression of TRPA1 on neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia, as well [12].

In astrocytes, TRPA1 receptors were implicated in both physiological and pathophysiological processes. Astrocyte TRPA1 receptors were shown to regulate resting Ca²⁺ levels and modulate GABA-ergic inhibitory transmission by reducing GABA transport [8]. TRPA1 receptors on astrocytes were also suggested to play a role in long-term potentiation in the mouse hippocampus [9]. Since reactive astrocytes can contribute to the progression of neuroinflammation in neurodegenerative diseases [13,14], several workgroups, including ours, had started to investigate the role of TRPA1 in animal models of neurodegenerative diseases. Our previous study aimed at examining the role of TRPA1 in the cuprizone-induced demyelination model in mice. Cuprizone treatment constitutes an accepted non-immune animal model of multiple sclerosis [15,16] which produces lesions resembling type III lesions seen in patients [17]. Feeding mice with cuprizone leads to a well-reproducible demyelination of the corpus callosum as well as other subcortical and cortical brain areas by inducing oligodendrocyte apoptosis and a secondary activation of astrocytes and microglia [15,16,18–21]. We have revealed that demyelination of the corpus callosum was significantly reduced in TRPA1 receptor gene-deleted mice [22,23]. Based on our data we have assumed that TRPA1 receptors localized on astrocytes may influence the astrocyte-oligodendrocyte crosstalk. Activation of these receptors on the astrocytes increases the intracellular Ca²⁺ concentration and subsequent release of mediators. Astrocyte-derived signaling molecules may contribute to the apoptosis of oligodendrocytes by promoting the proapoptotic p38-MAPK pathway resulting in c-Jun activation [22]. We have also shown that TRPA1 deficiency did not affect the number of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) during cuprizone treatment. In TRPA1 KO mice, there was no increase or a less pronounced increase of growth factors promoting OPC proliferation (FGF-2, IGF-1). The level of Bak mRNA, a marker of apoptosis and levels of pro-apoptotic signalling proteins were significantly lower in cuprizone-treated TRPA1 KO animals. All these data suggest that TRPA1 deficiency did not affect oligodendrocyte development but reduced the apoptosis of mature oligodendrocytes [22]. In contrast with our theory, Hamilton and coworkers assumed a direct action of TRPA1 activation on myelination. They detected the functional expression of TRPA1 on oligodendrocytes and showed that ischemia-induced demyelination was diminished in the lack of TRPA1 receptors [11]. Likewise, another group showed that in TRPA1 receptor gene-deleted mice behavioral deficits and neuroinflammation were less severe in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [24]. The same group also later demonstrated that the loss of TRPA1 is associated with decreased anxiety-like behavior and improved performance in spatial memory and social discrimination tests [25].

Based on these prior data we focused on further elucidating the role of TRPA1 receptors in the cuprizone model. In the present study, the effects of cuprizone in the corpus callosum were studied in mGFAP-driven conditional TRPA1 knockout mice.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

The study was designed and conducted according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes. The project was approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County (license No. BA02/2000-82/2017).

2.2. Animals

Animals were bred in the Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy of the University of Pécs and kept in the Animal House of the Szentágothai Research Center during the experiments. Mice were housed in groups of 3–7 in standard polycarbonate cages on wood shavings bedding. Food and water were provided *ad libitum*. The temperature was maintained at 24 °C and the lighting was set to a 12 h light-dark cycle (lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m.).

The mGFAP-driven conditional TRPA1 receptor knockout mice were produced via crossbreeding floxed TRPA1 carrying mice (B6.129S-Trpa1tm2Kykw/J) by GFAP promoter directed Cre recombinase gene expressing mice (B6.Cg-Tg(Gfap-cre) 77.6Mvs/2J) both obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), stock numbers #008650 and #024098, respectively. Only female mice carrying the GFAP-Cre transgene were used to prevent non-specific Cre activation during spermatogenesis. The GFAP-Cre transgene was also maintained in heterozygote form, to minimize the chance of non-specific recombination. As the first step, GFAP-Cre heterozygote females were crossbred by floxed TRPA1 homozygote males. Next, female mice heterozygote for both genes were backcrossed by floxed TRPA1 homozygote males. The obtained male $Cre^{+/-}$ TRPA1^{FI/FI} mice were the main subjects of the experiments, whereas their male siblings ($Cre^{+/-}$ TRPA1^{FI/FI} mice were the main subjects of the tero controls and Cre negative controls, respectively. Animals showing a global KO genotype by tail analysis were excluded from the experiments (approximately 10% of all genotyped $Cre^{+/-}$ animals).

Genotyping of floxed TRPA1 was done according to the protocol suggested by the provider, using forward primer oIMR9168 (AGC AGG AGC AGA AGT ATG GAA) and reverse primer oIMR9169 (GAA GGC CAT GGC ATC TTA AC) producing 359 bp (floxed) and/or 472 bp (wild type) PCR products.

Genotyping of GFAP-Cre was done by forward primer 15831 (TCC ATA AAG GCC CTG ACA TC) and reverse primer 15832 (TGC GAA CCT CAT CAC TCG T) also using internal positive control forward primer oIMR8744 (CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG) and reverse primer oIMR8745 (GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT) which produced 200 bp (internal positive control) and ~400 bp (GFAP-Cre positive) PCR products. Genotyping of conditional TRPA1 receptor knockout was carried out by using forward primer exon 21 (TGT TCC TCA ACA TCC CAG CG), second forward primer oIMR9168 (AGC AGG AGC AGA AGT ATG GAA) and reverse primer oIMR9169 (GAA GGC CAT GGC ATC TTA AC) producing 609 bp (knockout), 359 bp (intact floxed) and/or 472 bp (intact wild type) PCR products, respectively. RT-PCR analysis of conditional TRPA1 receptor knockout messenger RNA was done by forward primer exon 21 (TGT TCC TCA ACA TCC CAG CG) and reverse primer exon 25 (CGT GCC TGG GTC TAT TTG GA) which produce 573 bp (intact) or 191 bp (knockout) RT-PCR products.

2.3. Mouse TRPA1 Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from homogenized brain samples by using TRI Reagent (Molecular Research Centre Inc., Cincinnati, OH, USA) and Direct-Zol RNA isolation kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was quantified by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and 1 µg total RNA was treated with DNAse I (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) to remove genomic DNA contamination from the samples. First strand cDNA synthesis was carried out with 0.5 µg of total RNA/sample using Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). In the PCR reaction we used SensiFast Probe Lo-ROX Kit (Bioline Inc., London, UK) and forward primer 5' atgccttcagcaccccattg (binding site in exon 23), reverse primer 5' gacctcagcaatgtccccaa (binding site in exon 24) and labeled probe 56FAM/tgggcagct/ZEN/tattgccttcacaat/3IABkFQ (binding site in exon 23), 1 µM each, all obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). The following PCR protocol was used on an Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Quantstudio5 quantitative PCR machine: 3 min 95 °C original denaturation, followed by 40 cycles of 30 s 95 °C denaturation, 30 s 62 °C annealing, 1 min 72 °C extension. The sites of the primers and probe are missing from the Cre-Lox recombined mRNA therefore this assay measures only the amount of intact TRPA1 mRNA. Mouse beta-actin mRNA was used as reference and the expression was determined by using Prime Time Std qPCR Assay

Mm.PT.58.33540333 obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) under the same PCR conditions. All qRT-PCR assays were done in duplicates in each sample and Ct values were determined. dCt values were obtained by subtracting the corresponding beta-actin Ct values from the TRPA1 Ct values. ddCt values were calculated for each sample by subtracting the average dCt value of the $Cre^{-/-}$ group (representing the 100% expression level) from each dCt value. Finally, for each sample the obtained ddCt were converted to relative expression level by the 100/(2^{ddCt}) formula.

2.4. Cuprizone Treatment

Cuprizone was administered orally for 6 weeks as previously described [22,23]. Briefly, standard rodent chow was ground and 0.2% cuprizone was thoroughly mixed into ground chow which was placed into the cages in small ceramic bowls. Control mice were fed the milled chow without the addition of cuprizone. The chow was provided *ad libitum* to all groups and it was changed to a fresh batch each day. The general health status of animals was also monitored daily and body weights were measured every 2 days.

2.5. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The timeline of demyelination was monitored by T2-weighted MRI measurements on 4 mice from each group. Animals were scanned once before cuprizone administration and later once per week starting from week 2 of the treatment. The measurements were performed using a Bruker[®] PharmaScan[®] (4.7 T) small animal MRI instrument (Bruker, Billerica, MA, USA).

Anesthesia was induced by 3.5% v/v of isoflurane in a gas mixture of $33\% O_2$ and $66\% N_2O$ via induction chamber and maintained with 1–2% isoflurane in a rodent face mask controlled by respiratory monitoring and gating system.

The imaging protocol was performed on the same day and same time each week. After B_0 mapping a multislice T2 Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) experiment was performed (TR/TE: 3000/50 ms, FOV: 16 × 16 mm, Thk: 0.8 mm, Gap: 0.2 mm, matrix: 160 × 160, 4 averages, RARE factor: 4) on seven coronal slices positioned to cover the whole corpus callosum. The total imaging time was roughly 12 min per animal.

Before the analysis, all imaging data were converted first into a Digital Imaging Communications in Medicines (DICOM) format and stored in an isolated hardware in a local system. Any further processing was performed via DICOM-handling software packages. (3D-Slicer v4.6 NA-MIC and Onis v2.5, Digitalcore, Tokyo, Japan) [26]. For the quantification of the damage, regions of interests (ROI) were manually circumscribed, fitted by anatomical structures in the medial corpus callosum and the signal intensities (as mean \pm SEM) of ROIs have been recorded. Results were expressed in percentage of intensity ratio, compared to the pre-treatment intensity (considered as 100%) measured in the identical brain area of the same individual animal. The evaluation was performed in a blinded manner.

2.6. Histological Assessment of Cuprizone-Induced Changes in the Corpus Callosum

Animals were anesthetized with pentobarbital (70 mg/kg i.p.) at the end of the cuprizone treatment (week 6) and perfused transcardially in two steps, first with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and then with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. Brains were postfixed over one night in the same fixative. 5 μ m thin coronal sections from paraffin embedded brains were made and mounted onto a silane-coated slides.

2.6.1. Luxol Fast Blue-cresyl Violet (LFB/CV) Staining

LFB/CV staining was used to evaluate the severity of demyelination as described previously [20,22] on coronal sections obtained from different regions (0.14, -0.22, -1.06, and -1.94 mm) according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin [27]. Brain sections on silane-coated slides were rehydrated in graded series of alcohol and incubated at 60 °C in LFB solution (0.01%), overnight. Thereafter, sections were differentiated in a solution of Li₂CO₃ (0.05%) and counterstained with CV. Four sections

of each animal were scored by a semiquantitative four-tiered scoring system (0–3) in a blinded manner. Intact myelin was scored with 0 and the totally damaged myelin was labeled with score 3.

2.6.2. Immunohistochemical Detection of Myelin Basic Protein (MBP) and Astrocyte and Microglia Markers

In addition to the LFB/CV staining, immunohistochemical detection of myelin basic protein (MBP) was also performed to evaluate demyelination. Furthermore, astrocyte and microglia activation in the corpus callosum was detected with immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), respectively. Briefly, 8 µm-thick paraffin sections were deparaffinized and heat-unmasked in citrate buffer. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity, treated with BSA and incubated for 1 h with the following primary antibodies: anti-MBP (1:100, mouse monoclonal antibody from Novocastra/Leica Biosystems (Nussloch, Germany, catalogue No. NCL-MBP; Antibody Registry No AB_563893), anti-GFAP (1:1000, rabbit polyclonal antibody from Dako, Glostrup, Denmark; catalogue No. Z0334; Antibody Registry No AB_10013382) to visualize astrocytes, anti-Iba1, (1:500, rabbit polyclonal antibody from Wako Chemicals, Neuss, Germany; catalogue No. 019-19741; Antibody Registry No AB_839504) as a marker for microglia/macrophages. Incubation was performed with the HISTO-Labeling System, the reaction was visualized using 3,3'-diaminobenzidine reaction. Sections were photographed with an Olympus DP50 camera attached to an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) under 200x magnification. Quantification was performed by determining the mean density of equal-sized regions of interest of the medial corpus callosum with the Image-ProPlus software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). The experimenter evaluating the slides was blinded to the group allocation.

2.7. Materials

Cuprizone and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise previously indicated. Pentobarbital (Euthanimal 20% injection ad us. vet.) was obtained from Alfasan Nederland B.V. (Woerden, The Netherlands) while isoflurane was purchased from Medicus Partner Ltd. (Biatorbágy, Hungary).

2.8. Statistics

In each group, means \pm S.E.M. of parameters were calculated. Statistical analysis was carried out with the GraphPad Prism 8.0.1 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For comparison of qPCR relative expression values and MRI relative intensity values, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used. Paired t-test was used to compare density values of LFB/CV and immunohistological staining, *p < 0.05 or **p < 0.01 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Determination of TRPA1 mRNA Levels in the Mouse Brain

Intact TRPA1 mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR in brain samples of GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI} compared to GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice. The obtained relative expression levels, means and standard deviations are presented in Figure 1 for each group. Compared to GFAP-Cre^{-/-} control mice where TRPA1 expression level was $102 \pm 22\%$, both the GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mouse groups had lower expression levels, $68 \pm 28\%$ and $77 \pm 23\%$, respectively. These results indicate that some of the TRPA1 mRNA was lost due to Cre-LoxP recombination in both GFAP-Cre^{+/-} groups. ANOVA statistical analysis showed that there was a significant difference between the groups (p=0.0017). The post hoc test demonstrated that the differences were significant when both the GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} group were compared to the GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI} control group (p < 0.01 and p < 0.05 respectively),

but there was no significant difference in TRPA1 mRNA expression between the GFAP-Cre^{+/-} groups (Figure 1).



TRPA1 expression in mouse brain

Figure 1. Relative expression levels of TRPA1 mRNA in the brain in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI} (n = 7), GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} (n = 5) and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice (n = 9). Asterisks show statistically significant differences between the indicated groups (*p < 0.05, **p < 0.01).

3.2. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The timeline of damage was followed by the evaluation of signal intensity changes of T2 weighted MRI (Figure 2) in the medial part of the corpus callosum between week 2 and 6.



Figure 2. Representative MR images, constructed on fourth week. The medial corpus callosum is highlighted by a white ellipse.

The intensities in the untreated control groups were not significantly different and no changes were detected in any of the control animals throughout the whole experiment. (Figure 3a). In contrast, the signal intensity was significantly increased in cuprizone-treated GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice compared to GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} animals on week 3 and week 4 (*p <

0.05, **p < 0.01; Figure 3b). The most pronounced increase was detected on the fourth week, 179.75% in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI} group versus 134.25% (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-}) and 134.75% (GFAP Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI}). These results indicate that the myelin damage was less severe in the corpus callosum of both heterozygous and homozygous mGFAP-Cre conditional TRPA1 knockout mice on weeks 3 and 4. The difference between genotypes decreased at later time points. At the end of the treatment we did not detect significant differences between the cuprizone-treated GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} animals. Each cuprizone-treated group showed a significantly elevated intensity from the third to sixth weeks compared to their respective control groups (Figure 3a,b; significance not shown).



Figure 3. Changes of signal intensity in the medial corpus callosum measured by magnetic resonance imaging between week 2 and 6 of cuprizone treatment in **(a)** control (CTRL) and **(b)** cuprizone-treated (CU) groups of GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice. Data are means \pm S.E.M. of images obtained from animals (n = 4/group). The signal intensities were normalized to the baseline values (100%) for each animal and indicated by percentages of relative intensity. Asterisks show statistically significant differences between respective CU and CTRL groups (* p < 0.05, ** p < 0.01).

3.3. Cuprizone-Induced Demyelination Determined by LFB/CV Staining and MBP Immunohistochemistry

After the six weeks of the treatment, significant demyelination was detected in all three cuprizone-treated groups with the LFB/CV staining, compared to their respective control groups (Figure 4a,b). No statistically significant differences were found between the demyelination scores of the three genotypes. Likewise, immunohistochemical staining of MBP revealed a significant reduction in all cuprizone-fed animals compared to controls, but no difference was detected between the MBP content of GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice (Figure 5a,b). The results show that the attenuating effect of mGFAP-driven conditional deletion of the TRPA1 receptor on the severity of cuprizone-induced demyelination was diminished by week 6 of treatment.



Figure 4. Evaluation of myelin content with Luxol Fast Blue/cresyl violet (LFB/CV) staining after 6 weeks of cuprizone treatment (a). Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice.; (b) Semiquantitative demyelination scores of LFB/CV staining, *p < 0.05, n = 3–5/group, Scale bar = 100 µm.



Figure 5. Evaluation of myelin content with myelin basic protein (MBP) immunohistochemistry after 6 weeks of cuprizone treatment **(a).** Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice.; **(b)** Pixel intensities of diaminobenzidine staining in the middle part of the corpus callosum in each group, *p < 0.05, n = 3–5/group, Scale bar = 100 µm.

3.4. Cuprizone-Induced Astrocyte and Microglia Activation

At the end of the 6-week treatment, a significant increase of GFAP and Iba1 immunostaining was detected in all three cuprizone-treated groups, compared to their respective control groups (Figures 6a and 7a). Quantifying the intensity of the staining, no statistically significant differences were found in the DAB staining intensities between the three genotypes (Figures 6b and 7b). Therefore, by the end of the 6-week treatment the mGFAP-driven conditional deletion of the TRPA1 receptor had no effect on the astrocyte and microglia accumulation induced by cuprizone.



Figure 6. Evaluation of astrocyte activation by GFAP immunohistochemistry after 6 weeks of cuprizone treatment **(a)** Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice.; **(b)** Pixel intensities of diaminobenzidine staining in the middle part of the corpus callosum in each group; **p* < 0.05, n = 3–5/group, Scale bar = 100 μ m.



Figure 7. Evaluation of microglia activation by Iba1 immunohistochemistry after 6 weeks of cuprizone treatment (a) Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{FI/FI} mice.; (b) Pixel intensities of diaminobenzidine staining in the middle part of the corpus callosum in each group **p* < 0.05, *n* = 3–5/group, Scale bar = 100 μ m.

4. Discussion

In the present study we have investigated the modulatory role of TRPA1 receptors expressed by GFAP positive cells in the cuprizone-induced demyelination model using mGFAP-driven conditional TRPA1 receptor knockout mice. The glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a generally accepted marker of astrocytes. Brain diseases are characterized by the active inflammatory state of astrocytes, which is usually manifested as up-regulation of GFAP [28].

Our results show that the genetic lack of TRPA1 receptors in GFAP positive cells influences the demyelination process induced by cuprizone feeding in mice. Reduced pathological changes were detected in the corpus callosum by MRI between the 3rd and 5th weeks of the treatment. In contrast, at the end of week 6, no significant differences were found in the demyelination evaluated either by MRI or histology.

In a previous study using embryonic global TRPA1 KO animals we demonstrated that TRPA1 receptor deficiency attenuated the cuprizone-induced demyelination by reduction of apoptosis of mature oligodendrocytes [22]. Additionally, it was recently published that oligodendrocytes express TRPA1 receptors [11]. Therefore, a direct effect of TRPA1 activation on oligodendrocyte apoptosis in the cuprizone model could be hypothesized. Since our investigations have not provided sufficient evidence for TRPA1 expression in oligodendrocytes, it was presumed that TRPA1 receptor deficiency might alleviate the cuprizone-induced loss of mature oligodendrocytes by altering the release of mediators by astrocytes. TRPA1 receptors localized on astrocytes may participate in the astrocyte-oligodendrocyte crosstalk. Since TRPA1 can be triggered by several noxious stimuli, including inflammation, tissue damage or oxidative stress on one hand, and astrocytes influence the extent of this toxin-induced demyelination on the other [29], we assumed that this receptor might modulate the demyelination process. Numerous earlier studies have provided substantial morphological and functional evidence that astrocytes express the TRPA1 receptor, functioning as a regulator of resting Ca²⁺ levels [8,9,24,30,31]. In a very recent study, Oh et al., using the cell-type-specific gene-silencing and ultrasensitive sniffer-patch techniques, identified astrocytes as the cellular target and TRPA1 as the molecular sensor for the low intensity, low frequency ultrasound (LILFU). They demonstrated that LILFU-induced neuromodulation was initiated by opening of TRPA1 channels in astrocytes. The Ca²⁺ entry through TRPA1 caused a release of gliotransmitters including glutamate from the astrocytes activating NMDA receptors in neighboring neurons [32]. In another newly-published paper, Xia et al. raised the involvement of TRPA1 in myelin damage and oxidative stress injury in a mouse intracerebral hemorrhage (ICH) model. They showed that TRPA1 was activated by the increased reactive oxygen species (ROS) after ICH, leading to an increase of Ca^{2+} influx. The increased Ca^{2+} further contributed to the rise in NOX1 and Calpain1, causing oxidative stress damage and myelin degradation. [33].

Since our previous data also supported the TRPA1 immunopositivity of astrocytes in the corpus callosum and astrocytic reactions were less prominent in cuprizone-treated TRPA1 receptor deficient mice compared to wild-type counterparts, we have supposed a pivotal role of TRPA1 receptors expressed by astrocytes [22]. For our further investigations, mGFAP-driven conditional TRPA1 knockout mice were bred by our laboratory in order to reveal the precise role of astrocytic TRPA1 receptors. These mice were created via crossbreeding floxed TRPA1 carrying mice (B6.129S-Trpa1tm2Kykw/J) by GFAP promoter-directed Cre recombinase gene expressing mice (B6.Cg-Tg(Gfap-cre) 77.6Mvs/2J. This technique allows the selective cutout of the Trpa1 gene only from the GFAP-positive cells and the examination of cuprizone-induced demyelination in the lack of astrocyte-specific TRPA1 receptors.

Cuprizone-treatment significantly increased T2-weighted MRI signal intensities measured on the 3rd and 4th weeks in all three animal groups compared to the baseline, proving the reliability of the model. Myelin loss with the concomitant water accumulation enhances the signal intensity on T2-weighted MR images [34]. The intensity of T2-weighted images of ROIs corresponding to the medial corpus callosum was reproducible. Remarkably, the MRI was sensitive enough to notice the milder severity of myelin loss in GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} animals compared to the GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{FI/FI} group. The most pronounced difference was detected on the 4th week, but the disparity decreased at later time points. In our previous study in the cuprizone model with embryonic global TRPA1 KO mice, we provided MRI-based evidence that the severity of myelin loss in the gene-deleted animals was significantly lower at all measurement points during the six-week experiment compared to the wild-type controls [23]. In accordance with the present results, the largest differences in signal intensities were detected on the 3rd and 4th weeks. Considering the data of the follow-up in vivo imaging, we conclude that genetic loss of the astrocyte-specific TRPA1 receptors attenuates the progress of demyelination in the corpus callosum, but these effects can be noticed only at the time of the most intensive pathological changes. The homozygote (Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl}) and heterozygote (Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-}) mice showed similar alterations which is explained by a similar reduction of mRNA levels in both genotypes. However, by the 6th week these disparities had disappeared, as we could not detect any differences with histological examinations at the end of the study. Neither the semiquantitative scoring of demyelination, based on Luxol fast blue staining technique, nor the MBP immunohistochemistry showed significant differences in the mGFAP-driven conditional TRPA1 knockout mice compared to the Cre^{-/-} controls. Similarly to the demyelination, the cuprizone-induced accumulation of the astrocytes and microglial cells in the corpus callosum was not influenced by the genetic loss of TRPA1 in the GFAP positive cells. In contrast to the results obtained with embryonic global TRPA1 KO mice, these results suggest that deletion of the receptor in the astrocytes does not exert substantial inhibitory effect eventually on the six-week cuprizone treatment-induced demyelination of the corpus callosum.

5. Conclusions

According to the currently available data, we presume that TRPA1 receptors localized on astrocytes can be activated by electrophilic ligands, reactive oxygen species in response to cuprizone challenge and the consequent release of pro-inflammatory mediators contributes to the progression of oligodendrocyte apoptosis. However, since the global TRPA1 KO mice presented a more attenuated demyelination compared to the conditional KO mice, it can be concluded that TRPA1 receptors on astrocytes contribute to the demyelination induced by cuprizone only transiently and TRPA1 receptors expressed by other cell types in the brain (e. g. oligodendrocytes, microglia, neurons) may participate in the demyelination process [11,33]. The expression and function of TRPA1 receptors by other cells in the brain warrant further investigation.

Author Contributions: Conceptualization, E.P., Z.S., K.B., P.Á. S.K.; methodology, G.K., K.B., P.Á., Z.S., Z.B., E.P.; formal analysis, G.K., K.B., B.N., Z.S., P.Á., Z.B.; investigation, G.K., K.B., B.N., Z.S., P.Á.; writing—original draft preparation, G.K., K.B., B.N., Z.S., E.P.; writing—review and editing, G.K., K.B., B.N., Z.S., P.Á., S.K., Z.B., E.P.; supervision, E.P., Z.S., K.B., P.Á., Z.B.; funding acquisition, E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants "The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics" (EFOP-3.6.2-16-2017-00008); EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009; Hungarian Brain Research Program 2. 2017-1.2.1-NKP-2017-00002. and the University of Pécs is acknowledged for a support by the 17886-4/23018/FEKUTSTRAT excellence grant. G.K. was supported by Richter Gedeon Centenárium Foundation.

Acknowledgments: The authors wish to thank Krisztina Fülöp and Anikó Perkecz for expert technical assistance in the histological techniques. The authors also acknowledge Anett Vranesics for contributing to the development of the MRI protocol.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- 1. Nilius, B.; Appendino, G.; Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: From gene to pathophysiology. *Pflug. Arch.* **2012**, *464*, 425–458. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Chen, J.; Hackos, D.H. TRPA1 as a drug target—promise and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2015**, *388*, 451–463. [CrossRef] [PubMed]
- Talavera, K.; Startek, J.B.; Alvarez-Collazo, J.; Boonen, B.; Alpizar, Y.A.; Sanchez, A.; Naert, R.; Nilius, B. Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: From structure to disease. *Physiol. Rev.* 2019. [CrossRef] [PubMed]
- 4. Andersson, D.A.; Gentry, C.; Moss, S.; Bevan, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* 2008, *28*, 2485–2494. [CrossRef]
- 5. Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819–829. [CrossRef]
- Kobayashi, K.; Fukuoka, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Dai, Y.; Tokunaga, A.; Noguchi, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with aδ/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* 2005, 493, 596–606. [CrossRef]

- Fernandes, E.; Fernandes, M.; Keeble, J. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br. J. Pharm.* 2012, 166, 510–521. [CrossRef]
- 8. Shigetomi, E.; Tong, X.; Kwan, K.Y.; Corey, D.P.; Khakh, B.S. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 70–80. [CrossRef]
- Shigetomi, E.; Jackson-Weaver, O.; Huckstepp, R.T.; O'Dell, T.J.; Khakh, B.S. TRPA1 Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive D-Serine Release. *J. Neurosci.* 2013, 33, 10143–10153. [CrossRef]
- Verkhratsky, A.; Reyes, R.C.; Parpura, V. TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia. *Rev. Physiol Biochem Pharm.* 2014, 166, 1–22. [CrossRef]
- 11. Hamilton, N.B.; Kolodziejczyk, K.; Kougioumtzidou, E.; Attwell, D. Proton-gated Ca2+-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature* **2016**, *529*, *523*–*527*. [CrossRef]
- 12. Zhang, Y.; Chen, K.; Sloan, S.A.; Bennett, M.L.; Scholze, A.R.; O'Keeffe, S.; Phatnani, H.P.; Guarnieri, P.; Caneda, C.; Ruderisch, N.; et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 11929–11947. [CrossRef]
- 13. Ben Haim, L.; Carrillo-de Sauvage, M.-A.; Ceyzériat, K.; Escartin, C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*. [CrossRef]
- 14. Li, K.; Li, J.; Zheng, J.; Qin, S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis* **2019**, *10*, 664–675. [CrossRef]
- 15. Kipp, M.; Clarner, T.; Dang, J.; Copray, S.; Beyer, C. The cuprizone animal model: New insights into an old story. *Acta Neuropathol.* **2009**, *118*, 723–736. [CrossRef]
- 16. Kipp, M.; Nyamoya, S.; Hochstrasser, T.; Amor, S. Multiple sclerosis animal models: A clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* **2017**, *27*, 123–137. [CrossRef]
- Lucchinetti, C.; Brück, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M.; Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 2000, 47, 707–717. [CrossRef]
- 18. Matsushima, G.K.; Morell, P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* **2001**, *11*, 107–116. [CrossRef]
- Praet, J.; Guglielmetti, C.; Berneman, Z.; Van der Linden, A.; Ponsaerts, P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014, 47, 485–505. [CrossRef]
- Ács, P.; Kálmán, B. Pathogenesis of Multiple Sclerosis: What Can We Learn from the Cuprizone Model. In *Autoimmunity*; Perl, A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; Volume 900, pp. 403–431. ISBN 978-1-60761-719-8.
- 21. Gudi, V.; Gingele, S.; Skripuletz, T.; Stangel, M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Front. Cell Neurosci* **2014**, *8*, 73. [CrossRef]
- Sághy, É.; Sipos, É.; Ács, P.; Bölcskei, K.; Pohóczky, K.; Kemény, Á.; Sándor, Z.; Szőke, É.; Sétáló, G.; Komoly, S.; et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia* 2016, 64, 2166–2180. [CrossRef]
- Bölcskei, K.; Kriszta, G.; Sághy, É.; Payrits, M.; Sipos, É.; Vranesics, A.; Berente, Z.; Ábrahám, H.; Ács, P.; Komoly, S.; et al. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *J. Neuroimmunol.* 2018, 320, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Lee, K.-I.; Lee, H.-T.; Lin, H.-C.; Tsay, H.-J.; Tsai, F.-C.; Shyue, S.-K.; Lee, T.-S. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, 92. [CrossRef] [PubMed]
- Lee, K.-I.; Lin, H.-C.; Lee, H.-T.; Tsai, F.-C.; Lee, T.-S. Loss of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Deregulates Emotion, Learning and Memory, Cognition, and Social Behavior in Mice. *Mol Neurobiol* 2017, 54, 3606–3617. [CrossRef] [PubMed]
- 26. Fedorov, A.; Beichel, R.; Kalpathy-Cramer, J.; Finet, J.; Fillion-Robin, J.-C.; Pujol, S.; Bauer, C.; Jennings, D.; Fennessy, F.; Sonka, M.; et al. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging* **2012**, *30*, 1323–1341. [CrossRef] [PubMed]
- 27. Paxinos, G.; Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001; ISBN 978-0-12-547636-2.

- Siracusa, R.; Fusco, R.; Cuzzocrea, S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front. Pharmacol.* 2019, 10. [CrossRef]
- Skripuletz, T.; Hackstette, D.; Bauer, K.; Gudi, V.; Pul, R.; Voss, E.; Berger, K.; Kipp, M.; Baumgärtner, W.; Stangel, M. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain* 2013, 136, 147–167. [CrossRef]
- Lee, S.M.; Cho, Y.S.; Kim, T.H.; Jin, M.U.; Ahn, D.K.; Noguchi, K.; Bae, Y.C. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* 2012, 45, 45–49. [CrossRef]
- Bosson, A.; Paumier, A.; Boisseau, S.; Jacquier-Sarlin, M.; Buisson, A.; Albrieux, M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca2+ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid-β peptide. *Mol. Neurodegener.* 2017, *12*, 53. [CrossRef]
- 32. Oh, S.-J.; Lee, J.M.; Kim, H.-B.; Lee, J.; Han, S.; Bae, J.Y.; Hong, G.-S.; Koh, W.; Kwon, J.; Hwang, E.-S.; et al. Ultrasonic Neuromodulation via Astrocytic TRPA1. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, 3386–3401.e8. [CrossRef]
- 33. Xia, M.; Chen, W.; Wang, J.; Yin, Y.; Guo, C.; Li, C.; Li, M.; Tang, X.; Jia, Z.; Hu, R.; et al. TRPA1 Activation-Induced Myelin Degradation Plays a Key Role in Motor Dysfunction After Intracerebral Hemorrhage. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*. [CrossRef]
- 34. Merkler, D.; Boretius, S.; Stadelmann, C.; Ernsting, T.; Michaelis, T.; Frahm, J.; Brück, W. Multicontrast MRI of remyelination in the central nervous system. *Nmr Biomed.* **2005**, *18*, 395–403. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

2022. 02. 13. 21:40

Dr. Kriszta Gábor - Google Tudós

	Dr. Kriszta Gábor		Összes 2017 óta	
	University of PEcs	Hivatkozások h-index i10-index	49 3 1	49 3 1
		0 cikk		2 cikk
		nem érhető	ó el	elérhető
		Finanszíro: alapján	Finanszírozási megbízások alapján	
CÍM		HIVATK	OZOTT RÁ	ÉV
Behavioural alt by the lack of demyelination K Bölcskei, G Kris Journal of neuroir	terations and morphological changes are TRPA1 receptors in the cuprizone-induce model in mice szta, É Sághy, M Payrits, É Sipos, A Vranesics, 2 nmunology 320, 1-10	e attenuated ed Z Berente,	31	2018
Investigation o conditional tran knockout mice G Kriszta, B Nem Cells 9 (1), 81	f cuprizone-induced demyelination in mC nsient receptor potential ankyrin 1 (TRPA es, Z Sándor, P Ács, S Komoly, Z Berente, K Bö	GFAP-driven A1) receptor Icskei,	9	2020
Effects of Angi Angiotensin Re 2 Levels: A Co G Kriszta, Z Krisz Frontiers in pharm	otensin-Converting Enzyme Inhibitors ar eceptor Blockers on Angiotensin-Conver mprehensive Analysis Based on Animal ta, S Váncsa, PJ Hegyi, L Frim, B Erőss, P Hegy nacology 12, 254	nd ting Enzyme Studies _{yi,}	7	2021
Desensitization Tumor Growth of Triple Negat N Bencze, C Schy Frontiers in Oncol	n of Capsaicin-Sensitive Afferents Accele via Increased Vascular Leakage in a Mu ive Breast Cancer varcz, G Kriszta, L Danics, É Szőke, P Balogh, Á logy, 2597	erates Early Irine Model A Szállási,	1	2021
Capsaicin-Sen Inflammatory C Rheumatoid A B Botz, G Kriszta, International Jour	sitive Peptidergic Sensory Nerves Are A Satekeepers in the Hyperacute Phase of thritis Model K Bölcskei, Ál Horváth, A Mócsai, Z Helyes nal of Molecular Sciences 22 (4), 1682	nti- a Mouse	1	2021
Examination of conditional trar knockout mice E Pinter, K Böcsk The FASEB Jourr	f the demyelination process in mGFAP-d nsient receptor potential ankyrin 1 (TRPA ei, G Kriszta, Z Sandor, B Nemes, P Acs, S Kom nal 34 (S1), 1-1	lriven \1) receptor noly,		2020

Kriszta Gábor (Gyógyszerészet)

1.

Bencze, Noémi ; Schvarcz, Csaba^{*} ; Kriszta, Gábor ; Danics, Lea ; Szőke, Éva ; Balogh, Péter ; Szállási, Árpád ; Hamar, Péter ; Helyes, Zsuzsanna ; Botz, Bálint 🖾 Desensitization of Capsaicin-Sensitive Afferents Accelerates Early Tumor Growth via Increased Vascular Leakage in a Murine Model of Triple Negative Breast Cancer FRONTIERS IN ONCOLOGY 11 Paper: 685297, 13 p. (2021) DOI WoS Scopus PubMed Zárolt Közlemény: 32107001 Egyeztetett Forrás Idéző Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos 2. Botz, Bálint 🖾 ; Kriszta, Gábor ; Bölcskei, Kata ; Horváth, Ádám István ; Mócsai, Attila ; Helyes, Zsuzsanna 🖾 Capsaicin-Sensitive Peptidergic Sensory Nerves Are Anti-Inflammatory Gatekeepers in the Hyperacute Phase of a Mouse Rheumatoid Arthritis Model INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22: 4 Paper: 1682, 13 p. (2021) DOI WoS Scopus PubMed Zárolt Közlemény: 31868424 Nyilvános Forrás Idéző Duplum Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos Nyilvános idéző összesen: 1 | Független: 1 | Függő: 0 | Nem jelölt: 0 | WoS jelölt: 1 | Scopus jelölt: 1 | WoS/Scopus jelölt: 1 | DOI jelölt: 1

3.

Kriszta, G ; Kriszta, Z ; Váncsa, Sz ; Hegyi, PJ ; Frim, L ; Erőss, B ; Hegyi, P ; Pethő, G^{**} ; Pinter, E ⊠ Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on angiotensin-converting enzyme 2 levels: a comprehensive analysis based on animal studies FRONTIERS IN PHARMACOLOGY 12 Paper: 619524 , 11 p. (2021)

DOI WoS Scopus PubMed

Közlemény:31884564 Egyeztetett Forrás Duplum Folyóiratcikk (Összefoglaló cikk) Tudományos Nyilvános idéző összesen: 6 | Független: 6 | Függő: 0 | Nem jelölt: 0 | WoS jelölt: 6 | Scopus jelölt: 6 | WoS/Scopus jelölt: 6 | DOI jelölt: 6

4.

Kriszta, Gábor ; Nemes, Balázs ; Sándor, Zoltán ; Ács, Péter ; Komoly, Sámuel ; Berente, Zoltán ; Bölcskei, Kata^{**} ; Pintér, Erika ⊠

Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in mGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice

CELLS 9 : 1 Paper: 81 , 13 p. (2020)

DOI WoS Scopus PubMed

Közlemény:31044103 Egyeztetett Forrás Idéző Duplum Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos Nyilvános idéző összesen: 5 | Független: 5 | Függő: 0 | Nem jelölt: 0 | WoS jelölt: 4 | Scopus jelölt: 5 | WoS/Scopus jelölt: 5 | DOI jelölt: 5 2022. 02. 13. 21:39

5.

Kriszta, Gábor ; Berente, Zoltan ; Pinter, Erika ; Galosi, Rita Complex observation of neurodegenerative models in mice, via nuclear magnetic resonance methods at 4,7 Tesla (2019) Közlemény:30843753 Nyilvános Forrás Egyéb (Nem besorolt)

6.

Bölcskei, K ; Kriszta, G ; Sághy, É ; Payrits, M ; Sipos, É ; Vranesics, A ; Berente, Z ; Ábrahám, H ; Ács, P ; Komoly, S et al.

Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice

JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY 320 pp. 1-10., 10 p. (2018)

DOI WoS SE Repozitórium Scopus PubMed

Közlemény:3365554 Egyeztetett Forrás Idéző Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos Nyilvános idéző összesen: 25 | Független: 22 | Függő: 3 | Nem jelölt: 0 | WoS jelölt: 23 | Scopus jelölt: 25 | WoS/Scopus jelölt: 25 | DOI jelölt: 25

7.

Kriszta, Gábor ; Berente, Zoltán

Szöveti elváltozások vizsgálata MR-képalkotó eljárásokkal, betegségek állatmodelljeiben (2018) Közlemény:30843761 Nyilvános Forrás Egyéb (Nem besorolt)