

Cuprizon-indukálta patológiai változások a sclerosis multiplex rágcsálómodelljében

Szilágyi Tamás Gábor

Témavezető: Ifj. Prof. Gallyas Ferenc., Ph.D., D.Sc.



Ph.D. Tézis

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Ph.D. Programvezető: Ifj. Prof. Gallyas Ferenc., Ph.D., D.Sc.

Doktori iskola vezetője: Ifj. Prof. Gallyas Ferenc., Ph.D., D.Sc.

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Orvostudományi Kar

Pécsi Tudományegyetem

Pécs 2026

1 Bevezetés

1.1 Sclerosis multiplex

A sclerosis multiplex (SM) a leggyakoribb krónikus, gyulladásszerű demielinizációs betegség, amely a központi idegrendszert (CNS) célozza, és széles körben úgy tartják, hogy autoimmun jellegű. Körülbelül 3 millió embert érint világszerte, főként a 20 és 40 év közötti fiatalokat (globális átlag 32 év) és ez a szám folyamatosan növekszik. Az SM érintettség kétszer gyakoribb nőknél mint a férfiaknál. Pervalenciája jelentősen eltér az etnikai hovatartozástól függően. A genetikai hajlamon túl a különböző környezeti hatások, mint a földrajzi elhelyezkedés és életszínvonal is hatással lehetnek az előfordulásra. Az alacsony mennyiségű napsugárzás, a nem elégséges D-vitamin bevitel, és az alacsony 25-hidroxi-D-vitamin szint a szérumban, a dohányzás, az elhízás és a kórelőzményben szereplő Epstein-Barr vírus fertőzés mind általános környezeti kockázati tényezői az SM-nek. Az SM etiológiája és patogenezise továbbra is jelentős kutatási kihívást jelent, mivel nem minden mechanizmus tisztázott. Bár az SM hagyományos kezelése – gyulladáscsökkentők és immunmoduláló szerek – alapvetőek a betegség kezelésében, de nem képesek megállítani a neurodegenerációt és a betegség progresszióját. Ennek ellenére az új diagnosztikai módszerek és a betegségmódosító terápiák fejlődése lehetőséget ad a tünetek enyhítésére és a betegek túlélési idejének növelésére. A további kutatásokat hátráltatja az emberi idegszövethez való korlátozott hozzáférés, ezért az SM különböző aspektusait gyakran emlősökben tanulmányozzák. A cuprizont (bisz(ciklohexanone)oxaldihidrazon), (CPZ) alkalmazó állatmodell széles körben elterjedt és jól karakterizált kísérleti rendszer a demielinizáció és remielinizáció mechanizmusainak vizsgálatára. A cuprizon adagolásának megszüntetését követően elindul a természetes remielinizáció, ami különösen értékesé teszi a modellt a regeneráció vizsgálatára az SM kutatásában. Manapság, mint potenciálisan hasznos megközelítést a betegség oki kezelését lehetővé tevő terápiás célpontok megtalálására a CPZ-nal kezelt egéragyminták proteomikai elemzését javasolják. A tömegspektrometrián alapuló proteomikát széles körben alkalmazzák különféle összetett és többtényezős betegségek patogenezisének feltárására, ugyanis már a betegség kezdeti fázisában azonosíthatunk jellegzetes molekuláris változásokat, ezzel megelőzve a betegség súlyosabbá válását.

2 Célkitűzés

Az SM a leggyakoribb diszfunkciót okozó neurológiai betegség a fiatal felnőtteknél. Jelenleg a betegség tünetei és klinikai lefolyása hagyományos és újszerű szerek alkalmazásával kezelhető, azonban a betegség végleges gyógymódja nem áll rendelkezésre. Munkánk során a CPZ egérmódellet használtuk, amely nem fedi le az SM minden aspektusát, viszont a de- és remielinizáció egyértelműen körvonalazható. Így a következő célokat tűztük ki:

- ❖ CPZ kezelt egerek corpus callózumának átfogó proteomikai elemzése bottom-up proteomikai megközelítéssel MS-MS módszerrel.
- ❖ A de- és remielinizáció modulációjában részt vevő potenciális molekuláris célpontok azonosítása.
- ❖ A poszttranszlációs módosítások szerepének definiálása.
- ❖ Olyan molekuláris hálózatok felderítésére, amelyek egyértelműen összefüggnek a de- és remielinizációs folyamatokkal, valamint prediktálják és identifikálják az egyes szakaszokat az SM-ben.

Kutatásaink második felében arra voltunk kíváncsiak, milyen hatással vannak miRNS-ek a CPZ indukálta de- és remielinizációra. Ehhez a következő célokat tűztük ki:

- ❖ A de- és remielinizáció patológiájában részt vevő miRNS-ek azonosítása.
- ❖ A miRNS-146a expressziójának meghatározása azokban a szervekben, amelyek a CPZ-modellben érintettek.
- ❖ A miRNS-146a szintjének vizsgálata a fiziológiás mielinizáció során.
- ❖ A miRNS-146a hiányának vizsgálata a demielinizációra és axonvesztésre.
- ❖ A miRNS-146a hiányának hatása a citokinek, kemokinek és citokinreceptorok expressziójára.
- ❖ A vad típusú (WT) és miRNS-146a knockout (KO) egerek proteomja közötti eltérések feltárása.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Etikai nyilatkozat

Az állatkísérleteket a US National Institutes of Health által publikált Guide for the Care and Use of Laboratory Animals alapján végeztük, amely protokollok alkalmazását a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (PTE MÁB) és a Dán Állat-egészségügyi Bizottság hagyta jóvá.

3.2 Cuprizon kezelés

Az állatokat random 4 csoportra osztottuk (n=5). Három csoportot porított 0.2% CPZ-t tartalmazó általános rágcsálótáppal etettünk 4 hétig *ad libitum* a demielinizáció előidézésére. Két csoportban a cuprizon etetés végét követően 2 napos akut remielinizációt és 14 napos teljes remielinizációt állítottunk be. A kontroll csoport ugyanazt kapta CPZ nélkül. Az állatokat izoflurános anesztézia alatt cervikális diszlokációval termináltuk. Az agyakat kivettük a koponyából majd a corpus callosumot kimetszettük és szárazjégen lefagyasztottuk. A mintákat -80°C -on tároltuk további feldolgozásukig.

3.3 Mintaelőkészítés, folyadékkromatográfia, tömegspektrometria (nano LC-MS/MS)

A demielinizált, akutan és teljesen remielinizált, valamint a kontrollcsoportokból kimetszett corpus callosumokat, proteáz- és foszfatáz-inhibitorokat, 10 mM ditioeritritet (DTT), 10 mM nátrium-ortovanadátot és benzonázt (0.05%) tartalmazó puffer oldatban (pH 7,5) homogenizáltuk, majd ultrahangos sejteltávolítóval szonikáltuk. A proteineket aceton és triklórecetsav hozzáadásával precipitáltuk centrifugálással összegyűjtöttük és a fehérjeprecipitátumot 6 M urea-val, 2 M tioureával és 10 mM DTT-vel szolubilizáltuk, majd jódcetamiddal alkileztük, lizil endopeptidázzal (Lys-c) és tripszinnel emésztettünk. Ezután a teljes fehérjetartalmat aminosav-sorrend-elemzéssel becsültük meg és izobár címkékkel (iTRAQ 4-plexTM) jelöltük a relatív mennyiségi meghatározáshoz. A foszforilált és glikozilált peptideket a TiSH (TiO₂-SIMAC-TiO₂) protokoll alapján dúsítottuk. A nano LC-MS/MS azonosítás előtt a foszforilált, deglikozilált és a nem módosított peptideket frakcionáltuk. Az egyes frakciók analízisét egy Thermo gyártmányú nano-Easy LC segítségével végeztük, amelyhez Q-Exactive vagy Velos tömegspektrométert csatlakoztattunk. A peptidfrakciót egy 2 cm-es, 100 μm belső átmérőjű előtétoszlopra vittük fel nano-Easy LC segítségével és 250

nl/perc áramlási sebességű többlépcsős gradienselúcióval közvetlenül eluáltuk egy fordított fázisú C18 analitikai oszlopra (3 μm , 75 μm x 150-200 mm.) A fehérjeazonosítást az NCBI és a Swiss-Prot adatbázisaiban taxonómiaileg háziégerre (*mus musculus*) korlátozott kereséssel végeztük a Mascot keresőszerver segítségével.

3.4 Immunhisztokémia

A fagyott natív agyakat, formalinban fixáltuk, paraffinba ágyztuk és lemetsztük. A 8 μm szeleteket deparaffináltuk és mikrohullámú antigén feltárást végeztünk. Az endogén peroxidáz aktivitást és a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk. A primer és torna-peroxidázzal konjugált anti-egér IgG másodlagos antitestekkel exponáltuk. Az előhívás után a sejtmagokat Meyer hematoxilinnal festettük, majd a metszeteket dehidratáltuk, és Canada balzsammal fedtük le. A metszeteket Panoramic midi szkennelvel digitalizáltuk. A kvantitatív analízist a Molecular Devices' MetaXpress® képanalizáló szoftverrel végeztük.

3.5 Gén ontológia, útvonal és funkcionális korrelációs elemzések

A deregulált fehérjéket fehérjeosztályokba soroltuk a PANTHER osztályozó rendszer szoftver segítségével (<http://www.pantherdb.org>) és annotáltuk az UniProt fehérjekatalógusból (<http://uniprot.org>). A klaszteranalízis során a Max Planck Biokémiai Intézet (<https://maxquant.net/perseus/>). által kifejlesztett Perseus szoftverplatformot (<http://www.perseus-framework.org>) használtuk. A biológiai folyamatok és sejtalkotók génontológiai (GO) elemzését PANTHER szoftverrel végeztük. A szabályozási hálózat predikcióját az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftver (Qiagen Inc. <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-ipa/>) végezte, az Ingenuity Knowledge Base, a biológiai kölcsönhatások és funkcionális annotációk magasan strukturált tárházának felhasználásával.

3.6 Statisztikai analízis

A fehérjék és foszfopeptidek intenzitását a teljes peptid mennyiségére normalizáltuk. Az adott körülmények között létrejövő változások mértékét az 5 párhuzamos kontroll minta átlaga alapján becsültük. A log₂ transzformált protein arányokat és az differenciált expressziót Linear Models for Microarray Data (Limma) és Stats packag-ek segítségével elemeztük. A foszfopeptidek mennyiségét tovább normalizáltuk a nem módosított fehérjék mennyiségével szemben. A kondíciók közötti változást akkor tekintettük szignifikánsnak, ha

a q-érték kisebb volt mint 0.05. A csoportok összehasonlításához egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) végeztünk, amit Tukey's post-hoc teszt követett. A csoportokat szignifikánsan eltérőnek tekintettük, ha a p-érték kisebb volt, mint 0.05. A humán SM léziótípusok és a nem érintett fehérállományi részek IPA szoftver által prediktált szabályozó génjeinek expressziós különbségeit az edgeR csomag (3.8) szoftvercsomaggal azonosítottuk a korábban létrehozott adatbázis felhasználásával. A szignifikáns különbségek megállapítására a Benjamini és Hochberg eljárásával korrigált p-érték szűrést alkalmaztunk.

4 Eredmények

4.1 A de- és remielinizációban érintett fehérjék mennyiségi meghatározása

A kontroll csoport (C) kivételével 0.2% cuprizon tartalmú porított rágcsálótáppal demielinizációt idéztünk elő 4 héten keresztül (4wD), majd a kezelés befejezésével lehetővé tettük a remielinizációt 2 napig (2dR) és két hétig (2wR) egy-egy csoportban. A 20 mintából (csoportonként 5) összesen 3183 nem módosított fehérjét azonosítottunk. Ezekon kívül 6017 egy- vagy többszörösen foszforilált és/vagy glikozilált peptidet mutattunk ki. Az előző peptidszekvenciák alapján 1703 PTM fehérjét azonosítottunk. A demielinizációban és remielinizációban történt expressziós változásokat a proteinek klaszterezésével vizualizáltuk. Ezért 7 klasztert választottunk ki mind a nem módosított, mind a PTM fehérjékhez. Hasonlóan alakultak a fehérjeszint-változások irányai a különböző kísérleti csoportok között az adott klasztereken belül. A további elemzéshez 1970 módosítatlan és 1255 PTM fehérjét használtuk, amelyekből szignifikánsan 93 szintje emelkedett és 68 csökkent a de-, illetve remielinizáció során. Az 1255 egyszeresen vagy többszörösen foszforilált és/vagy glikozilált fehérje közül 40-et szignifikánsan érintett a de- és remielinizáció. Mindössze 9 olyan fehérjét találtunk, amelyet mind PTM-ként, mind módosítatlanként azonosítottunk. Az upregulált PTM fehérjék 30%-a foszforilált, a többi N-glikozilált. Ezzel szemben a downregulált PTM fehérjék 92%-a legalább monofoszforilált volt. Összességében 39 demielinizáció specifikus, 24 korai és 48 késői remielinizáció specifikus nem módosított, valamint 18 demielinizáció-specifikus 3 korai- és 9 késői remielinizációs PTM fehérjét azonosítottunk. Másrészt, bár különböző mértékben, 30 nem módosított és 6 PTM fehérje volt érintett két csoportban is, míg 20 nem módosított és 3 PTM fehérje mindhárom csoportban szignifikáns változáson ment keresztül.

4.2 Foszforilációs változások immunhisztokémiai vizsgálata de- és remielinizáció során

Immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk p-Ser, p-Thr és p-Tyr specifikus primer antitestek felhasználásával mind a négy kísérleti csoportba tartozó állatok agymetszetén. A sejtmagok és sejttestek alacsony százalékban festődtek, azonban nem lehetett azonosítani egy adott sejttípusra jellemző specifikus mintázatot vagy festődést. Annak érdekében, hogy a foszforilációt a de- vagy remielinizációval összefüggésbe hozzuk, képelemző szoftverrel mértük a festődés intenzitását az agymetszetek között. 9,17 és 26%-os különbséget találtunk foszforiláció tekintetében a Ser, Thr és Tyr csoportok között. Továbbá a festődés intenzitása alacsonyabb volt a korai remielinizációban, mint a kontrollcsoportban és a demielinizációs csoportban a Thr és Tyr foszforilációja alapján.

4.3 A de- és remieleinizáció által befolyásolt gének GO analízise

A specifikus biológiai folyamatok azonosítása érdekében over-reprezentációs tesztet végeztünk. Egyesítettük a különböző úton szabályozott 192 PTM és a nem módosított fehérjéket, majd elvégeztük a biológiai folyamatok tesztet. Kettő kivételével az összes fehérjét 76 kategóriába soroltuk. Az algoritmus által valószínűsített kategóriák a következők: glia- és neuronális funkció, az anyagcsere, a sejthalál, a gyulladásos válasz, a fehérje- és kation-homeosztázis, valamint a citoskeletonhoz kapcsolódó folyamatok. A várakozásnak megfelelő oligodendrocita kompatibilis események mellett az over-reprezentációs teszt további asztrocitával és mikrogliaival kapcsolatos folyamatok részvételét jelzete, mint például glutamát metabolikus folyamatok és gyulladásos reakciók. Ezek az adatok összhangban vannak azzal az elfogadott véleménnyel, hogy a CPZ által kiváltott oligodendrocita vesztést a mikroglia és asztrociták aggregációja és aktivációja kíséri. A biológiai folyamatokban 50%-nál kisebb mértékben jelen lévő és két nem osztályozott fehérje került kizárásra. A fennmaradó 157 fehérjét a csak remielinizációs remyelination only (RO), és a demielinizációval kapcsolatos demyelination related (DR), csoportokra osztottuk, és over-reprezentációs tesztet végeztünk rajtuk. Az algoritmus a DR fehérjéket 9 kategóriába sorolta. Az RO fehérjék esetében az egyetlen szignifikáns kategória az idegrendszer fejlődése volt, amely a mielinizációt tartalmazza a legspecifikusabb alkategóriaként. Az RO fehérjék remielinizációt szabályozó mechanizmusokban betöltött szerepének további vizsgálatához az Ingenuity Pathway Knowledge Base-t használtuk, hogy kiválasszunk egy összekapcsolt csomópontokból álló csoportot, és felmérjük azok sejtszintű változásait a 2dR és a 2wR

fázisaiban. A két remielinizációs csoporton végzett elemzés ugyanazt a nyolc tagból álló hálózatot eredményezte. A korai remielinizációban kettő közülük upregulált volt, míg a másik hat tag nem volt szignifikánsan érintett, ezzel szemben a késői remielinizáció során fordított mintázatot figyeltünk meg. A nyolc gén előfordulását kerestük a humán SM léziótípusok és az NAWM között eltérően expresszált gének között. Amint azt megállapítottuk, négy közülük eltérően expresszáldott legalább az egyik léziótípusban, és a perlekán (HSPG2) gén volt a leginkább upregulált a remielinizációs léziókban. A remielinizációs SM léziókban az azonosított kísérleti remielinizációs hálózati ortológok génextpressziós mintázata jobban összhangban volt a CPZ-modell korai remielinizációjával, azaz a HSPG2 upregulációjával és a jelátviteli és transzkripció aktivátor 1 (STAT1) és a trombospondin-4 (THBS4) downregulációjával.

5 Diszkusszió

A corpus callosumok proteomikai analízise összesen 4886 fehérjét eredményezett, azonban ezek kezdeti klaszterezése nem mutatott olyan csoportot, amelynek mennyiségi változása a de- és remielinizációs szabályozókra utaló egyértelmű mintát követett volna. Összesen 192 fehérjét tudunk kiválasztani, amelyek koncentrációja szignifikánsan különbözött a kontrolltól legalább egy kísérleti csoportban. A választott molekulák funkciói nagyon változatosak, amelyek közül kevés volt jellemző a de- és remielinizációs folyamatokra. Az összesen 57 demielinizáció specifikus fehérje közül 25-nél több mint 1,5-szeres növekedés volt tapasztalható, 14-nek pedig csökkent a koncentrációja. Utóbbiak közül a myelin basic protein (MBP) 13,9%-ra, míg a mielinhez kapcsolódó oligodendrocyta basic protein szintje 20,8%-ra csökkent a kontrollal összevetve, ami egyértelműen összhangban van a 4wD csoportban előforduló masszív demielinizációval és oligodendrocita vesztéssel. Három foszfopeptidje alapján azonosítottuk a myelin basic proteint; egyikük két treonin foszforilációs helyet tartalmaz. Ezeknek a helyeknek a mitogen activated protein kinases (MAPK) általi foszforilációja drámaian csökkenti a fehérje kötődését a negatív töltésű lipid kettősrétegekhez. Figyelembe véve, hogy a MAPK-k aktiválódnak a kezelés során, ezek a foszforilációs változások összhangban vannak a CPZ által kiváltott demielinizációval. Ezen túlmenően a lipídanyagcserében részt vevő 17 fehérje mellett további két mielin-asszociált fehérjét találtunk; 2',3'-ciklikus-nukleotid 3'-foszfodiésztráz (CNP), és ermin. Érdekes módon ez utóbbi mindhárom kísérleti körülményben csökkent koncentrációban fordult elő, ami nehezen harmonizálható a mielinogenezis során a citoskeletonális átrendeződésekben és a

mielinhüvely stabilitásának fenntartásában játszott szerepével. A várakozásoknak megfelelően a 27 korai és 54 késői remielinizációra specifikus fehérje többsége a mielinhüvellyel, a neuronális folyamatokkal, a szinapszisokkal és a citoskeleton szerveződésével társult. A főbb oligodendrocita marker fehérjék közül azonban csak a myelin-associated oligodendrocyte basic protein PTM formáját és csak az MBP-t találtuk. Másrészt csökkent foszforilált MBP-szintet találtunk, ahogy korábban más publikációkban is leírták SM-ben szenvedő betegek és CPZ kezelt egerek mintáiban. Ezen túlmenően az a megállapításunk, hogy egy kivétellel minden csökkent PTM fehérje foszforilálódott, összhangban van azzal a véleménynel, hogy a csökkent foszforiláció a demielinizációs patogenezis része lehet. Az immunhisztokémiai vizsgálat a fehérjék foszforilációjának mérésére a de- és remielinizáció során nem bizonyult meggyőzőnek. Bár azt találtuk, hogy a Ser, Thr és Tyr foszforilációja nem változott számottevően a csoportok között, és nem lehetett egyértelmű mintázatot vagy sejttípus-specifikus festődést azonosítani. Ellentétben a csak remielinizációs fehérjékkel, a demielinizációval kapcsolatos fehérjék nem korrelálnak a megfelelő várható biológiai folyamatkategóriákkal, mint az oligodendrocita apoptózis, demielinizáció, oxidatív stressz vagy mitokondriális károsodás. Ehelyett számos DR-fehérjét a citoskeletonális és organelum-újjászervezéssel, a fémion-homeosztázissal és a migrációval kapcsolatos biológiai folyamatokba soroltak, amelyek valószínűleg asztrocitózissal és mikroglia aktivációval kapcsolatos folyamatok. Ezenfelül, a 60 demyelination only DR fehérjék nem sorolhatók be semmilyen biológiai folyamat kategóriába, ami azt jelzi, hogy ezeknek a fehérjéknek a statisztikailag elfogadható szignifikancia szerinti besorolása csak akkor lehetséges, ha olyan fehérjékkel kombináljuk őket amelyek kettő vagy mindhárom kísérleti csoportban megváltozott szinttel rendelkeznek. Ezért az előzőekben leírtak alapján a CPZ-vel kezelt állatok corpus callosumának proteomikai elemzése informatívabbnak tűnik a remielinizáció folyamataira vonatkozóan, mint a demielinizációra. A korai és késői RO fehérjéken végzett IPA hálózatelemzés egyetlen hálózatot eredményezett, amelynek tagjai fordított mintázatban aktiválódtak a korai és késői remielinizáció során. Minden információt összevetve ennek a prediktált hálózatnak a remielinizációs folyamatok szabályozásában betöltött szerepe nem tűnik megkérdőjelezhetetlennek, ezért további vizsgálatokra van szükség a de- és remielinizációt szabályozó mechanizmusok azonosításához.

6 Irodalmi áttekintés

6.1 miRNS146a

A miRNS-ek rövid, nem kódoló RNS-molekulák (19-25 nukleotid hosszúak), amelyek a génextpresszió poszt-transzkripció szabályozóiként működnek. Becslések szerint az összes fehérjét kódoló emlős génnek több mint 60%-a szabályozható velük. Az individuális csendesítés mellett szinergikusan is működhetnek, a miRNS-párok kooperatív módon képesek elnyomni a cél-mRNS translációját, ami a represszió fokozott hatékonyságához és specifitásához vezet, ezenfelül a miRNS-ek ugyanazon az útvonalon konvergálhatnak alternatív kimenetekkel. További figyelemre méltó szempont, hogy jellegzetes expressziós mintázataik korai prediktorai számos betegségnek, ezért értékes diagnosztikai és prognosztikai markerek lehetnek, mivel könnyen, reprodukálhatóan, megbízhatóan és non-invazív módon mérhetőek, még a formalin fixált paraffinba ágyazott szövetekben is. Számos miRNS dinamikus és specifikus időbeli és lokalizációbeli expressziót mutat az egyes fejlődési és működési folyamatokban, ezért SM érintettség esetén megmutathatják a neurodegeneratív károsodás mértékét, a remielinizáció kezdetét, az exacerbációkat, vagy jelezhetik az immun- és központi idegrendszeri sejt- és molekulatermelést. Emellett népszerű témává váltak új terápiás beavatkozások tervezésében is, ahol klinikai vizsgálatok folynak a miRNS funkció helyreállítására miRNS-mimetikumok beadásával, vagy anti-miR oligonukleotidokkal gátolják működésüket. Az egyik leggyakrabban előforduló miRNS, amely a CNS-ben expresszálódik, szerepet játszik fiziológiai és patológiai folyamatokban egyaránt, például apoptózisban, migrációban, növekedésben, vírusfertőzésben és kétségtelenül diszfunkciót mutat különböző típusú neurológiai betegségekben, sőt ugyanazon neurológiai betegség különböző szakaszaiban a MiR-146a.

7 Anyagok és módszerek

7.1 Cuprizon kezelés

A 0,2–0,4% CPZ-nal kevert porított standard tápot *ad libitum* adagoltuk. A demielinizáció indukálásához a 7–8 hetes egereknek 4 héten keresztül CPZ-t adagoltunk (4 hét demielinizáció: 4wd). A remielinizációt két időpontban vizsgáltuk akut remielinizáció esetén 4 hét CPZ adagolást 2 nap normál étrend követett (2 nap remielinizáció: 2dr), míg teljes remielinizáció esetén 4 hét CPZ adagolást 2 hét normál étrend követett (2 hét remielinizáció:

2wr). A kontroll egerek normál rágcsálótápot fogyasztottak. A kísérletek során az egerek súlyát minden második nap megmértük, hogy bekövetkezik-e jelentős testtömeg csökkenés. A kísérleteket az egerek pentobarbitál túladagolásával történő elaltatásával termináltuk, és 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk.

7.2 RNS extrakció és kvantitatív PCR (qPCR)

Az agyat kiemeltük a koponyából és izoláltuk a corpus callosumot, azonnal lefagyasztottuk, majd koronális sorozatmetszetekre vágtuk (200 μm vastagságú metszetek). Sztereomikroszkóp segítségével a corpus callosumot finom Graefe-késsel vágtuk ki a metszetekből, a rostro-kaudális kiterjedése mentén. Az RNS-t miRNeasy micro Kit segítségével extraháltuk. A teljes RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel, illetve Agilent 2100 Bioanalyzerrel értékeltük. A miRNS expresszió méréséhez specifikus miRNS vizsgálatokhoz és sno135 endogén kontrollhoz való primerkészleteket, valamint a MicroRNA reverz transzkripció készletet használtunk a gyártó protokollja szerint. A qPCR méréseket Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR rendszerrel végeztük. Az egyes miRNS-k relatív expresszióját a $2^{-\Delta\text{Ct}}$ egyenletből számítottuk ki.

7.3 miRNS microarray

A miRNS profilalkotáshoz az Agilent Mouse miRNA Microarray Kitet (G4472A, $8 \times 15\text{k}$) a gyártó utasításai szerint (1.0 verzió) alkalmaztuk 100–100 ng minőségellenőrzött teljes RNS-sel. A jelölt mintákat 20 órán át 55°C -on hibridizáltuk. A tömböket Agilent DNA Microarray Scanner BA-val szkenneltük, a jelszámítást Feature Extraction 10.7 Image Analysis Software-rel végeztük, az adatokat pedig Genespring GX10.0-val elemeztük tovább. A microarray adatokat az NCBI Gene Expression Omnibus adatbázisban helyeztük el GSE100662 nyilvántartási számon.

7.4 Meso Scale Discovery Multiplex elektrokemilumineszcens vizsgálat

A corpus callosum citokinszintjét a Meso Scale Discovery (MSD, USA) elektrokemilumineszcens proinflatórikus egér V-Plex Plus Kittel (IL- 1β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF), egy MULTI-SPOT 4 pontos citokin-specifikus lemezzel (MIP1 α , VEGF és MMP9) és egy MULTI-SPOT 2 pontos citokin-specifikus lemezzel (TNF-RI és TNF-RII) mértük.

SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery) lemezolvasót használtunk, és az adatokat az MSD Discovery Workbench szoftverrel elemeztük a gyártó utasításai szerint.

7.5 Enzimhez kötött immunszorbens teszt

A corpus callosumban lévő SMAD4 (mothers against decapentaplegic homolog 4) és SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25) fehérjeszinteket miR-146a KO egerek és WT egerek között előre elkészített Sandwich ELISA kitekkel vizsgálták és hasonlítottuk össze a gyártó utasításai szerint.

7.6 Hisztopathológia

Az agyakat egy éjszakán át 4%-os PFA-ban utófixáltuk a paraffinba ágyazás előtt. Ezután 8 µm-es koronális metszeteket készítettünk a 161, 181, 209 és 221 szinteken. A demielinizációt Luxol fast blue festéssel és krezil-ibolyával értékeltük. Az axonális patológiát Bielschowsky festéssel vizsgáltuk. A corpus callosumban lévő metszeteket egy 100 pontos ráccsal fedtük le, melynek segítségével először a teljes lézió méretét határoztuk meg. Ezután megmértük a remielinizációt mutató terület méretét. Az immuncitokémiát paraffinmetszeteken végeztük, Iba1, Mac3, NG2 és CNP elleni antitestek felhasználásával. A festett sejteket morfometriai ráccsal fedett metszetekben számoltuk.

7.7 Kísérleti tervezés és statisztikai elemzés

A statisztikai tesztek Prism 7 szoftverrel (GraphPath, USA, CA, USA) végeztük, és a kvantitatív adatokat átlag ± SEM formátumban fejtjük ki. Minden ANOVA teszthez pontos p-értékeket adunk meg, ha $p > 0.0001$, és $p < 0.05$ szignifikánsnak tekinthető. Minden ANOVA tesztet egy megfelelő post hoc teszt követett. Nyers miRNA expressziós adatokat csoportonként 3-4 egértől kaptunk. A microarray adatokat a 75. percentilis jelintenzitásra normalizáltuk, és azokat, amelyek egy adott feltétel összes mintájában jelenlétet mutattak, kiszűrtük. A differenciálisan expresszált géneket akkor választottuk ki, ha átmertünk a jelintenzitás-szűrőn és legalább kétszeres statisztikailag szignifikáns változást mutattunk a csoportok között. A miRNA expresszió qPCR-rel történő validálására csoportonként 5-8 egeret használtunk, és az adatokat egyutas ANOVA-val, majd LSD post hoc tesztekkel elemeztük. A testtömeg, a timusz és a lép súlya, valamint az elváltozás méretének elemzése minden időpontban 4-16, 4-8 és 4-7 egeret használtunk, és az adatokat kétutas ANOVA-val, majd Bonferroni post hoc tesztekkel elemeztük. A proteom elemzéséhez 5 egeret vontunk be.

Az egyes fehérjék arányát (r) a három összehasonlítás bármelyikében a standard hibához (SE) hasonlítottuk össze, oly módon, hogy ha $r \leq 1/(1 + 2SE)$ vagy ha $r \geq (1 + 2SE)$, a fehérje megváltozott. Ha a fehérje az 5 egér közül csak egyben vagy kettőben volt mérhető, akkor azokat ebben az elemzésben nem vizsgáltuk. Az SMAD4 és SNAP25 ELISA-elemzései, valamint a citokinek, kemokinek és TNF-receptorok Meso Scale Discovery multiplex analízise minden csoportban 4-8 egérből történt, és az adatokat kétutas ANOVA-val, majd Bonferroni post hoc tesztekkel elemeztük.

8 Eredmények

8.1 MikroRNS-ek differenciált expressziója a corpus callosumban CPZ-indukált demielinizáció és remielinizáció során

A demielinizáció és remielinizáció patológiájában szerepet játszó miRNS-ek azonosítása érdekében izoláltuk a CPZ-nek kitett egerek corpus callosumát, és 627 miRNS-re vonatkozó Agilent mikroszkópikus elemzést végeztünk. Három miRNS-t azonosítottunk, a miR-146a, miR-181b és miR-193a, amelyek qPCR-rel megerősített kontrollokhöz képest eltérő expressziót mutattak. A miR-146a expressziója a CPZ-nek való kitettségre reagálva nőtt, és a remielinizációs fázisban tovább emelkedett. Ezzel szemben a miR-193a és a miR-181b expressziós szintje csökkent a CPZ által kiváltott demielinizációra reagálva, és a teljes remielinizációs fázisban visszatért a kiindulási értékre.

8.2 A miR-146a expressziója CPZ hatására különböző szervekben

A corpus callosum mellett a timuszban, a májban, a lépben és az izomszövetben is elemeztük a miRNS-146a expressziós szinteket. A corpus callosummal ellentétben ezekben a szervekben nem tapasztaltunk CPZ által indukált miR-146a-növekedést. A vizsgált szervek közül a miR-146a expressziós szintje a lépben volt a legmagasabb.

8.3 A miR-146a expressziója az agyban a születés utáni egerek fiziológiai mielinizációja során

Annak vizsgálatára, hogy a miR-146a szintje a fiziológiai mielinizáció során is emelkedik-e, megvizsgáltuk annak expresszióját 1–14 napos (P1–P14) posztnatális egerekből izolált

corpus callosumban; ez az időszak a legkritikusabb a fiziológiai mielinizáció szempontjából egerekben. Nem találtunk változást a miR-146a expressziójában, ami arra utal, hogy a CPZ-expozícióra adott válaszban megfigyelt emelkedés a demielinizációs patológiával kapcsolatos.

8.4 A CPZ expozíció szisztémás hatásai miR-146a-hiányos egerekben

A testsúlycsökkenés a CPZ-expozíció jellegzetes szisztémás hatása egerekben. Ahogy várható volt, mind a WT, mind a miR-146a KO egerek testsúlycsökkenést mutattak a CPZ-expozíció hatására, de a miR-146a KO egerek szignifikánsan kevesebb testsúlyt vesztek, mint a WT egerek a demielinizáció időszakában. A CPZ-ről ismert, hogy timusz atrófiát okoz. Ezért megvizsgáltuk a timusz és a lép tömegét a CPZ-expozíció hatására. A WT egerekben a csecsemőmirigy és a lép atrófiáját figyeltük meg, míg a miR-146a KO egerekben mindkét szerv atrófiája kevésbé volt súlyos vagy egyáltalán nem volt megfigyelhető.

8.5 A miR-146a hiány hatása a CPZ által kiváltott demielinizációra és axon veszteségre

A miR-146a KO egerekben a demielinizáció és az axonális károsodás szignifikánsan csökkent. A 2',3'-ciklikus nukleotid 3'-foszfodiészteráz+ (CNP+) mielinizáló oligodendrociták száma magasabb volt a miR-146a KO egerekben, mint a vad típusban a demielinizáció során, míg a neuron glia antigén 2+ (NG2+) oligodendrocita prekurzorok száma nem mutatott különbséget. Ezenkívül a lizoszómális membránprotein 2+ (Mac3+) sejtek számának csökkenését és az ionizált kalciumkötő adapter molekula 1+ (Iba1+) sejtek számának csökkenésére mutató tendenciát figyeltünk meg a corpus callosumban a KO egerekben a demielinizáció során. Két héttel a CPZ felfüggesztése után a demielinizált léziók nagyrészt remielinizálódtak, Iba1+ sejteket tartalmaztak, de ezeknek a sejteknek csak kisebb része volt Mac3+. A remielinizáció során a CNP+ sejtek száma mérsékelten nőtt, az NG2+ száma pedig csökkent; nem figyeltünk meg különbséget a KO és WT egerek között a CNP+ oligodendrociták tekintetében, de az NG2+ oligodendrocita prekurzor sejtek száma csökkent.

8.6 Kísérletileg validált miR-146a célgének és fehérjetermékek expressziója CPZ-expozíció hatására

A miR-146a célgénjeinek két csökkent expressziójú fehérjetermékét is azonosítottuk proteom adatkészletünkben az egyik a SMAD4, és SNAP25. ELISA vizsgálatokat alkalmaztunk annak kiderítésére, hogy a SMAD4 és az SNAP25 eltérően expresszálódik-e a miR-146a KO és WT egerek között a corpus callosumban a CPZ expozícióra adott válaszként. A várakozásoknak megfelelően a SNAP25 fehérjeszintjének növekedését figyeltük meg a KO egerek corpus callosumában a kontrollcsoport egereihez képest. A KO egerekben a SNAP25 fehérjeszintje csökkent a de- és remielinizáció során, míg a WT egerekben nem volt változás. A SMAD4 fehérjeszintje egyik egértörzsben sem változott szignifikánsan, és a SMAD4 fehérje egyik vizsgált időpontban sem volt eltérően szabályozva.

8.7 Citokinek, kemokinek és TNF-receptorok expressziója CPZ-expozícióra adott válaszként

Mind a TNF-RI, mind a TNF-II szignifikánsan megnövekedett expressziót mutatott a WT egerekben a CPZ-expozícióra, de a miRNS-146a KO egerekben nem változott. A TNF expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a remielinizáció során a WT egerekben a demielinizációhoz képest. A miR-146a KO egerekben a kontrollcsoportban találták a legmagasabb TNF expressziót, amely szignifikánsan magasabb volt, mint az akut remielinizáció során mért expresszió. A két egércsoport között semmilyen időpontban nem volt szignifikáns különbség a TNF expressziós szintjében. A WT egerekben a CPZ expozícióra adott válaszként a CCL2 szintjének szignifikáns emelkedését is megfigyeltük, de a miR-146a KO egerekben nem volt változás. Ezenkívül a CCL2 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a miR-146a KO egerekben a WT-hoz képest a demielinizáció során ($p < 0,01$). A további citokinek és kemokinek esetében azt találtuk, hogy az IL-1 β upregulálódott, míg az IL-2, IL-5, IL-6 és IL-12p70 downregulálódott a miR-146a KO egerekben, míg az IL-10 és a VEGF mind a miR-146a KO, mind a WT egerekben downregulálódott a CPZ-expozíció hatására. Azonban a vizsgált időpontokban nem volt szignifikáns különbség ezen citokinek és kemokinek expressziós szintjében a miR-146a KO és a WT egerek között.

9 Diszkusszió

A CPZ kezelés hatására a miRNS-146a, miRNS-181b és miRNS-193a szintek a kontrollokhöz képest eltérően változtak. A munkafolyamatok későbbi szakaszában a miR-146a szerepét vizsgáltuk tovább. A miR-146a nagymértékben expresszálódik az agy mikrogliaiban. Azonban a megfigyelt növekedése a corpus callosumban a CPZ expozíció hatására nem magyarázható kizárólag a beszűrődő mikroglia és makrofágok számának növekedésével, mivel a beszűrődő mikroglia sejtek száma már 1 héttel a CPZ kezelés után csökken és a miRNS-146a legmagasabb szintjét a teljes remielinizáció fázisában találtuk, azaz 2 héttel a CPZ kezelés felfüggesztése után. A központi idegrendszerben a miR-146a expressziójának növekvő szintje ellenére a CPZ nem indukált fokozott expressziót más szervekben, beleértve a májat és a timuszt, amelyek szintén érintettek a CPZ által. Ez arra utalhat, hogy a miR-146a fokozott expressziója egyedi a CNS-ben, válaszul a CPZ által kiváltott de- és remielinizációra. Ezért a miR-146a szintjét a fiziológias mielinizáció során is megvizsgáltuk. Nem találtunk változást a miR-146a expressziójában, ami azt jelzi, hogy a CPZ-expozícióra adott válasz megfigyelt növekedése a demielinizációs patológiával van összefüggésben.

A következő fázisban a összehasonlítottuk a CPZ expozíció szisztémás és központi idegrendszeri hatásait KO és WT egerek között. Ismeretes, hogy az egerek fogynak a CPZ-expozíció hatására, és nemrégiben felismertük, hogy a timusz atrófia a kettős pozitív timociták elvesztésével jár, mint a CPZ-expozíció további szisztémás hatása. Itt azt találtuk, hogy a CPZ egy másik immunszerv, a lép sorvadását is kiváltotta. Elképzelhető, hogy a CPZ elsődleges és másodlagos immunszervekre gyakorolt additív hatása hozzájárulhat az immunválaszok hiányához. Ezzel szemben megállapítottuk, hogy a miR-146a KO egerek védettek a CPZ ezen szisztémás hatásaival szemben, ugyanis a timusz és a lép atrófiája és a testtömeg-vesztés egyaránt csökkent a KO egerekben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a miRNS-146a részt vehet a toxikus válaszok és a mitokondriális diszfunkció szabályozásában, figyelembe véve a CPZ mitokondriális hatását. Ezenkívül a miR-146a a mitokondriális mRNS-eken potenciális célpontokkal rendelkező mitokondriális miRNS-ek egyike, és leginkább a mitokondriális diszfunkcióval, megváltozott hasadással és fúzióval rendelkező, öregedő sejtekben szabályozottabb.

A miR-146a KO egerekben megfigyelt léziók méretének csökkenését a Mac3+ és Iba+ makrofágok/mikroglia alacsonyabb száma, valamint a CNP+ mielinizáló oligodendrociták

nagyobb száma kísért a corpus callosumban a demielinizáció során. Vizsgálatunkban a miR-146a hiány nem volt hatással a remielinizációra, és nem befolyásolta az OPC-k számát a remielinizáció során. Mindazonáltal csökkentette a demielinizációt és az axonvesztést, valamint az oligodendrociták számának növekedését a demielinizáció során. Mivel a KO egerekben nem tapasztaltunk NG2+ OPC növekedést a demielinizáció alatt, a mielinizáló corpus callosumban a mielinizáló oligodendrociták magasabb száma az oligodendrociták túlélésének növekedését jelezheti. Érdekes módon az oligodendrocita prekursorok számának csökkenését figyeltük meg a KO egerekben a remielinizáció során, ami arra utalhat, hogy a miR-146a előnyös lehet a remielinizáció alatt. Ezek az adatok a miR-146a összetett szerepére utalhatnak a de- és remielinizációban, ha szöveti szinten vizsgáljuk.

Következő lépésben a CPZ-indukált de- és remielinizáció alatt nyert proteomadatbázisunkban validált célgének fehérjéit kerestük. Azt találtuk, hogy a demielinizáció során két fehérje downregulált: a SMAD4 és a SNAP25. Az SMAD4 részt vesz az OPC migrációban és differenciálódásban, a SNAP25 pedig fontos szerepet játszik a neuronok jelátvitelében és a neurotranszmitterek felszabadításában. Ezért megvizsgáltuk e két fehérje szintjét a de- és remielinizáció során a WT és miR-146a KO egerekből kimetszett corpus callosum lizátumokban. A SNAP25 koncentrációja a vártan megfelelően megnőtt a miR-146a KO egerekben. A SNAP25 downregulált a miR-146a KO egerekben a demielinizáció során, de nem különbözött a WT egerektől. Így az ELISA eredmények nem utaltak a SMAD4 és a SNAP25 eltérő szabályozására a KO egerekben a demielinizáció során.

A miR-146a az immunrendszer jól ismert negatív szabályozója. Azt találtuk, hogy a CCL2 upregulált a WT egerekben a CPZ-kezelés hatására. A miR-146a KO egerekben a demielinizáció során azonban szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszáldott párhuzamosan a Mac3+ sejtek számának csökkenésével. Ezenkívül azt találtuk, hogy a TNF-RI és a TNF-RII szintek megemelkedtek a WT egerekben, amit nem láthattunk a miR-146a KO egerekben. Korábbi adatok azt mutatták, hogy a TNF elősegítette a CPZ toxikus hatását az oligodendrocitákra *in vitro*, és *in vivo* indukálta a mikroglia kimerülését, amely a citokin és kemokin expresszió fő forrása az agyban. Ezért valószínű, hogy a TNF-RI, TNF-RII és CCL2 csökkenése a miR-146a KO egerekben hozzájárult a CPZ által kiváltott demielinizáció elleni védelemhez.

10 Összefoglalás

Ez a tanulmány átfogó képet ad a demielinizáció és a remielinizáció mögött meghúzódó molekuláris mechanizmusokról a CPZ egérmódelben, kiemelve a miRNS-ek és fehérjék szerepét a corpus callosumban. A miR-146a-KO egerek kiváló védelemmel rendelkeznek az immunszerv-károsodással, az axon sérüléssel és a demielinizációval szemben. Ez arra utal, hogy a miR-146a hozzájárul az immunrendszer szabályozásához és az oligodendrociták túléléséhez. Ezentúl a proteomika kimutatta, hogy a remielinizáció tisztább és határozottabb változásokkal jár, mint a demielinizáció, a mielin, a szinaptikus és a citoskeletonnal kapcsolatos fehérjék szintjének emelkedésével. Bár a miR-146a hiánya nem befolyásolta szignifikánsan magát a remielinizációt, a főbb gyulladási mediátorokat, köztük a CCL2 és a TNF receptorokat igen. Továbbiakban megfigyeltük az NG2+ OPC-k enyhe növekedését a remielinizáció során a KO egerekben, ami alátámaszthatja azokat a korábbi adatokat, amelyek a miR-146a jótékony szerepére utalnak a remielinizáció során. Ezenkívül számos demielinizációs fehérje nem volt része a tipikus demielinizációs útvonalaknak. Ez a szöveti átrendeződés, az asztrocita citokin szekretáló és a mikroglia-aktiváció szerepére utal. Összességében ezek az eredmények rávilágítanak az RNS-, fehérje- és funkcionális vizsgálatok kombinálásának fontosságára annak érdekében, hogy jobban megértsük, hogyan különbözik a demielinizáció és a remielinizáció molekuláris szinten. Továbbá, a miR-146a-hoz kapcsolódó útvonalakra való összpontosítás új kezelési megközelítéseket és diagnózist, kínálhat olyan betegségekben, mint az SM.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik hozzájárultak doktori munkám megvalósulásához, szakmai és emberi támogatásukkal végigkísérték utamat és hittek bennem.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Gallyas Ferencnek valamint Prof. Dr. Illés Zsoltnak. Folyamatos támogatásuk, értő útmutatásuk és nagy tapasztalatuk döntő szerepet játszott doktori kutatásom sikeres befejezésében. Őszintén hálás vagyok az időért, a türelemért és az elkötelezettségért, amit tanúsítottak irántam. Továbbá hálámat szeretném kifejezni Prof. Dr. Hársfalvi Jolánnak aki támogatásával és irányításával segítette első lépéseimet a tudományos munka területén.

Köszönettel tartozom Dr. Márk Lászlónak, Dr. Fekete Katalinnak, Schmidt Jánosnak, Dr. Erős Krisztiánnak †, Arkadiusz Nawrocki-nak, Dr. Pál Józsefnek, Dr. Nagy Veronikának, Dr. Veres Gábornak, Prof. Dr. Martin Røssel Larsen-nek és szerzőtársaimnak a közös munkáért, az együtt gondolkodásért és a mindennapok során nyújtott szakmai és emberi támogatásért.

Elismerésemet szeretném kifejezni a Pécsi Tudományegyetem Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolájának is. Nagyrabecsülésemet fejezem ki továbbá Prof. Dr. Sümegi Balázsnak † támogatásáért és nagylelkűségéért. Hihetetlenül hálás vagyok Hatem Okba-nak kedves barátomnak és irodatársamnak, rendíthetetlen barátságáért és mindennapi unszolásáért. Őszintén köszönöm Dr. Szabó Évának, Dr. Bóna Ágnesnek, Ömer Furkan Kaçar-nak, Dr. Hencz Alexandrának, Réti Miklós Máténak és Horváth Anitának, hogy hozzájárultak egy barátságos és inspiráló munkakörnyezet megteremtéséhez.

Köszönettel tartozom szerető családomnak. Az állandó támogatások és végtelen bátorítások volt a vezérfonal ezen az úton. Különösen hálás vagyok szüleimnek áldozatos munkájukért és a belém vetett rendíthetetlen hitükért, gyermekeimnek és társamnak Dr. Pusztai Viktóriának, hogy mindig velem voltatok. Ezt a dolgot nektek ajánlom minden hálámmal és szeretetemmel. Nélkületek ez nem lett volna lehetséges.

11 Publikációs lista

11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Szilágyi T Gábor, Arkadiusz M Nawrocki, Erős Krisztian, Schmidt János, Fekete Katalin, Maria L Elkjaer, Kirsten H Hyrlov, Martin R Larsen, Illés Zsolt, Gallyas Ferenc Jr. Proteomic changes during experimental de- and remyelination in the corpus callosum. PLOS ONE 15 : 4 Paper: e0230249, 21 p. (2020), **IF: 3.24**; Q1/D1

Nellie A Martin, Molnár Viktor, **Szilágyi T Gábor**, Maria L Elkjaer, Arkadiusz M Nawrocki, Justyna Okarmus, Agnieszka Wlodarczyk, Eva K Thygesen, Palkovits Miklós, Gallyas Ferenc Jr, Martin R Larsen, Hans Lassmann, Eirikur Benedikz, Trevor Owens, Asa F Svenningsen, Illés Zsolt. Experimental demyelination and axonal loss are reduced in MicroRNA-146a deficient mice. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 9 Paper: 490, 14 p. (2018), **IF: 4.716**; Q1

11.2 Egyéb közlemények

Szabó Éva, Marosvölgyi Tamás, **Szilágyi T Gábor**, Körösi László, Schmidt János, Csepregi Kristóf, Márk László, Bóna Ágnes. Correlations between Total Antioxidant Capacity, Polyphenol and Fatty Acid Content of Native Grape Seed and Pomace of Four Different Grape Varieties in Hungary. ANTIOXIDANTS 10: 7 Paper: 1101, 12 p. (2021), **IF: 7.675**; Q1

Hencz Alexandra Júlia, Magony Andor, Thomas Chloe, Kovács Krisztina, **Szilágyi T Gábor**, Pál József, Sik Attila. Mild hypoxia-induced structural and functional changes of the hippocampal network. FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE 17 Paper: 1277375, 14 p. (2023) **IF: 4.2**; Q2

Hencz Alexandra Júlia, Magony Andor, Thomas Chloe, Kovács Krisztina, **Szilágyi T Gábor**, Pál József, Sik Attila. Short-term hyperoxia-induced functional and morphological changes in rat hippocampus. FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE 18 Paper: 1376577, 13 p. (2024) **IF: 4.0**; Q1

11.3 Egyéb publikációk

Hencz Alexandra Júlia, **Szilágyi T Gábor**, Györfi Nina, Tenzlinger Kristóf, Széchenyi Alexander, Odry Ákos, Odry Péter, Karádi Zoltán, Vizvári Zoltán, Tóth Attila, Pál József.. Grafén és indium-ón-oxid elektródák összehasonlítása alacsony frekvenciás elektromos impedancia spektroszkópia mérésekkel. In: Tóth Attila; Vizvári Zoltán(szerk.) Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris, bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserezabályozás és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet pp. 115-123. Pécsi Tudományegyetem, Pécs. (2022)

11.4 Konferencia szereplések

Hencz Alexandra Júlia, Magony Andor, **Szilágyi T Gábor**, Pál József, Sik Attila The impact of hypoxia and hyperoxia on the number of compacted neurons and brain activity. International Neuroscience Conference (INC), Pécs. (2024).

Hencz Alexandra Júlia, **Szilágyi T Gábor**, Györfi Nina, Tenzlinger Kristóf, Széchenyi Alexander, Odry Ákos, Odry Péter, Karádi Zoltán, Vizvári Zoltán, Tóth Attila, Pál József. Comparative electrical impedance spectroscopy study of graphene and indium tin oxide electrodes during low frequency measurements. IEEE 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI) (2021).

Szilágyi T Gábor, Arkadiusz M Nawrocki, Schmidt János, Márk László, Illés Zsolt, Fekete Katalin, Martin R Larsen, Gallyas Ferenc Jr. Remielinizációs folyamatok proteomikai vizsgálata cuprizon modellben.V. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (IDK) Pécs (2016).

Szilágyi T Gábor, Arkadiusz M Nawrocki, Schmidt János, Gallyas Ferenc Jr, Illés Zsolt. Regulation of de- and remyelination in the central nervous system. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Szeged (2016)

Szilágyi T Gábor. Új molekuláris célpontok azonosítása cuprizon indukálta demielinizációs modellben. Tavaszi Szél Konferencia. Budapest (2016)

Szilágyi T Gábor, Schmidt János, Arkadiusz M Nawrocki, Illés Zsolt, Gallyas Ferenc Jr. Proteomic analysis of gene products that regulate de- and remyelination. IX Annual Congress of European Proteomics Association (EUPA) Milano. (2015).