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

PhD-értekezés tézis

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

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke ... 4

2. Bevezetés ... 6

2.1. Sclerosis Multiplex ... 6

2.1.1. Klinikailag izolált szindróma (CIS) ... 7

2.1.2. Relapszáló-remittáló forma (RRMS) ... 7

2.1.3. Másodlagos progresszív forma (SPMS) ... 7

2.1.4. Primer progresszív forma (PPMS) ... 7

2.1.5. Az SM patológiája ... 7

2.2. A cuprizone indukálta demielinizációs modell jellemzői ... 8

2.3. **A TRPA-1 receptor (Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1) szerepe és jelentősége a demielinizáció folyamatában** ... 9

3. Célkitűzések ... 10

4. Anyagok és módszerek 1 ... 11

4.1. TRPA-1 teljes génhiányos egér-modell ... 11

4.2. A kísérleti protokoll ... 11

4.3. Az alkalmazott vizsgálati eljárások ... 12

4.3.1. Open Field teszt ... 12

4.3.2. Y-maze teszt ... 12

4.4. Mechanociceptív küszöb mérése ... 12

4.5. Motoros teljesítőképesség teszt ... 12

4.6. MRI-vizsgálat (Mágneses Magrezonanciás Képalkotás) ... 13

4.7. Szövettani vizsgálatok ... 13

4.7.1. Luxol Fast Blue (LFB) ... 13

4.7.2. Immunhisztokémia, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) és Ionized Calcium-binding Adaptor Molecule – 1 (Iba-1) ... 13

4.8. Elektronmikroszkópia ... 13

5. Statisztika ... 14

6. Eredmények 1 (teljes TRPA-1 génhiányos egerek) ... 14

6.1. Mechanociceptív küszöb mérés ... 14

6.2. Motoros teljesítőképesség teszt ... 14

6.3. Y-maze teszt ... 14

6.4. Open-field teszt ... 14

6.5. T2-súlyozott ^{1}H MRI mérések ... 14

6.6. Luxol-Fast-Blue festés a demielinizáció fokának megállapítására a 3. héten 15
6.7. Asztrocita és mikroglia/makrofág akkumuláció és aktiváció 15
6.8. Elektronmikroszkópos vizsgálat 15
7. TRPA-1 szelektív antagonistával történő gátlásának hatása 15
8. Összegzés 16
9. GFAP-Cre kondicionált TRPA-1 KO egérmodell 16
10. Alkalmazott vizsgálatok 16
11. TRPA-1 kvantitatív RT-PCR 16
12. MR spektroszkópia fejlesztése 17
13. Eredmények 2 (GFAP-Cre TRPA-1 kondicionált KO egérmodell) 17
13.1. TRPA-1 kvantitatív RT-PCR eredmények 17
13.2. T2-súlyozott MRI 17
13.3. A demielinizáció fokának vizsgálata LFB festéssel és MBP immunhisztokémiával 18
13.4. Mikroglia/makrofág aktiváció és akkumuláció vizsgálata immunhisztokémiával 18
13.5. MR-spektroszkópia 18
14. Diszkusszió 18
15. Új eredmények összesítése 20
16. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk listája 21
17. További publikációk listája 21
18. Köszönetnyilvánítás 22
19. Hivatkozások 23

1. 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

PDGFα - 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

2. Bevezetés

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

2.1. 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 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).

2.1.1. 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.

2.1.2. 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.

2.1.3. 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.

2.1.4. 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.

2.1.5. 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.

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.

2.2. 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.

2.3. A TRPA-1 receptor (Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1) szerepe 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).

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 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 cell) 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 Ca^{2+}-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).

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.

3. 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. Munkám egyik első lépéseként ki kellett fejlesztenem 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 tűztem 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 lesz 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.

4. Anyagok és módszerek 1

4.1. 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.

4.2. 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.

4.3. Az alkalmazott vizsgálati eljárások

4.3.1. Open Field teszt

Az általános szorongás meghatározásának egyik módszere, amelynek során az állatok egy viszonylag nagyméretű arénába helyeztük, 10 percre. Az állatok mozgását digitális kamerával rögzítettük, majd viselkedés analizáló szoftverrel kiértékeltük.

4.3.2. Y-maze teszt

A munkamemória működőképességének meghatározására használt teszt az „Y-útvesztő”

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)

4.4. Mechanociceptív küszöb 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, az adott vastagságú filamenthez tartozó értéket rögzítettük, mint fájdalomküszöb értéket.

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 alkalmazott nyomóerőt rögzítettük, mint küszöbértéket.

4.5. 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. 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 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.

4.6. MRI-vizsgálat (Mágneses Magrezonanciás Képalkotás)

A kísérletek egy több hetes fejlesztési periódus előzte meg, amelynek során fantomokon, illetve később élő állatokon is nagyszámú pilot mérést végeztem el. 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. A pilot mérések után a T2 RARE – (Rapid Aquisition with Relaxation Enhancement) szekvencia bizonyult megfelelőnek. A T2-súlyozott ^{1}H 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.

4.7. Szövettani vizsgálatok

4.7.1. Luxol Fast Blue (LFB)

Az LFB festéssel a szövetben található mielin jelölhető meg (Acs and Kalman 2012). A 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.

4.7.2. 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 metszeteket 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).

4.8. Elektronmikroszkópia

A megfelelően előkészített mintákon 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.

5. 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). 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.

6. Eredmények 1 (teljes TRPA-1 génhiányos egerek)

6.1. Mechanociceptív küszöb mérés

A fájdalomküszöb vizsgálatokban, sem a von-Frey filamentumokkal végzett, sem a (DPA-val) végzett – egyébként sokkal kisebb variabilitású – vizsgálatok esetén sem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között.

6.2. Motoros teljesítőképesség teszt

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).

6.3. Y-maze teszt

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.

6.4. 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).

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.

6.5. T2-súlyozott ^{1}H MRI mérések

A cuprizone kezelés 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. A %-os meghatározás az adott egyed alapvonal méréséhez viszonyított intenzitásnövekedés mértéke, 100%-nak a kezdeti állapotot vettem.

6.6. 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.

6.7. 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.

6.8. 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.

7. TRPA-1 szelektív antagonistával történő gátlásának hatása

Kézenfekvő volt, hogy kísérletet tegyünk a receptor gátlására egy gyógyszerjelölttel, így egy pilot preklinikai vizsgálatot végeztünk az AMG0902 jelű vegyülettel. 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.

8. Összegzés

Az a tény, hogy a TRPA-1 receptor hiánya önmagában ilyen markáns protektív hatást képes kifejteni, megerősített minket abban, potenciális gyógyszercélpontként további vizsgálódást igényel. 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 GFAP-Cre kondicionált TRPA-1 KO állatokra térünk át a vizsgálatok további szakaszában.

9. GFAP-Cre kondicionált TRPA-1 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 kereszteztünk GFAP promoterrel irányított Cre rekombináz gént hemizigótán hordozó egerekkel, 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$^{+/-}$ nőstényeket pároztattuk a floxolt TRPA-1 homozigóta TRPA-1 $^{Fl/Fl}$ hímekkel. Az ebből született mindkét génre heterozigóta nőstényeket visszakereszteztük a TRPA-1 $^{Fl/Fl}$ hímekkel. Az ebből a konstellációból született Cre$^{+/-}$ TRPA1 $^{Fl/Fl}$ hímek képezték a vizsgálataink alapját, illetve az alomtestvéreik (Cre$^{+/-}$ TRPA-1$^{Fl/-}$ és Cre $^{-/-}$ TRPA-1 $^{Fl/Fl}$) hetero és floxolt kontrollként szolgáltak. Miden állat genotípusát meghatároztuk a farokból vett szövetminta segítségével.

10. Alkalmazott vizsgálatok

A kísérlet második szakaszában is a korábban 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. A korábban leírt T2-súlyozott MRI vizsgálatokat szintén végrehajtottuk.

11. TRPA-1 kvantitatív RT-PCR

Teljes RNS izolációt is végeztünk homogenizált cortex mintákból. A tisztított RNS-t kvantifikáltuk spektrofotométerrel, illetve kezeltük a mintát DNAse I enzimmel 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. 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. 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. 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. Az irodalom jelenleg a rendelkezésünkre álló hardveres setup mellett nem ír le egéren végrehajtott in vivo spektroszkópiai eljárást hasonló modelleken. Nagyobb térerőn is igen kevés és más profilú vizsgálatok történtek (Praet, Orije et al. 2015). 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 foszfo-kreatin, taurin) koncentrálunk, így ezen a metabolikus változások kimutatására kíséreltük meg optimalizálni a saját setupot.

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

13.1. TRPA-1 kvantitatív RT-PCR eredmények

Mind a Cre +/- TRPA-1 Fl/- csoportban (68%), mind pedig a Cre +/- TRPA-1 Fl/Fl 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.

13.2. T2-súlyozott MRI

A kezeletlen kontroll csoportban az intenzitás gyakorlatilag nem változott és más elváltozást sem fedeztünk fel a teljes kísérlet alatt. Ezzel szemben az intenzitások szignifikánsan emelkedtek a cuprizone kezelt GFAP-$Cre^{-/-}$TRPA-$1^{Fl/-}$ csoportban a GFAP-$Cre^{+/-}$TRPA-$1^{Fl/-}$ és GFAP-$Cre^{+/-}$TRPA-$1^{Fl/Fl}$ csoportokhoz hasonlítva a 3. és 4. héten egyaránt. A legnagyobb eltérés a negyedik héten mutatkozott a GFAP-$Cre^{-/-}$ TRPA-$1^{Fl/-}$ csoport (179,75%) és a GFAP-$Cre^{+/-}$TRPA-$1^{Fl/-}$ 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-$1^{Fl/Fl}$, GFAP-$Cre^{+/-}$ TRPA-$1^{Fl/-}$ és GFAP-$Cre^{+/-}$TRPA-$1^{Fl/Fl}$ 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.

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.

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. A GFAP kondicionált KO genotípus sem volt képes létrehozni szignifikáns különbséget a 6. héten a cuprizonnal kezelt csoportokban a kontrollhoz viszonyítva.

13.5. MR-spektroszkópia

A Spektroszkópiával nyert méréseink eredménye kettős. Az in vivo ^{1}H 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 (1. hét 75%, 2.hét 83%, 3.hét 88%). A kontroll csoportban nincs változás, az NAA mennyiségét a Cr+pCr (kreatin, foszfo-kreatin csúcsához normálva adjuk meg, mivel korábbi kutatásokból tudjuk (Orije 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.

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

Munkánk során behatóan megvizsgáltuk a TRPA-1 receptor szerepét a neurogén gyulladással járó, demielinizációs folyamatokban, teljes KO, illetve mGFAP-Cre TRPA1 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 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 létrejöttében. 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.

Munkánk első periódusában bizonyítottuk, hogy a TRPA-1 total KO genotípus képes csökkenteni az érett oligodendrociták apoptotikus hajlamát. Mivel nemrég leírták az oligodendroglián megjelenő TRPA-1 expressziót, így ez egy közvetlen hatást feltételez (Hamilton et al., 2016). Mivel az asztrocitán lényegesen nagyobb mennyiségben expresszálódik a TRPA-1 receptor, így a közvetett hatásnak is lényeges szerepe lehet a folyamatokban 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 közvetítésére és felerősítésére, így a receptor legalább két úton involválódhat a patomechanizmusban.

Számos korábbi tanulmányban leírták, hogy a TRPA-1 receptor fiziológiás állapotban részt vesz a normális Ca^{2+} -szint szabályozásában (Lee et al., 2012;Shigetomi et al., 2012;Shigetomi et al., 2013;Lee et al., 2016;Bosson 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 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 fellépő következményes demieliinizáció kialakulásában. Az ICH által létrehozott oxidatív stressz aktiválja a csatornát, amelynek hatására létrejön a Ca^{2+} influx és a következményes NOX1 és Calpain1 felszabadulás, amely súlyosbítja a mielinpusztulást (Xia 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.

Munkánk 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 et al., 2015) (Orije 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, alacsony térerejű műszeren
- 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. Autoimmunity, 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." PloS one **8**(10): e77986.

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

Bandell, M., et al. (2007). "From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs." Current opinion in neurobiology **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." Journal of neurocytology **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." Molecular Neurodegeneration **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." Journal of Neuroimmunology **320**: 1-10.

Brück, W., et al. (2012). "Reduced astrocytic NF-κB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination." Acta neuropathologica **124**(3): 411-424.

Clapham, D. E., et al. (2001). "The TRP ion channel family." Nature Reviews Neuroscience **2**(6): 387-396.

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

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

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

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

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

Franco-Pons, N., et al. (2007). "Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination." Toxicology letters **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: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization." Protein & cell **8**(9): 644-661.

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

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

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

Hennig, J., et al. (1986). "RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR." Magnetic resonance in medicine **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." Neuropathology and applied neurobiology **37**(6): 676-684.

Herring, N. R. and C. Konradi (2011). "Myelin, copper, and the cuprizone model of schizophrenia." Frontiers in bioscience (Scholar edition) **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." Experimental 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." Acta neuropathologica **118**(6): 723-736.

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

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

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

Kraeuter, A.-K., et al. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. Pre-clinical models, 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." Cells **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." Pharmaceuticals **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." Journal of chemical neuroanatomy **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." Molecular Pain **12**: 1744806916677761.

Li, D.-H., et al. (2008). "Advances on mutant p53 research." Yi chuan= Hereditas **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." Experimental neurology **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." Molecular cell **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." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **33**(6): 978-985.

Mason, J., et al. (2001). "Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre." Neuropathology and applied neurobiology **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." Brain pathology **11**(1): 107-116.

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

Nagata, K. (2007). "TRP channels as target sites for insecticides: physiology, pharmacology and toxicology." Invertebrate Neuroscience **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 https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS.

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

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

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

Olechowski, C. J., et al. (2009). "Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." PAIN® **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." Neuroimage **114**: 128-135.

Pachner, A. R. (2011). "Experimental models of multiple sclerosis." Current opinion in neurology **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." Neurochemical research **32**(2): 279-292.

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

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

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

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

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

Sand, I. K. (2015). "Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis." Current 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." Brain research bulletin **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." Journal of medicinal chemistry **59**(6): 2794-2809.

Schneider, C. A., et al. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nature methods **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." Nature neuroscience **15**(1): 70-80.

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

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

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

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

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

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

Torkildsen, Ø., et al. (2008). "The cuprizone model for demyelination." Acta Neurologica Scandinavica **117**: 72-76.

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

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

Voß, E. V., et al. (2012). "Characterisation of microglia during de-and remyelination: can they create a repair promoting environment?" Neurobiology of disease **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." Frontiers in Molecular Neuroscience **12**: 98.

Xiao, L., et al. (2008). "Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes." Molecular psychiatry **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." Schizophrenia Research and Treatment **2011**.

Xu, H., et al. (2009). "Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone." Behavioral neuroscience **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." Glia **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." Neuroscience bulletin **29**(5): 633-641.