

A centrális tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák szerepének vizsgálata a poszttraumás stressz zavar egér modelljében

dr. Konkoly János

Doktori értekezés

Témavezetők:

Prof. Dr. Pintér Erika egyetemi tanár

Dr. Gaszner Dr. Kormos Viktória egyetemi adjunktus

Gyógyszertudományok Doktori Iskola,

Neurofarmakológia Program vezetője:

Prof. Dr. Pintér Erika

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2023



TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR.....	- 5 -
1.1 A TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL ANKYRIN 1 (TRPA1) IONCSATORNA	- 5 -
1.1.1 A TRPA1 receptor szerkezete és agonistái	- 5 -
1.1.2 A TRPA1 receptor szerepe a periférián és a központi idegrendszerben...	- 6 -
1.2 AZ EWCP ÉS AZ UCN1 SZEREPE A STRESSZ ADAPTÁCIÓBAN	- 9 -
1.2.1 A stressz adaptációs válaszok szabályozása	- 9 -
1.2.2 Az urocortinok receptoriális hatása és szerepe a stressz válasz szabályozásában.....	- 11 -
1.2.3 Az Edinger-Westphal mag anatómiája és szerepe a stressz válasz szabályozásában.....	- 13 -
1.3 A POSZTTTRAUMÁS STRESSZ BETEGSÉG (PTSD)	- 17 -
1.3.1 A PTSD epidemiológiája és tünettana	- 17 -
1.3.2 A PTSD pathomechanizmusa	- 18 -
1.3.3 Terápiás lehetőségek a PTSD kezelésében	- 21 -
1.4 A SZAGLÓPÁLYA FELÉPÍTÉSE, KAPCSOLATAI ÉS ÉLETTANI JELENTŐSÉGE	- 22 -
1.4.1 A szaglópálya felépítése	- 22 -
1.4.2 A szagingerek által kiváltott veleszületett félelemválasz és szabályozása-	23
-	
2. HIPOTÉZIS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	- 25 -
2.1 A TRPA1 EXPRESSZIÓ FELTÉRKÉPEZÉSE ÉS KARAKTERIZÁLÁSA A SZAGLÓPÁLYA TERÜLETÉN.....	- 25 -
2.2 A TRPA1 SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A PREDÁTOR SZAG HATÁSÁRA KIALAKULÓ FÉLELEMVÁLASZBAN.....	- 25 -

2.3	A TRPA1 SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A PTSD KIALAKULÁSÁBAN	- 25 -
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	- 27 -
3.1	ÁLLATOK.....	- 27 -
3.2	KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS	- 27 -
3.2.1	A <i>Trpa1</i> mRNS expresszió vizsgálata egér szaglópálya területén	- 27 -
3.2.2	A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szaggal kiváltott félelemválaszban.....	- 28 -
3.2.3	A valeriánsav és a 2-MT TRPA1-aktiválóképességének vizsgálata.....	- 28 -
3.2.4	A TRPA1 szerepének vizsgálata PTSD egérmodellekben	- 28 -
3.3	PERFÚZIÓ ÉS MINTAGYŰJTÉS	- 29 -
3.4	RNASCOPE <i>IN SITU</i> HIBRIDIZÁCIÓ (ISH) IMMUNFLUORESZCENCIÁVAL KOMBINÁLVA ...	- 29 -
3.5	MIKROSKÓPIA, MORFOMETRIA	- 31 -
3.6	PREDÁTOR TESZTEK.....	- 32 -
3.7	RADIOIMMUN-ASSAY	- 33 -
3.8	A Ca^{2+} BEÁRAMLÁS MÉRÉSE ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL	- 33 -
3.9	SPS PTSD MODELL	- 34 -
3.10	ELEKTROSOKK PTSD MODELL	- 36 -
3.11	STATISZTIKAI ANALÍZIS	- 37 -
4.	EREDMÉNYEK	- 39 -
4.1	A <i>TRPA1</i> mRNS EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA EGÉR SZAGLÓPÁLYA TERÜLETÉN.....	- 39 -
4.2	A TRPA1 SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A PREDÁTOR SZAGGAL KIVÁLTOTT FÉLELEMVÁLASZBAN	- 41 -
4.3	A VALERIÁNSAV ÉS A 2-MT TRPA1-AKTIVÁLÓKÉPességÉNEK VIZSGÁLATA.....	- 44 -
4.4	A TRPA1 SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA PTSD EGÉRMODELLEKBEN	- 45 -

4.4.1	SPS modell.....	- 45 -
4.4.2	Elektrosokk PTSD modell	- 55 -
5.	DISZKUSSIÓ	- 64 -
6.	KONKLÚZIÓ, EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	- 74 -
7.	JÖVŐBENI TERVEK.....	- 75 -
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	- 76 -
9.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	- 94 -
10.	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK	- 98 -
11.	KONFERENCIA RÉSZVÉTELEK	- 99 -
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	- 101 -

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

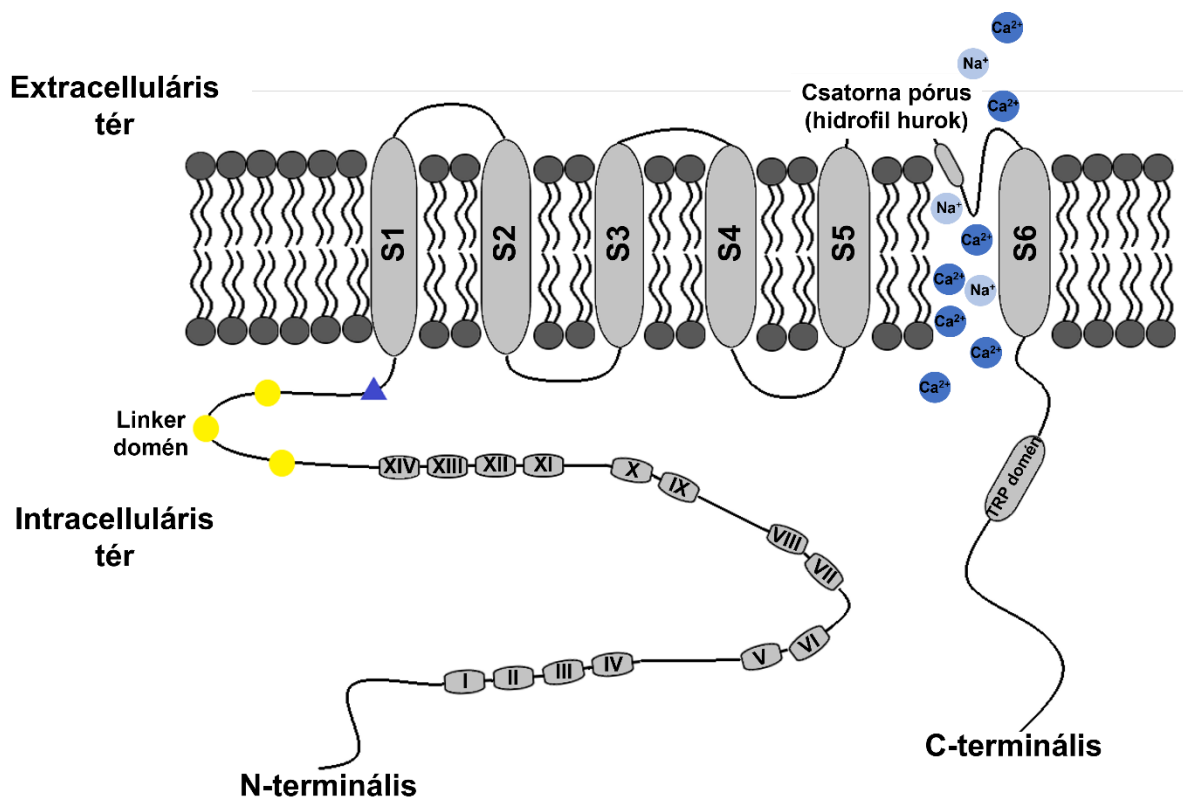
1.1 A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna

1.1.1 A TRPA1 receptor szerkezete és agonistái

A TRPA1 egy nem szelektív kationcsatorna, mely számos gerinces és gerinctelen állatfajban kifejeződik. Szerkezetét tekintve a TRPA1 receptor négy alegységből épül fel, melyek mindegyike 6 transzmembrán α -helikális szakaszt tartalmaz (S1-S6) (Logashina és mtsai. 2019; Meents és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020). Az S5 és S6-os szegmensek áthajlása között található hidrofil hurok alkotja a csatorna különböző kationokra (pl.: Ca^{2+} , Na^{+}) permeábilis pórusát, lehetővé téve az említett kationok beáramlását az extracelluláris térből a sejtek belsejébe (Logashina és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020). A TRP receptorok neve arra utal, hogy az S6 transzmembrán szegmens intracelluláris részén a sejtmembrán felszínével párhuzamosan egy úgynevezett TRP-szerű α -helikális szerkezetű domén helyezkedik el, mely az egyes alegységek összeszereléséhez, illetve a csatorna működésének szabályozásához járul hozzá. A TRPA1 receptorok az N-terminális citoplazmatikus rész közelében egy hosszabb (14-18 ismétlődésből felépülő) *ankyrin* domént is tartalmaznak, mely a közte és az első transzmembrán szegmens (S1) között elhelyezkedő linker doménnel közösen teszi lehetővé a receptor termo- és kemoszenzitivitását (Corey és mtsai. 2004; Logashina és mtsai. 2019). A receptor ezen régiójában található cisztein (Cys621, Cys641, Cys665) és lizin (Lys710) aminosav oldalláncok felelősek az agonistának tekinthető elektrofil ágensek megkötéséért, melyek végső soron az ioncsatorna megnyílását eredményezik (Hinman és mtsai. 2006; Deering-Rice és mtsai. 2011; Eberhardt és mtsai. 2012; Shapiro és mtsai. 2013; Logashina és mtsai. 2019; Meents és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020) (**1. ábra**).

Számos különböző szerkezetű vegyület képes a TRPA1 receptorokon agonistaként hatni, melyek az ioncsatorna megnyílásához és ezáltal fokozott befelé irányuló kalcium áramhoz vezetnek az érintett sejtekben. A TRPA1 agonisták egy jelentős csoportjának közös jellemzője az elektrofil szerkezet, mely révén a korábban részletezett cisztein aminosavakkal kovalens kötést képezve az elektrofil vegyületek a TRPA1 receptorok konformációváltozását és csatornanyitását idézik elő (Logashina és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020). Az exogén elektrofil TRPA1 agonisták közé tartoznak a csípős ételekben is megtalálható anyagok (pl.: mustárban az allil-izotiocianát, fokhagymában az allicin), illetve más szintén erősen irritáló hatású szerves vegyületek (akrolein, α,β -telítetlen aldehidek és karbonil vegyületek), míg az endogén aktivátorok közé sorolhatóak a proinflammatorikus mediátorok (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2, 9-nitro-olajsav, telítetlen zsírsavak), valamint az oxidatív stressz és a lipid

peroxidáció különböző termékei (Logashina és mtsai. 2019; Meents és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020). Ugyanakkor a TRPA1 agonisták másik jelentős csoportjához a nem-elektrofil szerkezetű típusosan lipofil tulajdonságú vegyületek tartoznak, melyek feltehetően TRPA1 receptornak egy a membránban található kötőhelyéhez kapcsolódva idéznek elő ioncsatorna aktivációt (Talavera és mtsai. 2020). Ilyen lipofil szerkezetű exogén TRPA1 agonisták a mentol, a karvakrol és a Δ^9 -tetrahydrocannabinol, míg a parakrin mediátorok (arachidonsav és dokozaheksénsav), illetve egyes endogén gáz transzmitterek (H_2S és NO) típusosan endogén eredetű nem-elektrofil ligandumoknak tekinthetők (Logashina és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020).



1. ábra: A tranziens receptor potenciál (TRP) ankyrin 1 ioncsatorna szerkezetének sematikus ábrázolása. S1-S6: 1-6 transzmembrán szegmens. (Meents és mtsai. alapján módosítva)

1.1.2 A TRPA1 receptor szerepe a periférián és a központi idegrendszerben

A TRPA1 receptorok aktiválását egyfelől meghatározott termális ingerek idézik elő, bár a hőhatás által kiváltott aktivációs küszöb fajonként jelentősen eltérhet (Logashina és mtsai. 2019), másfelől különböző szövetekben expresszálódva felmerül a lehetősége, hogy a TRPA1-nek szerepe lehet az exogén és endogén kémiai vegyületek által kiváltott fiziológiás és

patológiás folyamatokban is. A TRPA1 receptor fájdalomválasz kialakulásában betöltött szerepét bizonyítja, hogy az ioncsatornát érintő mutáció csecsemőknél a familiáris epizodikus fájdalom szindróma fellépéséhez vezet (Kremeyer és mtsai. 2010). TRPA1 receptorok találhatóak a hátsógyöki, valamint a *nervus trigeminus* ganglionokhoz tartozó polimodális nociceptív afferensek végződésein (Talavera és mtsai. 2020), így hozzájárulva a bizonyos kórképekhez (pl.: neuropátiás fájdalom) társuló fájdalom szignál, valamint gyulladáshoz és immunválaszok kialakulásához (Obata és mtsai. 2005; Eid és mtsai. 2008; Wei és mtsai. 2009; Koivisto és mtsai. 2012; Julius 2013; Pinheiro és mtsai. 2015; Moore és mtsai. 2018; de Araujo és mtsai. 2020). Korábbi állatkísérletes vizsgálatok igazolták továbbá, hogy a trigeminális nociceptorokon megtalálható TRPA1 receptoroknak szerepe lehet a gliceril-trinitrát által kiváltott, elsősorban a periorbitális régiót érintő, késői mechanikai *allodynia* kialakulásában, mely kóros érzéskvalitás bizonyítottan kivédhető TRPA1 antagonistá egyidejű alkalmazásával, illetve kialakulása elmarad *Trpa1* génhányos egerekben (Marone és mtsai. 2018). A trigeminális nociceptív végződéseken expresszáldó TRPA1-receptorok hozzájárulhatnak még egyes illékony, irritáló/averzív szagú anyagok észleléséhez is. Állatkísérletes vizsgálatok során egy a róka szagát imitáló vegyületet (2-metil-2-tiazolint; 2-MT) alkalmazva a receptor genetikai delécioja a *Trpa1* génhányos (*knockout*; KO) egerekben a veleszületett félelem válasz kialakulásának jelentős csökkenéséhez vezetett a vad típusú (WT) állatokhoz képest (Wang és mtsai. 2018). Ugyanezen tanulmányban elvégzett c-Fos immunhisztokémia során a 2-MT kisebb mértékű neuronális aktivációt váltott ki a *Trpa1* KO állatok trigeminális ganglionjaiban (TG), valamint bizonyos - elsősorban a stressz és félelem válasz kialakulásában szerepet játszó - agyi területeken (*amygdala* centrális magcsoportja (CeA), periaqueductális szürkeállomány (PAG) és *nucleus paraventricularis hypothalami* (PVN)), felvetve a receptor lehetséges jelentőségét a stressz válaszban.

Az irodalmi adatok ellentmondásosak a centrális lokalizációjú TRPA1 receptor expresszióját tekintve. Több tanulmány leírja a TRPA1 előfordulását különböző központi idegrendszeri területeken (hippokampusz (Shigetomi és mtsai. 2011; 2013; Tong és mtsai. 2013; Verkhratsky és mtsai. 2014; Bosson és mtsai. 2017), szomatoszenzoros kéreg (Kheradpezhough és mtsai. 2017; Jiang és mtsai. 2019), *cerebellum* (Hamilton és mtsai. 2016), *nucleus spinalis nervi trigemini* (Lee és mtsai. 2012)), azonban hangsúlyozni kell, hogy ezen vizsgálatok jelentős része immunhisztokémiai módszereken alapszik. Jelen tudásunk szerint ugyanakkor nincs forgalomban olyan antitest, mely kellően specifikus lenne a TRPA1-re, ezért ezek az eredmények nem megbízhatóak. Ezt erősíti meg, hogy kutatócsoportunk már több ilyen

kereskedelmi forgalomban lévő TRPA1 antitestet is tesztelt, továbbá kollaboráció keretében a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Immunológiai és Biotechnológiai Intézetével magunk is próbáltunk specifikus antitestet fejleszteni, idáig eredménytelenül. Ennek tükrében a TRPA1 kimutatására irányuló vizsgálatok eredményei közül azok tekinthetők megbízhatónak, melyeknél az ioncsatorna expresszióját a vizsgált agyterületen mRNA szinten igazolták, ezért a továbbiakban kizárólag ezeket az agyterületeket tárgyaljuk.

Munkacsoportunk a *Trpa1* mRNA központi idegrendszeri expresszióját RNAscope *in situ* hibridizációs (ISH) technikával vizsgálta egerekben, mely során legnagyobb kópiaszámban a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) urocortin 1 (UCN1) tartalmú neuronjain (Kormos és mtsai. 2022), míg kisebb mértékben a *nucleus raphe dorsalis* (DRN) glutamaterg idegsejtjein (Milicic és mtsai., közlés alatt), illetve igen alacsony kópiaszámban a hipotalamuszban tudtuk igazolni (Olah és mtsai. 2021). A fentiekén túl, a *Trpa1* mRNA EWcp/UCN1 neuronjain való expresszióját *post mortem* humán agymintákon elvégzett PCR és RNAscope ISH vizsgálatok is megerősítettek (Kormos és mtsai. 2022, Al-Omari és mtsai., közlés alatt). Ugyanakkor az mRNA szintű detektálás limitációjaként meg kell említeni, hogy annak kimutatása még nem minden esetben jelenti a TRPA1 fehérje szintű expresszióját, illetve egy esetleges fehérje transzláció során a képződött fehérje mennyisége egyrészt nem feltétlenül korrelál az mRNA expressziójának mértékével, másrészt mRNA alapú módszerek alkalmazásával önmagában nem állapítható meg, hogy a fehérje az axonális transzportfolyamatok során pontosan mely idegrendszeri területekhez juthat el.

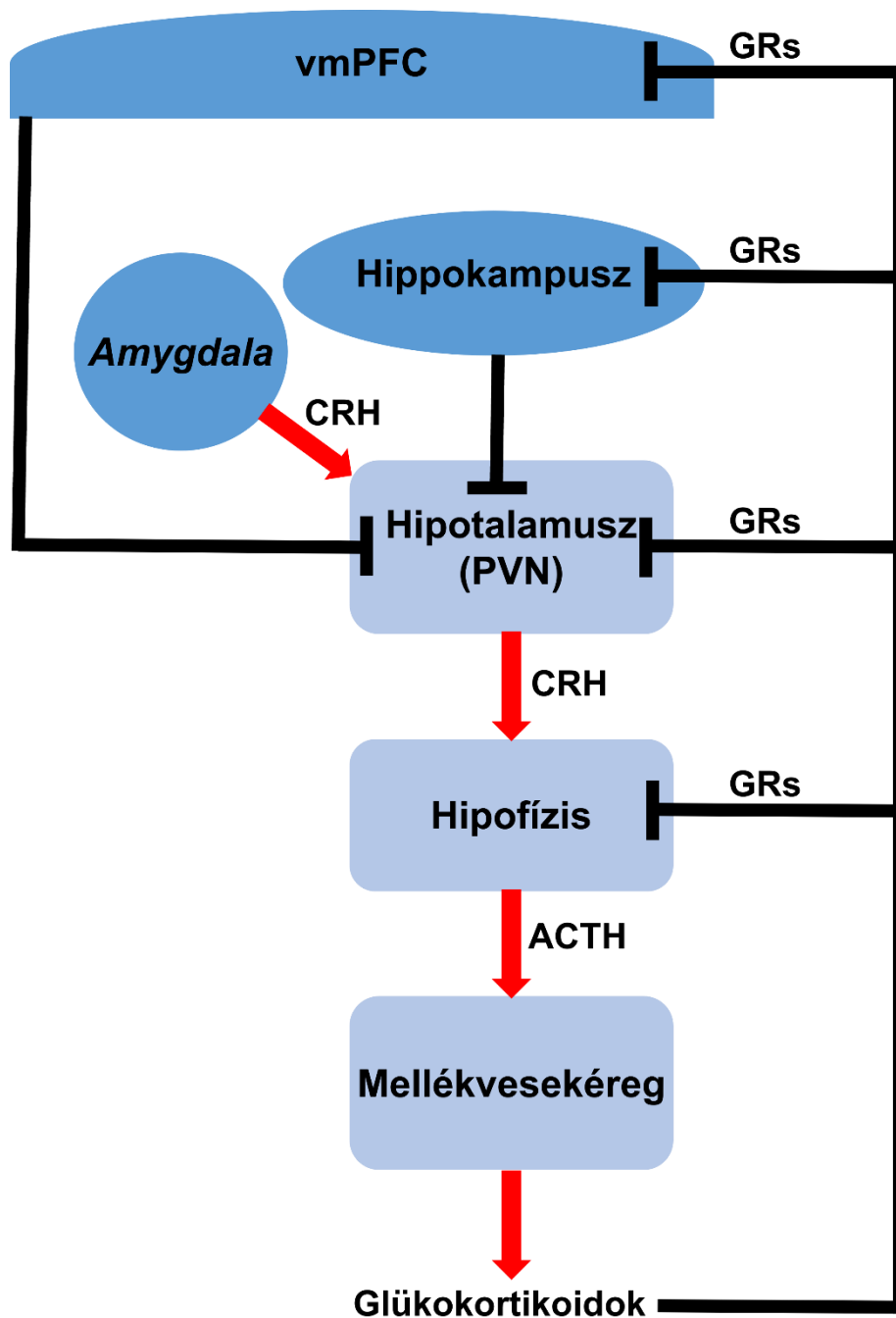
Bár a TRPA1 receptor fehérje szintű vizsgálata - specifikus antitest hiányában - jelenleg nem lehetséges, funkcionális aktivitását az EWcp urocortinerg sejtjein kutatócsoportunk elektrofiziológiai vizsgálatokkal bizonyította (Al-Omari és mtsai. 2023). Korábbi kísérleteink során kimutattuk továbbá, hogy a *Trpa1* génhíányos egerek stressz adaptációja eltér vad típusú társaikétól, illetve, hogy az EWcp/UCN1 neuronjain a *Trpa1* mRNA expressziója csökken mind a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) egér modelljében, mind pedig öngyilkos személyekből származó EWcp mintákban. Ez utóbbi megfigyelés felhívja a figyelmet az EWcp/UCN1 neuronjain expresszálódó TRPA1 ioncsatorna stressz adaptációban betöltött szerepének humán transzlációs relevanciájára (Kormos és mtsai. 2022).

1.2 Az EWcp és az UCN1 szerepe a stressz adaptációban

1.2.1 A stressz adaptációs válaszok szabályozása

A Selye János és Walter Cannon munkáján alapuló stresszelmélet szerint a szervezetet érő fiziológiai, illetve pszichológiai stresszorok neuroendokrin változásokat idéznek elő, melyek fő célja a stresszre adott adaptív válaszreakciók kialakítása. Ennek első lépése a Cannon-féle vészreakció, mely során a szimpatikus végződésekből, valamint a mellékvesevelőből mobilizált katekolaminok vegetatív változásokat (növekvő vércukorszint, pulzus- és vérnyomásemelkedés, fokozott vérátáramlás a vázizmok területén, fokozódó éberség, félelem fellépése stb.) létrehozva felkészítik a szervezetet a stresszel való megküzdésre („küzdj vagy menekülj”) (Adams és Hempelmann 1991).

Ezzel egyidejűleg megkezdődik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely aktivációja is, melynek első lépése a hipotalamusz PVN magjából történő kortikotropin *releasing* hormon (CRH) elválasztása, ami a portális keringés közvetítésével éri el az adenohipofízis kortikotrop sejtjeit. Ezt követően a CRH a kortikotrop sejteken található receptorok (kortikotropin *releasing* hormon receptor 1; CRHR1) stimulálása révén fokozza a pro-opiomelanokortin peptid szintézisét, melyből poszttranszlációs hasítás során szabadul fel - egyéb peptid jellegű hormonok mellett - az adrenokortikotrop hormon (ACTH). Az ACTH a szisztémás keringéssel éri el a mellékvesekéreg *zona fasciculata* rétegét, ahol a melanokortin-receptor 2 aktiválása révén serkenti a mellékvesekéreg szteroidhormon bioszintézisét, így fokozva a keringésben a glükokortikoid szintet. A glükokortikoidok ezt követően különböző célszerveken hatva segítik elő a stresszhelyzethez való adaptációt (diabetogén hatás, fokozott metabolizmus, kognitív funkciók befolyásolása stb.), illetve negatív visszacsatolással fékezik a HPA tengely további aktivációját, így megelőzve a túlzott stresszválasz kialakulását (Adams és Hempelmann 1991; Smith és Vale 2006) (**2. ábra**).



2. ábra: A hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely szabályozásának sematikus ábrázolása. A piros nyilak stimuláló, míg a fekete vonalak gátló hatást jeleznek. vmPFC: ventromediális prefrontális kéreg, PVN: *nucleus paraventricularis hypothalami* GRs: glükokortikoid receptorok, CRH: kortikotropin *releasing* hormon, ACTH: adrenokortikotrop hormon.

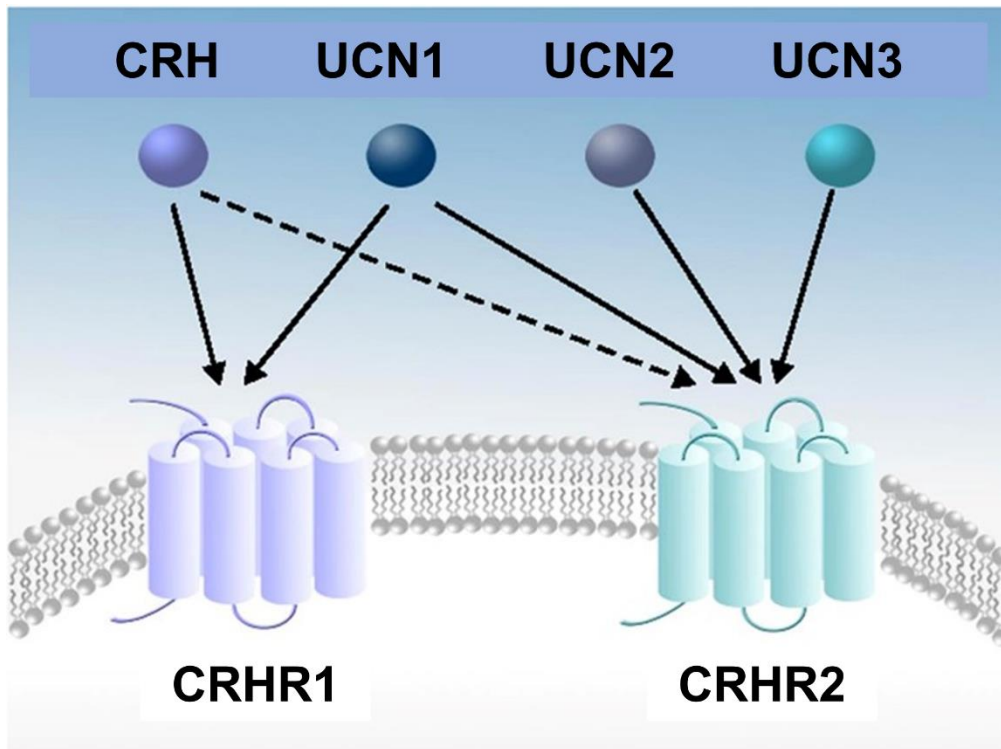
A HPA tengely mellett számos további idegrendszeri struktúra is hozzájárul a stressz adaptációs válaszok szabályozásához, ideértve bizonyos agytörzsi katekolaminerg magokat, limbikus struktúrákat, a paraszimpatikus idegrendszert, illetve a fent említett szimpató-adrenomedulláris rendszert (Smith és Vale 2006). Az agytörzsi magok közül a *nucleus tractus solitarii*

katekolaminerg (adrenalin és noradrenalin tartalmú) neuroncsoportjai viscerális (hasi és mellkasi), valamint limbikus (prefrontális kéreg (PFC), CeA) területekről kapnak innervációt (Smith és Vale 2006), és a PVN irányába projiciálva a CRH szekréció fokozásával facilitálják a HPA tengely működését (Plotsky 1987; Plotsky és mtsai.1989). Másfelől a szintén agytörzsi lokalizációjú *locus coeruleus* (LC) területén található noradrenerg neuronok a HPA tengelyre hatva fokozott ACTH szekréciót, illetve számos stressz-függő fiziológiai és viselkedési változást (félelem, csökkent immunfunkciók stb.) okozhatnak (Plotsky és mtsai. 1989; Rassnick és mtsai. 1994). További agytörzsi struktúra a - többféle neuropeptidet expresszáló - centrális projekciójú Edinger-Westphal mag, melynek urocortin 1 tartalmú rostjai a PVN neuronjain végződve szabályozzák a HPA működését (Dos Santos Júnior és mtsai. 2015; Zuniga és Ryabinin 2020). A limbikus rendszer területei közül főként az *amygdala*, a PFC, illetve a hippokampusz van hatással a stressz adaptációra (Smith és Vale 2006). Ezen struktúrák irányából származnak ugyan korlátozott számban projekciók, melyek közvetlenül a PVN hipofiziotrop neuronjain végződnek, azonban a HPA tengely aktivitását feltehetően inkább a BNST, a hipotalamusz, valamint az agytörzsi területén lévő intermedier neuronok közvetítésével képesek befolyásolni (Herman és mtsai. 2004; 2005). Az *amygdala* mediális és centrális magcsoportjai (MeA, CeA) emocionális/pszichológiai (predátor jelenléte, *restraint* stressz) és fiziológiai stresszorok (vérzés, túlzott immunválasz) hatására képesek aktiválni a HPA tengelyt, így fokozva a keringő glükokortikoid szintet a szisztémás keringésben, míg a glükokortikoidok a CeA területén található receptoraik révén képesek növelni a CRH szekréciót, ezáltal fokozva a krónikus stresszre adott autonóm válaszokat (Smith és Vale 2006). Ezzel szemben a hippokampusz és a PFC egyes területei a – jellegzetesen pszichológiai stresszorok által kiváltott – HPA tengely aktivációt képesek (részben a glükokortikoidok negatív *feedback* hatásának közvetítésével) mérsékelni, így csökkentve az ACTH, valamint a glükokortikoidok szekrécióját (Smith és Vale 2006).

1.2.2 Az urocortinok receptorális hatása és szerepe a stressz válasz szabályozásában

A stresszhatásra termelődő CRH-nak a HPA tengely szabályozásában betöltött szerepe már régóta ismert. A CRH család később felfedezett tagjai az urocortinok (UCN1, 2 és 3), melyek szintén hozzájárulnak a stressz adaptációhoz (Vaughan és mtsai. 1995; Hsu és Hsueh 2001; Gaszner és mtsai. 2004). Az UCN1 az agyban legnagyobb mennyiségben az EWcp urocortinerg sejtjeiben szintetizálódik, mely neuronok rostokat küldenek a hipotalamusz bizonyos

magcsoportjaihoz (PVN, *nucleus supraopticus* (SON), laterális hipotalamusz (LH)), valamint különböző limbikus (PFC, BNST, *amygdala*) és agytörzsi (DRN) struktúrákhoz, így szabályozva többek között a stressz adaptációt, hőháztartást, táplálékfelvételt, illetve a hangulatot (Fekete és Zorrilla 2007; Zuniga és Ryabinin 2020). Az EWcp-n kívül UCN1-et tartalmazó neuronok találhatóak még a SON, a LH, illetve a *nucleus olivaris superior* (SOC) területén is (Fekete és Zorrilla 2007; Fox és Lowry 2013). Az UCN2-t termelő neuronokat főleg a hipotalamusz magjaiban (PVN, SON, *nucleus arcuatus*), illetve az agytörzsi DRN neuronjaiban sikerült igazolni, míg az UCN3 tartalmú sejtek a dorzomediális *amygdala* területén, illetve a hipotalamusz azon részén találhatóak, melyet laterálisan a *fornix*, mediálisan a PVN, rostrálisan pedig a BNST hátulsó része határol, bár az UCN1-el szemben, ezen neuropeptidok projekciói még kevésbé ismertek (Fekete és Zorrilla 2007; Fox és Lowry 2013). A CRH család tagjainak hatását a CRH receptorok (CRHR) közvetítik, melynek 1-es (CRHR1) és 2-es (CRHR2) altípusát azonosították (Hsu és Hsueh 2001; Bale és mtsai. 2002, Bale, Lee és Vale 2002;). Az UCN1 mindkét CRHR izoformához képes kötődni, kiváltva azok aktivációját, azonban a CRHR2 altípushoz mintegy 40-szer nagyobb kötődési affinitást mutat a CRH-hoz képest (Bale és mtsai. 2002; Bale, Lee és Vale 2002; Kozicz 2007; Im és mtsai. 2015). Ezzel szemben az UCN2 és UCN3 peptidok a CRHR2 szelektív agonistáinak tekinthetők (Kozicz 2007), mely adatok alapján felmerül a lehetősége, hogy az UCN peptidok a CRHR2 legjelentősebb endogén ligandumai (Vaughan és mtsai. 1995; Bale és mtsai. 2002; Bale, Lee és Vale 2002; Deussing és Chen 2018) (**3. ábra**).



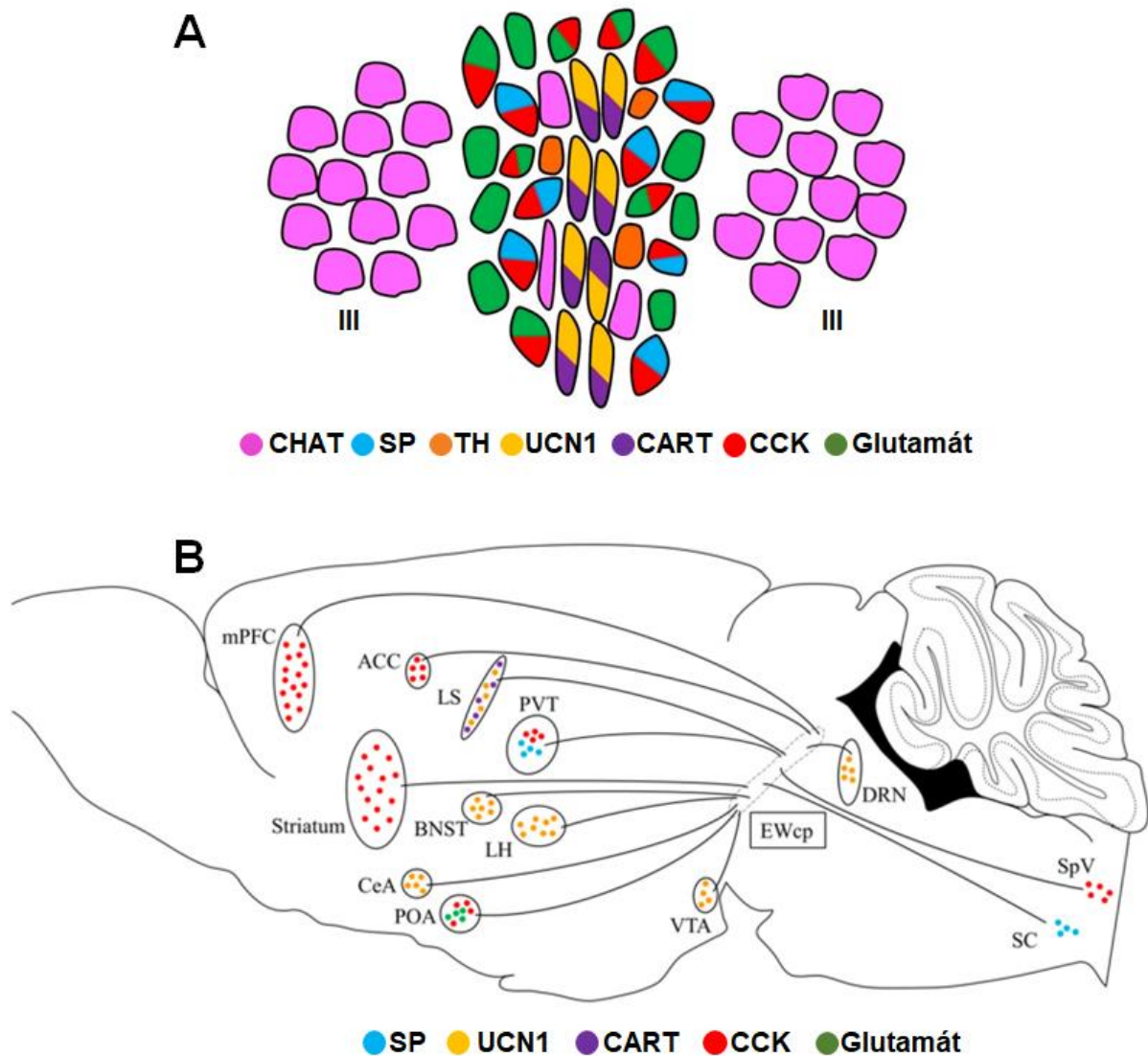
3. ábra: Az urocortin (UCN1, 2 és 3) peptidek affinitása a receptoraikhoz. CRHR1/CRHR2: kortikotropin *releasing* hormon receptor 1-es és 2-es altípusa (Im és mtsai. 2015 alapján módosítva).

Szakirodalmi adatok szerint a CRHR két altípusa egymással ellentétes hatásokat közvetít: míg a CRHR1 aktivációja szorongáskeltő (anxiogén) hatású, addig a CRHR2-n keresztül elsősorban szorongásoldó (anxiolitikus) hatások érvényesülnek (Bale és mtsai. 2000; Bale, Lee és Vale 2002; Gaszner és mtsai. 2004). A fentiek alapján feltételezhető, hogy míg Cannon-féle vészreakció során bekövetkező szimpatoadrenomedulláris katekolamin mobilizálás, és az azt követő, CRH által kiváltott, CRHR1-mediált HPA tengely aktiváció elsősorban a stresszre adott akut adaptív (küzdj vagy menekülj) válaszok kialakulásában játszik szerepet, addig az UCN peptidek által közvetített, főként CRHR2-függő reakciók a stressz adaptáció késői fázisában a normális homeosztázis helyreállításához és a stresszválasz megszűnéséhez járulhatnak hozzá (Adams és Hempelmann 1991; Hsu és Hsueh 2001; Gaszner, és mtsai. 2004).

1.2.3 Az Edinger-Westphal mag anatómiája és szerepe a stressz válasz szabályozásában

Az Edinger-Westphal mag (EW) a középagy területén található kompakt agyi struktúra, melynek széles körben ismert funkciója, hogy a *nervus oculomotorius* paraszimpatikus

autonóm rostjait biztosítva szabályozza a pupilla fényreflex reakcióját, valamint az akkomodációt (Westphal 1887; Burde és mtsai. 1989; Sonne és Lopez-Ojeda 2022; Hogan és mtsai. 2022). Ugyanakkor kevésbé ismert tény, hogy az EW strukturális és funkcionális szempontból is két részre osztható. A kolin-acetil-transzferáz (CHAT) enzimet expresszáló sejtpopuláció képezi a mag preganglionáris részét (EWpg), ami a perifériára vetül, és a III. agyideg kolinerg beidegzését adva biztosítja annak fent említett paraszimpatikus autonóm funkcióit (May és mtsai. 2008; Kozicz és mtsai. 2011; Zuniga és Ryabinin 2020; Hogan és mtsai.2022; Sonne és Lopez-Ojeda 2022). Másik része az úgynevezett centrális-projekciójú divízió (EWcp), mely elsősorban peptiderg neuronokat tartalmaz, és központi idegrendszeri területekre vetül. Ezen sejtcsoport közös jellemzője, hogy neuropeptideket (kolecisztokinin, P-anyag, UCN1, kokain- és amfetamin-regulált transzkript (CART)) termelnek, és többségük jellemzően nem expresszálja a CHAT enzimet (May és mtsai. 2008; Kozicz és mtsai. 2011; Zuniga és Ryabinin 2020) (**4. ábra**).



4. ábra: Az Edinger-Westphal mag (EW) területén található neuronok típusai (A). A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) kapcsolatai más agyterületekkel. CHAT: kolin-acetil-transzferáz, SP: P-anyag, TH: tirozin-hidroxiláz, UCN1: urocortin 1, CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript, CCK: kolecisztokinin, mPFC: mediális prefrontális kéreg, ACC: anterior *cingularis* kéreg, CeA: *amygdala* centrális magcsoportja, BNST: *nucleus interstitialis striae terminalis*, DRN: *nucleus raphe dorsalis*, LH: laterális hipotalamusz, LS: *septum laterale*, POA: *area praeoptica*; PVT: a talamusz paraventriculáris magja, SC: gerincvelő, SpV: *nuclei trigemini*, VTA: *area tegmentalis ventralis* (Zuniga és Ryabinin 2020 alapján módosítva).

Az egér, patkány, illetve egyéb emlősök EWcp/UCN1 neuronjai hozzájárulnak a HPA tengely szabályozásához (Gaszner és mtsai. 2004; 2007; Kozicz és mtsai. 2008; Kormos és mtsai. 2022), ezáltal szerepet játszanak a stresszadaptációban (Kozicz 2007). Az EWcp urocortinerg sejtjei akut stressz (akut fájdalom, *restraint*) hatására aktiválódnak (Weninger és mtsai. 2000; Kozicz és mtsai. 2001), ugyanakkor szemben a hipofiziotrop PVN neuronokkal - melyek egy

azonnali (30 percen belüli), ám rövid idejű (néhány óráig tartó) aktivációt mutatnak (Viau és Sawchenko 2002) - az EWcp/UCN1 neuronoknál a stressz-függő válaszok lassabban kezdődnek (1-2 óra) és jóval elnyújtottabb (18-24 óra) az időbeli lefolyásuk (Weninger és mtsai. 2000; Kozicz, és mtsai. 2001; Kozicz 2007). További lényeges különbség, hogy míg a HPA tengely aktivációja ismételt stressz esetén egyre csökkenő stressz-függő választ mutat (Viau és Sawchenko 2002), addig az EWcp urocortinerg sejtjeinél ehhez hasonló habituációs válasz nem detektálható (Korosi és mtsai. 2005). Ezen eredmények alapján egyrészt felmerül, hogy a HPA tengely, valamint az EWcp/UCN1 neuronok által szabályozott mechanizmusok két különálló, azonban egymással szoros funkcionális kapcsolatban lévő rendszert képviselnek, melyek az akut stresszorok fellépése során összehangoltan válaszolnak, míg krónikus stresszre eltérően reagálnak, így biztosítva együttes működésükkel az adekvát stresszadaptációt, beleértve a stressz válasz megfelelő leállítását is (Kozicz 2007). Az UCN1 ugyan közvetlenül is hozzájárulhat a HPA tengely szabályozásához, azonban ezen hatását csak krónikus/ismételt stresszor alkalmazása során sikerült igazolni, akut esetekben a HPA tengelyre közvetlenül kifejtett jelentős szabályozó hatás nem volt kimutatható (Kozicz és mtsai. 2011). Másrészt figyelembe véve az EWcp/UCN1 neuronok stressz-függő aktivációjának elnyújtottabb dinamikáját felvetődik, hogy ezen sejtek akut stresszre adott tartós válasza elősegíti a hosszútávú adaptációt az újonnan fellépő stressz esetén (Gaszner és mtsai. 2004). További érdekes megfigyelés, hogy az alkalmazott akut stresszor típusától függően, az EWcp/UCN1 neuronjai eltérő mértékű aktivációt mutatnak, mely alapján feltételezhető, hogy az érintett agyterületek stressztípus-specifikus útvonalakat használva teszik lehetővé a stresszor kategorizálását (Gaszner és mtsai. 2004). A fentiek alapján nem meglepő, hogy az elmúlt években egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az EWcp urocortinerg neuronjainak a stressz-függő maladaptív zavarok (pl.: szorongás, depresszió, kábítószer abúzus) kialakulásában (Kozicz 2007; Kozicz és mtsai. 2011; Hupalo és mtsai. 2019; Zuniga és Ryabinin 2020; Kormos és mtsai. 2022; Ujvári és mtsai. 2022). Munkacsoportunk évek óta foglalkozik az EWcp stressz adaptációban, valamint hangulat szabályozásban betöltött szerepével (Kozicz és mtsai. 2001; Gaszner és Kozicz 2003; Gaszner és mtsai. 2004; Gaszner és mtsai. 2007; Rouwette és mtsai. 2011; Gaszner és mtsai. 2012; Kormos és Gaszner 2013; Kormos és mtsai. 2022; Ujvári és mtsai. 2022). Korábbi kísérleteink során a krónikus stressz egér modelljében, valamint öngyilkos személyekből származó humán mintákban a *Trpa1* mRNS expresszió csökkenését detektáltuk az EWcp/UCN1 neuronjaiban (Kormos és mtsai. 2022). Ez a megfigyelés a továbbiakban felveti, hogy az UCN1 neuronokon expresszálandó TRPA1 receptorok

hozzájárulhatnak az urocortinerg sejtek stressz adaptációban betöltött szerepéhez, és ezáltal érintettek lehetnek bizonyos stressz-függő maladaptív zavarok pathomechanizmusában.

Az EWcp peptiderg neuronjai - a fentiekben részletezett, stressz válaszban játszott szerepükön túl - még számos más élettani/kórélettani folyamathoz járulhatnak hozzá, ideértve a táplálékfelvételt, a hőszabályozást, az addikciót, valamint a hangulatszabályozást (Fekete és Zorrilla 2007; Valentino és mtsai. 2010; Kozicz és mtsai. 2011; Fox és Lowry 2013; Schreiber és Gilpin 2018; Hupalo és mtsai. 2019; Zuniga és Ryabinin 2020; Ong és McNally 2020; Al-Omari és mtsai. 2023).

1.3 A poszttraumás stressz betegség (PTSD)

1.3.1 A PTSD epidemiológiája és tünettana

A PTSD a stressz adaptációs zavarok közé tartozó kórkép, mely intenzív érzelmi/fizika trauma (pl.: baleset, gyermekkori abúzus, szexuális erőszak, háborús trauma) hatására alakul ki. Epidemiológiai felmérések szerint az Amerikai Egyesült Államok és a nyugat-európai országok felnőtt népességének kb. 90%-a él át élete során legalább egy alkalommal súlyos mértékű traumatikus élményt. A betegség teljes élettartamra vonatkoztatott prevalenciája 1-9% (Schrader és Ross 2021; Oakley és mtsai. 2021; Maercker és mtsai. 2022). A kórkép gyakoriságának pontos megállapítását nehezíti, hogy jelentős eltérések mutatkoznak a különböző munkakörökben dolgozó személyek, bizonyos társadalmi és kulturális csoportok tagjai, illetve az egyes nemzetek állampolgárai között (Oakley és mtsai. 2021; Maercker és mtsai. 2022). A PTSD nagyjából kétszer gyakrabban fordul elő nőknél (Christiansen és Berke 2020), valamint olyan közösségek tagjainál, akik életveszélyes eseményt éltek át (pl.: háborús veteránok, természeti katasztrófák túlélői, politikai elítéltek) vagy rossz közbiztonsággal rendelkező országokból származnak (pl.: Kenya, Nigéria) (Schrader és Ross 2021; Oakley és mtsai. 2021; Maercker és mtsai. 2022). A kórkép élettartam prevalenciája jóval magasabb és kimenetele sokkal kedvezőtlenebb azon személyek esetén, akik gyermekkorukban erőszakos bűncselekmény áldozatai voltak (Schrader és Ross 2021; Maercker és mtsai. 2022). A kiváltó trauma tartós fennállása, illetve annak esetleges ismétlődése vagy kontrollálhatatlan kimenetele szintén jelentősen növeli a kórkép kialakulásának valószínűségét (Oakley és mtsai. 2021).

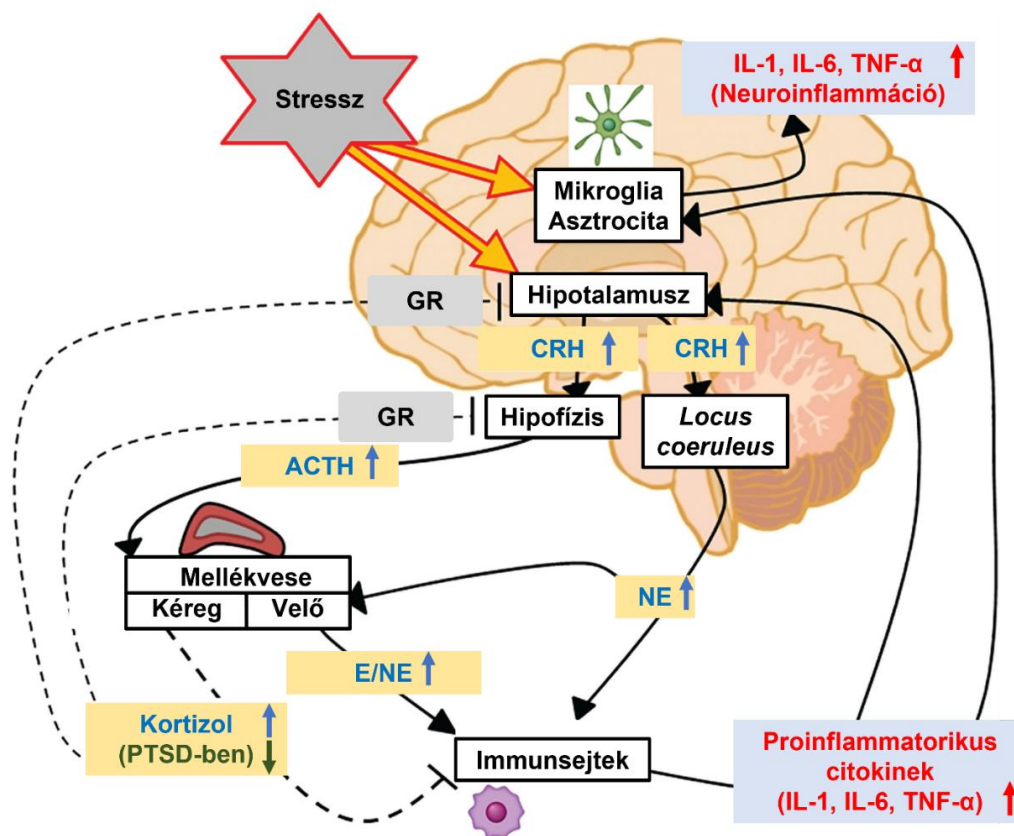
A betegségre jellemző a traumatikus élményre emlékeztető kulcsinger által kiváltott, epizodikusan visszatérő súlyos szorongás és pszichomotoros nyugtalanság (*hyperarousal*), a trauma emlékképeinek éber állapotban (spontán *flashback*, illetve intruzív emlékképek) vagy

rémálmok formájában történő ismételt átélése, valamint az ehhez kapcsolódó elkerülő viselkedés. Súlyos esetekben a beteg hangulatát és kognitív viselkedését érintő negatív változások az érintett személy szociális deprivációjához, munkahelyi, valamint magánéleti problémák fellépéséhez vezetnek (Auxéméry 2018).

1.3.2 A PTSD pathomechanizmusa

Az PTSD pathogenezisében szerepet játszó, egyik legrészletesebben vizsgált neurobiológiai mechanizmus a neuroinflammáció, mely kialakulásához a túlzott mértékű vagy krónikusan fennálló stressz járulhat hozzá (Hori és Kim 2019) (**5. ábra**). Ezen krónikus stressz által előidézett immunológiai és gyulladásos válaszokat támasztják alá a kórkép tanulmányozására használt állatkísérletes modellek is (Powell és mtsai. 2009; Wei és mtsai. 2012). A stressz hatás egyrészt a PVN fokozott CRH termelése miatt bekövetkező szimpatikus idegrendszeri (SNS) aktiváció és következményes katekolamin mobilizálás révén képes - közvetett úton - fokozni az immunsejtek proinflammatorikus citokin (interleukin 1 (IL-1); interleukin 6 (IL-6) és tumor nekrozis faktor- α (TNF- α)) termelését (Bierhaus és mtsai. 2003; Tan és mtsai. 2007). Másrészt stressz hatására a központi idegrendszer gliasejtjei (mikroglia, asztroglia) közvetlenül is képesek termelni a fent említett citokineket, így hozzájárulva a neuroinflammáció kialakulásához (Hori és Kim 2019). Lényeges továbbá, hogy az IL-1, IL-6 és TNF- α szint emelkedés a CRH szekréció fokozásával szerepet játszik a stressz válasz fenntartásában (Hori és Kim 2019). A PTSD-re jellemző - stressz válasszal összefüggésben álló - proinflammatorikus állapot a HPA tengely, illetve a szimpatoadrenomedulláris rendszer megváltozott működésével járhat együtt (Hori és Kim 2019). Ennek során karakterisztikus eltérésnek tekinthető a HPA tengely csökkent és az SNS fokozott működése (Daskalakis és mtsai. 2016; Hendrickson és mtsai. 2016), vagyis az emelkedett CRH és citokin szintek, valamint a megnövekedett szimpatoadrenomedulláris katekolamin mobilizáció jellemzően csökkent glükokortikoid szintekkel járnak együtt (Hori és Kim 2019). Ezek egyfelől a neuroinflammáció kialakulásában és fenntartásában (CRH, IL-1, IL-6 és TNF- α), illetve a PTSD-re jellemző vegetatív tünetek és hipervigilancia (adrenalin, noradrenalin) létrejöttében játszhatnak szerepet (Hori és Kim 2019). Másfelől tekintettel a glükokortikoidok gyulladásos válaszokra kifejtett gátló hatására, a PTSD-re jellemző alacsony kortizol szint szintén hozzájárulhat a betegségben megfigyelhető neuroinflammáció felerősödéséhez, és így a tünetek progressziójához. Ezt bizonyítják korábbi tanulmányok eredményei is, melyek szerint az alacsony kortizol szint fokozza a PTSD kialakulásának rizikóját traumás események átélését

követően (Yehuda és mtsai. 1998; 2000). A neuroinflammáció során felszabaduló IL-1, IL-6 és TNF- α ugyanakkor a proinflammatorikus állapot kialakítása, és stressz válasz fenntartása mellett - a központi idegrendszerre kifejtett morfológiai és funkcionális hatásaik révén - befolyásolhatják a neurogenesis, a szinaptikus plaszticitás, valamint a memória és tanulási folyamatokat is (Levin és mtsai. 2017). Irodalmi adatok szerint a fent említett citokinek által előidézett neuroinflammáció az *amygdala* túlműködését eredményezi, így gátolva a PTSD-re jellemző abnormális félelemválasz kioltását (Inagaki és mtsai. 2011; Yu és mtsai. 2017; Young és mtsai. 2018). Ezzel szemben a glükokortikoidok megváltoztathatják az *amygdala* félelmet kiváltó ingerekre adott válaszait, így hozzájárulva az averzív emlékek és a fokozott félelemválasz kioltásához (Henckens és mtsai. 2010; de Quervain és mtsai. 2017). Ezen eredmények további bizonyítékot nyújtanak azon feltételezéshez, mely szerint a PTSD során kialakuló neuroinflammáció és alacsony kortizol szint együttesen vezetnek a betegség tünettanáinak kialakulásához.



5. ábra: A stressz hatására kialakuló neuroinflammáció során felszabaduló citokinek (interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor nekrosis faktor- α (TNF- α)), és a kapcsolódó neuroendokrin változások. CRH: kortikotropin *releasing* hormon, ACTH: adrenokortikotrop hormon, E: adrenalin, NE: noradrenalin, GR: glükokortikoid receptor, PTSD: poszttraumás stressz betegség (Hori és Kim 2019 alapján módosítva).

A kórkép kialakulásában szerepet játszó további lényeges neurobiológiai tényező az oxidatív stressz. Ennek létrejöttéhez egyrészt a proinflammatorikus állapot során aktivált gliasejtek járulhatnak hozzá, másrészt a mikroglia és asztrocita eredetű reaktív szabadgyökök maguk is képesek gliasejttaktivációt kiváltani, így erősítve a neuroinflammáció folyamatát (Miller és mtsai. 2015; Oroian és mtsai. 2021). Ezt támasztják alá korábbi közlemények eredményei is, melyek szerint az oxidatív stressz során felszaporodó reaktív szabad gyökök - ideértve egyes prostanoidokat és lipidperoxidációs termékeket is - szerepet játszhatnak a PTSD pathomechanizmusában (Ozdemir és mtsai. 2012; Aschbacher és mtsai. 2013; Bulut és mtsai. 2013; Miller és mtsai. 2015; Atli és mtsai. 2016; Miller és mtsai. 2018).

Morfológiai szempontból a PTSD kialakulása során érintett legfontosabb agyterületek a mediális prefrontális kéreg (mPFC - anterior *cingularis* kéreg (ACC) és ventromediális prefrontális kéreg (vmPFC)), az *amygdala* bazolaterális (BLA) és centrális (CeA) magcsoportjai, valamint a limbikus területek közül a hippokampusz (Ammon-szarv (CA) és *gyrus dentatus* (DG)) illetve a *nucleus interstitialis striae terminalis* (BNST) (Miller és mtsai. 2018; Harnett és mtsai. 2020; Kamiya és Abe 2020). Korábbi neuromorfológiai vizsgálatok a hippokampusz CA és DG területeinek térfogatcsökkenését írták le, ami tinédzserekben és felnőttekben egyaránt negatív korrelációt mutatott a PTSD-re jellemző intruzív tünetek megjelenésével (Kitayama és mtsai. 2005; Smith 2005; Wang és mtsai. 2010; Postel és mtsai. 2019). A félelemválasz kialakulásában és kioltásában kulcsszerepet betöltő BLA, valamint az innen afferenseket kapó, és a félelemre adott pszichológiai és viselkedési válaszok kialakításáért felelős CeA területein megváltozott neuronális aktivitást, illetve térfogatokat írtak le PTSD-s betegeknél funkcionális MRI, valamint MRI volumetriai vizsgálatok során (Kamiya és Abe 2020). Az *amygdala* magcsoportjain kívül a ACC és vmPFC szintén hozzájárul a félelemválasz szabályozásához és ezáltal a PTSD-ben fellépő tünetek kialakulásához, amit a volumetriás és funkcionális képalkotó vizsgálatok során a mPFC területén detektálható térfogatcsökkenés, illetve megváltozott funkcionális aktivitás is megerősített (Karl és mtsai. 2006; Bromis és mtsai. 2018; Kamiya és Abe 2020). A fent ismertetett neuromorfológiai változások felvetik ugyan ezen agyterületek szerepét a betegség pathomechanizmusában, azonban a PTSD-re jellemző pszichopatológiai/neurobiológiai folyamatokkal való kapcsolatukat még mindig nem ismerjük teljes egészében, ami indokoltá teszi további - a kórkép kialakulásának kutatására irányuló - vizsgálatok elvégzését.

1.3.3 Terápiás lehetőségek a PTSD kezelésében

A betegség kezelésében az úgynevezett manualizált pszichoterápiás eljárások az elsőként választandók (Lee és mtsai. 2016; Goodnight és mtsai. 2019; Schrader és Ross 2021). Az ebbe a csoportba tartozó viselkedésterápiás módszerek közül (pl.: egyéni trauma fókuszú viselkedésterápia, szemmozgásokkal történő deszenzitizálás és újrafeldolgozás, kognitív viselkedésterápia), egyénre szabottan - a PTSD háttérében álló kiváltó trauma, az expozíció óta eltelt idő, illetve a betegnél megfigyelhető tünettan figyelembevételével - történik a választás (Goodnight és mtsai. 2019; Perczel-Forintos és Lisincki 2020). Lényeges, hogy a PTSD-s betegeknél az egyéni pszichoterápiás kezelés részesítendő előnyben, mely a csoportterápiával szemben jóval nagyobb hatékonyságot mutat (Schrader és Ross 2021). A kezelés többnyire heti egy alkalommal elvégzett 60 perces ülés formájában zajlik, a pszichoterápia teljes időtartama általában 10-16 hét, és fő célja a traumatikus emlékek, illetve az ehhez kötődő érzelmek feldolgozása, a traumához kapcsolódó jelentésadások átértékelése, az elkerülő viselkedés csökkentése, valamint az adaptív funkciók helyreállítása (Lee és mtsai. 2016; Goodnight és mtsai. 2019; Perczel-Forintos és Lisincki 2020).

Szakirodalmi adatok szerint a PTSD kezelésében rendelkezésre álló farmakoterápiás lehetőségek hosszú távú hatékonysága jelentősen elmarad a pszichoterápiás módszerekétől, illetve a tartós remisszió fenntartása folyamatos gyógyszeres terápiát igényel, mely a mellékhatások fellépésének fokozott kockázatával jár együtt (Lee és mtsai. 2016; Schrader és Ross 2021). A PTSD kezelésére használt gyógyszerek mindössze a betegség tüneteinek (depresszív hangulat, szorongás) tompításával javítanak a betegek állapotán, míg a kórkép háttérében álló neurobiológiai mechanizmusokat (pl.: a kondicionális félelem válasz nem megfelelő kioltása), melyek a trauma fókuszú viselkedésterápiás eljárások elsődleges célpontjai, érdemben nem befolyásolják (Lee és mtsai. 2016). Ugyanakkor a pszichoterápiás módszerek a beteg részéről jelentős közreműködést, illetve a beteg és a terapeuta közötti szoros bizalmi viszonyt igényelnek, mely tényezők hiánya a terápiáról való lemorzsolódást eredményezheti (Lee és mtsai. 2016; Goodnight és mtsai. 2019; Schrader és Ross 2021). A fentiek alapján a PTSD farmakoterápiája csupán palliatív megoldást jelent, és elsősorban akkor indokolt, ha a beteg a viselkedésterápiás eljárásokkal szemben inkább a gyógyszeres kezelést részesíti előnyben, illetve amennyiben a fennálló súlyos komorbid depresszió miatt jelentős az auto- és heteroagresszív cselekedetek kockázata (Lee és mtsai. 2016; Perczel-Forintos és Lisincki 2020). A jelenleg forgalomban lévő gyógyszerek közül a venlafaxin és a sertralin hatékonyságáról áll rendelkezésre a legtöbb klinikai adat (Lee és mtsai. 2016; Goodnight és

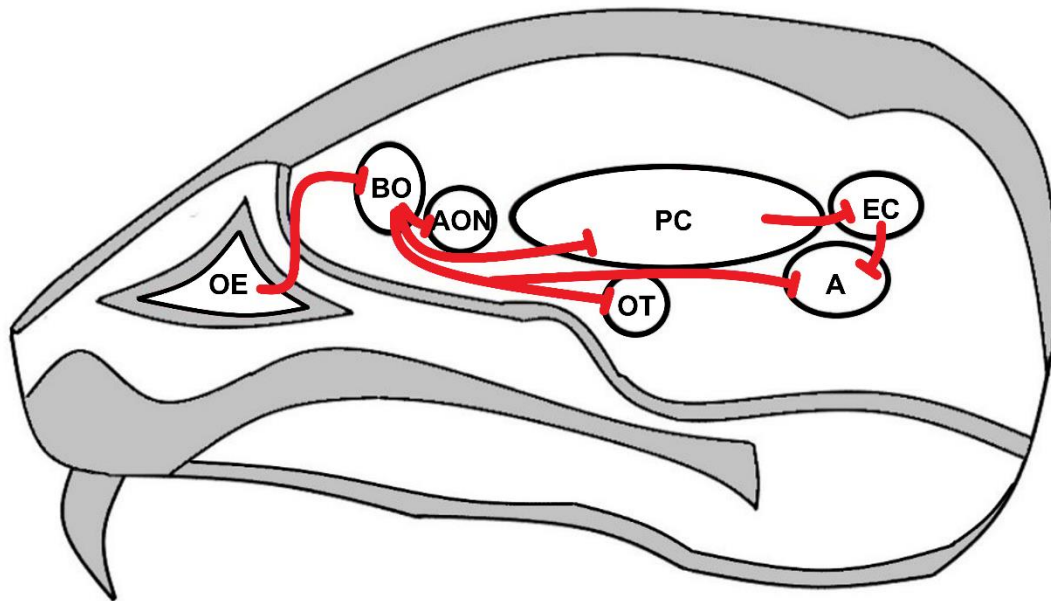
mtsai. 2019; Perczel-Forintos és Lisincki 2020; Schrader és Ross 2021). Ezzel szemben a betegség kezelésében korábban viszonylag gyakran használt benzodiazepinek és antipszichotikumok alkalmazását az ajánlások napjainkban egyre inkább elutasítják (Lee és mtsai. 2016; Schrader és Ross 2021), illetve az utóbbiakat csak súlyos mértékű - más gyógyszerekre vagy pszichoterápiára nem reagáló - fokozott izgalmi állapot (*hyperarousal*) és pszichotikus tünetek fennállása esetén javasolják (Perczel-Forintos és Lisincki 2020). A felsorolt gyógyszereken kívül a szakirodalom másodvonalbeli szerekként említ még néhány további szelektív szerotonin visszavétel gátlót (pl.: fluoxetin, paroxetin), illetve a rémálmok, a *hyperarousal* és a szorongásos zavarok kezelésére adjuváns gyógyszerekként tartja számon az α_1 -receptor antagonistákat (pl.: prazosin), valamint egyes aspecifikus antidepresszánsokat (pl.: mirtazapin) (Lee és mtsai. 2016; Schrader és Ross 2021). Összegzésként elmondható, hogy a PTSD kezelése napjainkban még nem tökéletesen megoldott, a pszichoterápiában részt vevő betegeknél elsősorban a lemorzsolódás, míg a gyógyszeres kezelésben részesülőknél a kisebb hatékonyság, illetve a tartós kezeléssel adódó mellékhatások jelentik a legfőbb problémát. Ennek tükrében érdemes hangsúlyt fektetni a betegség kezelésében nagyobb hatékonyságot és kedvezőbb mellékhatás profilt mutató gyógyszerek kifejlesztésére.

1.4 A szaglópálya felépítése, kapcsolatai és élettani jelentősége

1.4.1 A szaglópálya felépítése

A szaglópálya egyike a legősibb fő szenzoros rendszereinknek, mely lehetővé teszi az illékony kémiai anyagok jelenlétének érzékelését. A szaglás folyamata az orrüregben található szaglóhamban (OE) kezdődik, mely szenzoros bipoláris neuronjai (OSN) egy az illékony szaganyagok észleléséért felelős perifériás, valamint egy az ingert a *bulbus olfactorius* (BO) glutamáterg sejtjeinek irányába továbbító centrális nyúlvánnyal rendelkeznek (Smith és Bhatnagar 2019; Mueller és Egger 2020; Lage-Rupprecht és mtsai. 2020). A BO-ban található további jelentős sejtípus a glutamáterg sejtek neurotranszmisszióját befolyásoló, gátló hatású gamma-amino-vajsav neurotranszmittert (GABA) termelő GABAerg neuronok csoportja (Lage-Rupprecht és mtsai. 2020). A glutamáterg neuronokból eredő axonok kötegekbe rendeződve pályákat alkotnak, amik a primer és szekunder szaglóközpontokban végződnek (pl.: *nucleus olfactorius anterior* (AON), *tuberculum olfactorium* (OT), *piriform kéreg* (PC) és *entorhinalis kéreg* (EC)) (**6. ábra**). A legjelentősebb elsődleges szaglómező a PC, ami az információ-feldolgozást követően azt a másodlagos, illetve asszociációs központokba továbbítja (Truex és Carpenter 1969). A fent leírt fő szaglópályán túl számos emlősfajban

megtalálható az ún. járulékos szaglőrendszer, mely magasabb rendő központokhoz szállítva az ingereket szintén befolyásolhatja a viselkedési válaszokat (Mohrhardt és mtsai. 2018).



6. ábra: A szaglópálya sematikus ábrázolása egérben. OE: szaglőhám, BO: *bulbus olfactorius*, AON: *nucleus olfactorius anterior*, OT: *tuberculum olfactorium*, PC: *piriform kéreg*, EC: *entorhinalis kéreg*, A: *amygdala* (Rotermund és mtsai. 2019 alapján módosítva).

Az emberi szaglópálya anatómiai felépítése hasonlít a rágcsálókéhoz, azonban a szagérzékelés túlélésben, valamint mindennapi életben betöltött szerepe humánban kevésbé hangsúlyos ezért az emberi szaglőrendszer számos más emlősfajhoz (pl.: rágcsálók) képest kevésbé fejlett (Smith és Bhatnagar 2019). Ugyanakkor a szagingereket hatással vannak a szociális viselkedésünkre (Boesveldt és Parma 2021), valamint a legtöbb emlős esetében szerepet játszanak a szociális hierarchia kialakításában, a szexuális partner kiválasztásában, illetve az utódgondozásban (Vosshall 2005; Wesson 2013; Zou és mtsai. 2015; Stoop 2016; Oettl és Kelsch 2018), és ezen folyamatokat feltehetően a limbikus rendszer közvetítésével képesek befolyásolni, mivel a szaglásnak mind a rövid, mind pedig a hosszú távú szociális memória kialakításában szerepe van (Perna és Engelmann 2017).

1.4.2 A szagingereket által kiváltott veleszületett félelemválasz és szabályozása

A szociális viselkedésre gyakorolt hatásain túl a szaglőrendszer funkcionális integritása szükséges az élelem forrásának azonosításához, valamint a ragadozók elkerüléséhez (Zou és

mtsai. 2015), így hozzájárulva a veleszületett félelem válasz és az ahhoz kapcsolódó szorongás kialakulásához. Az elkerülő viselkedést kiváltó predátor eredetű kémiai ingerek továbbításában a fő és a járulékos szaglórendszer aktivációja egyaránt szerepet játszik, melyek egyes limbikus területekkel (*amygdala*, ventromediális hipotalamusz, BNST, PAG, PVN) kapcsolatban állva, azok fokozott neuronális aktivációját idézik elő, így kialakítva a veleszületett félelem választ és szorongást (Pérez-Gómez és mtsai. 2015; Janitzky és mtsai. 2015). A rágcsálók számára predátor vörös róka szagát imitáló 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolin (TMT) az egyik leggyakoribb félelem és stressz válasz kiváltására alkalmazott illékony vegyület, melyet többek között a PTSD rágcsáló modelljében is használnak (Janitzky és mtsai. 2015; Matsukawa és mtsai. 2016; Török és mtsai. 2019). Szakirodalmi adatok szerint TMT expozíciót követően fokozott neuronális aktiváció mutatható ki a BNST (Janitzky és mtsai. 2015; Matsukawa és mtsai. 2016), az elülső *piriform* kéreg (aPC) (Matsukawa és mtsai. 2016), a PAG, valamint a PVN (Janitzky és mtsai. 2015) területén. A predátor szaghoz társuló stresszválasz kialakulásában kulcsszerepet tölthet be a BNST, mely egyrészt közvetlen afferentációt kap a szaginger elsődleges feldolgozásában részt vevő BO és aPC területéről, másrészt efferenseket biztosít a PAG, valamint a PVN irányába, így hozzájárulva a veleszületett félelem válasz, valamint a stressz tengely szabályozásához (Janitzky és mtsai. 2015). TMT alkalmazását követően ráadásul a - PTSD kialakulása során érintett leglényegesebb limbikus agyterületek (hippokampusz és PFC) noradrenerg beidegzését is biztosító - *locus coeruleus* területén szintén fokozott stressz-függő neuronális aktiváció volt kimutatható, bizonyítva ezen struktúra jelentőségét a stressz adaptációhoz társuló félelem válasz kialakulásában (Janitzky és mtsai. 2015). Ezzel összhangban további közlemények szerint predátor szag hatására megváltozott monoamin szintek igazolhatók a hippokampusz, illetve a PFC területén (Wilson és mtsai. 2014; Janitzky és mtsai. 2015; Matsukawa és mtsai. 2016). A fent ismertetett szakirodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy egyes limbikus rendszeri struktúrák és a kapcsolódó neurotranszmitter rendszerek, illetve azok esetlegesen zavart működése a veleszületett félelem válasz szabályozása mellett hozzájárulhat bizonyos stressz-függő adaptációs zavarok (pl.: PTSD) kialakulásához is.

2. HIPOTÉZIS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

2.1 A TRPA1 expresszió feltérképezése és karakterizálása a szaglópálya területén

Irodalmi adatok alapján állítottuk fel azon hipotézisünket, hogy a szaglópálya területén elhelyezkedő TRPA1 receptoroknak szerepe lehet a szaginformáció feldolgozásában, illetve a szagokra adott viselkedési válaszok alakításában. Mivel az irodalomban csak igen korlátozott számban találtunk morfológiai eredményeket a TRPA1 receptor szaglópálya területein való lokalizációjáról, ezért első célkitűzésünk volt a *Trpa1* mRNS expressziójának feltérképezése a szaglóhágmban, valamint a szaginformáció feldolgozásában szerepet játszó lényegesebb primer szaglóközpontokban (BO, PC). Ennek meghatározásához RNAscope ISH-t végeztünk, mely technika - önmagában vagy immunfluoreszcenciával kombinálva - a *Trpa1* esetleges expressziójának megállapítása mellett lehetővé teszi az egyéb sejtspecifikus markerekkel való kolokalizáció vizsgálatát, így biztosítva a TRPA1-et tartalmazó sejtek pontos karakterizálását.

2.2 A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szag hatására kialakuló félelemválaszban

Mivel korábbi eredmények alapján felmerült a TRPA1 receptor szerepe a predátor szagra adott félelemválasz létrejöttében, ezért további célként tűztük ki, hogy *Trpa1* génihiányos állatok bevonásával vizsgáljuk két különböző predátor (róka és macska) szagát imitáló vegyület hatását az állatok veleszületett félelemválaszára. Ennek során elsőként viselkedés vizsgálatokat végezve határoztuk meg és hasonlítottuk össze a különböző predátor szagok viselkedésre kifejtett hatásait, majd hormonszint mérések segítségével vizsgáltuk a HPA tengely szagtesztekre adott válaszát. Végül TRPA1 ioncsatornát overexpresszáló sejtvonalak felhasználásával meghatároztuk, hogy ezen receptorok közvetlenül aktiválhatók-e a fent említett szagokkal, vagy csak indirekt módon járulnak hozzá a veleszületett félelemválasz kialakulásához.

2.3 A TRPA1 szerepének vizsgálata a PTSD kialakulásában

Figyelembe véve, hogy a rágcsálókön elvégzett predátor szagtesztek a PTSD kiváltására is alkalmazott állatkísérletes modellek, valamint, hogy korábbi eredményeink szerint az EWcp/UCN1 neuronjain található TRPA1 befolyásolhatja a stressz adaptáció szabályozását, feltételezzük, hogy az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronok hozzájárulhatnak a stresszadaptáció

zavara által okozott PTSD pathomechanizmusához. Ennek megállapításához két különböző PTSD modellt (*single prolonged* stressz (SPS) és elektromos lábsokk) alkalmazva vizsgáltuk a *Trpa1* WT és KO állatok viselkedésében tapasztalható különbségeket, illetve az EWcp területén végzett RNAscope technika és immunfluoreszcens vizsgálatok segítségével határoztuk meg a EWcp/TRPA1/UCN1 neuronok PTSD modell során kialakuló válaszait.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Állatok

A centrális lokalizációjú TRPA1 receptorok azonosításához, valamint az ioncsatornát expresszáló sejtek karakterizálásához naiv 9 hetes hím C57BL/6 egereket vizsgáltunk. A kísérleti modelleket és a viselkedés vizsgálatokat 3-4 hónapos hím *Trpa1*^{+/+} (WT) és *Trpa1*^{-/-} (KO) egereken hajtottuk végre. A *Trpa1* WT és KO egerek szaporításához szükséges heterozigóta *Trpa1*^{+/-} tenyész párokhoz Prof. P. Geppetti, (Firenzei Egyetem, Olaszország) szíveségéből jutottunk hozzá, melyeket eredetileg Bautista és mtsai. (Bautista és mtsai. 2006) hoztak létre. Röviden összefoglalva a genetikai módosítást a C57BL/6J törzshöz tartozó állatokban alakították ki, melyeket 10 generáció után visszakeresztettek. Az utódok genotípusának ellenőrzése PCR segítségével történt (primerek szekvenciái: ASM2: ATC ACC TAC CAG TAA GTT CAT; ASP2: AGC TGC ATG TGT GAA TTA AAT). Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állat Etikai Bizottságának engedélyével végeztük (BA02/2000-25/2019), figyelembe véve és betartva az Európai Közösség 1986. november 24-én kelt ajánlásait, továbbá az állatok tartásáról és felhasználásáról szóló 1998. évi XXIII törvényt. A kísérletek során mindent elkövettünk annak érdekében, hogy a felhasznált állatok száma és szenvedése a lehető legkisebb mértékű legyen.

Az állatokat a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében standard polikarbonát ketrecekben (330 × 160 × 130 mm, 5-7 egér/ketrec vagy 330 × 100 × 130 mm, 2-5 egér/ketrec) helyeztük el, és standard rágesálótáppal (LT/n, Szinbád Kft., Gödöllő), valamint csapvízzel *ad libitum* láttuk el. Az állattartás 20-24 °C-on, 50-60% relatív páratartalommal, 12-12 órás sötét-világos ciklusban történt. A környezetgazdagítás érdekében az alomtestvérek jelenléte mellett a ketrecekbe papírgurigát helyeztünk. Mikrobiológiai monitorozást évente végzünk (FELASA „S”). A PTSD modelleket, illetve az azokhoz kapcsolódó viselkedés teszteket a korai sötét fázisban, 18 és 22 óra között hajtottuk végre, míg az akut szagaverziós vizsgálatot a reggeli órákban végeztük.

3.2 Kísérleti elrendezés

3.2.1 A *Trpa1* mRNS expresszió vizsgálata egér szaglópálya területén

A *Trpa1* szaglópálya területén való expressziójának vizsgálatát naiv 9 hetes hím C57BL/6 egerekből származó szaglóhám, BO és PC mintákon végeztük. A *Trpa1* expresszáló sejtek karakterizálása céljából a szaglóhámon, az OSN identifikálására alkalmas anti-β-tubulin III immunmarkert használva, immunfluoreszcenciával kombinált RNAscope ISH-t végeztünk,

míg a BO-t, valamint PC-t tartalmazó agymintákon, neuronális nukleáris fehérje (*NeuN*), vezikuláris glutamát transzporter 1 (*Vglut1*), valamint glutamát dekarboxiláz 1 (*Gad1*) mRNS-re specifikus próbák alkalmazásával multiplex RNAscope ISH-t hajtottunk végre.

3.2.2 A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szaggal kiváltott félelemválaszban

A predátor szaggal kiváltott veleszületett félelemválasz vizsgálatához róka (2-MT), illetve macska (valeriánsav) szagát imitáló vegyületeket használtunk. Ennek során *Trpa1* WT és KO egereknél, elsősorban a predátor szag által előidézett lefagyási reakciót értékeltük, illetve a kísérletet követően stressz hormon szint (ACTH és kortikoszteron) meghatározás céljából vérmintát gyűjtöttünk.

3.2.3 A valeriánsav és a 2-MT TRPA1-aktiválóképességének vizsgálata

A szagaverziós tesztekben alkalmazott 2-MT és valeriánsav felhasználásával - egér és humán TRPA1 receptorokat expresszáló *Chinese Hamster Ovary* (CHO) sejtvonalakon - Ca^{2+} beáramlás mérést végeztünk annak megállapítására, hogy képesek-e a fent említett vegyületek agonistaként hatni a TRPA1 receptorokon.

3.2.4 A TRPA1 szerepének vizsgálata PTSD egérmodellekben

A PTSD kiváltásához *Trpa1* KO és WT állatokon két különböző kísérleti modellt alkalmaztunk, melyek lehetővé teszik a betegség egyes jellegzetességeinek szeparált vizsgálatát. Az egyik modell a *single prolonged* stressz (SPS) volt, mely során az állatokat először *restraint* stressznek, ezt követően *forced swim* tesztnek (FST), végül pedig éter narkózisnak vetettük alá, majd vizsgáltuk az állatok immobilitását. A másik modell során, a stressznek kitett egerekben hanghatással kombinált ismétlődő lábsokkot alkalmaztunk, majd értékeltük az állatok lefagyási reakcióját, valamint ugrálását. Mindkét modellnél a viselkedés tesztek elvégzését követően 36 órával az állatokat termináltuk, és további szövettani vizsgálatok céljából agymintát gyűjtöttünk. A morfológiai vizsgálatokat az EWcp/UCN1 neuronjain végeztük. Ezek során a *Trpa1* és *Ucn1* mRNS expresszióját RNAscope ISH, míg az UCN1 peptid tartalom változását immunfluoreszcencia segítségével vizsgáltuk.

3.3 Perfúzió és mintagyűjtés

Az egereket intraperitoneálisan beadott uretán injekcióval (2,4 g/kg) kiváltott mély anesztézia során transzkardiálisan perfundáltuk 20 ml jéghideg 0,1 mol/l-es foszfátpufferelt sóoldattal (PBS, pH: 7,4), melyet fixálás követett 150 ml 4%-os paraformaldehid oldattal (PFA). A perfúzió után az agyakat eltávolítottuk, és 72 órán át PFA-ban 4 °C-on posztfixáltuk. Az OE-kat szintén eltávolítottuk, és a krioprotekció biztosítása érdekében 30% szacharózt tartalmazó 4%-os PFA-ba gyűjtöttük 24 órás posztfixálásra. Az agyakat Leica VT1000 S vibratómmal (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) koronálisan metszettük. Ennek során 30 µm-es szeleteket készítettünk, melyet öt sorozatra osztottunk, és fagyálló oldatban tároltunk (20% etilén-glikol, 30% glicerin és 0,1 mol/l-es nátrium-foszfát puffer) -20 °C-on. További morfológiai vizsgálatok elvégzése céljából a BO-t (Bregma 3 mm), a PC-t (Bregma -1,46 mm) és az EWcp-t (Bregma -2,92 mm-től -4,04 mm-ig) tartalmazó metszeteket a Paxinos és Franklin egér agy sztereotaxiás koordinátákat tartalmazó egér agyi anatómia atlasz segítségével válogattuk ki (Paxinos és Franklin 2001). Az OE mintákat OCT médiumba (Leica) ágyasztuk be, és 17 µm vastagságú transzverzális metszeteket készítettünk kriosztát (Leica CM1950, Nussloch, Németország) alkalmazásával. Ezután a metszeteket SuperFrost Ultra Plus adhéziós tárgylemezre (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Németország, kat.sz.: 10417002) rögzítettük és festésig -20 °C-on tároltuk.

3.4 RNAscope *in situ* hibridizáció (ISH) immunfluoreszcenciával kombinálva

A koronális BO, PC és EWcp metszeteken RNAscope Multiplex Fluoreszcens Reagens Kit v.2 (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, Egyesült Államok) felhasználásával, 30 µm-es vibratómos mintákra optimalizált módosított előkezeléssel (Nemes és mtsai. 2021), egyebekben a gyártó által megadott protokoll szerint RNAscope ISH vizsgálatot végeztünk. Ennek során a szöveti előkezelést követően a minták célgénjeit egér *Trpa1*, *NeuN*, *Vglut1*, *Gad1* és *Ucn1* specifikus próbákkal hibridizáltuk (ld. **1. táblázat**). A szekvenciális jelerősítést és csatornahívást a gyártói protokollban leírtak szerint végeztük. A sejtmagok identifikálása 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, Egyesült Államok, kat.sz.: 323108) alkalmazásával történt. A metszetek fedéséhez ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) médiumot használtunk. A megbízható eredmények biztosítása érdekében technikai kontrollként egyrészt RNAscope 3-plex egér pozitív kontroll próbát használtunk (ld. **1. táblázat**), amely az RNS-polimeráz II A alegység (*Polr2a*; fluoreszcein), a peptidilprolil izomeráz B (*Ppib*; *Cyanine 3* (Cy3)), illetve az ubikvitin C (*Ubc*;

Cyanine 5 (Cy5)) mRNS-ekre specifikus. Másrészt 3-plex negatív kontrollként a bakteriális D-box kötő PAR BZIP transzkripció faktor (*dabP*) mRNS-re specifikus próbát használtunk (ld. **1. táblázat**).

A EWcp metszetein UCN1 immunfluoreszcenciát is végeztünk. Ennek során, az RNAscope-ot követően, a metszeteket 2×15 percig mostuk PBS-ben, majd 2%-os NDS-t tartalmazó PBS-el 1:10.000 arányban hígított, rekombináns nyúl anti-urocortin 1 antitesttel (ld. **2. táblázat**) inkubáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten. Másnap a metszeteket 2×15 percig mostuk PBS-ben, majd 2 %-os NDS-t tartalmazó PBS-el 1:500 arányban hígított, Alexa Fluor 488-al konjugált szamár anti-nyúl szekunder antitesttel (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság; ld. **2. táblázat**) inkubáltuk három órán át szobahőmérsékleten. PBS-es mosást követően a sejtmagok vizualizálását, illetve a lemezek fedését a fent leírtakhoz hasonlóan végeztük.

A szaglóhám mintákon a fent részletezett protokoll szerint *Trpa1* specifikus próbát (ld. **1. táblázat**) használva szintén RNAscope ISH-t hajtottunk végre, melyet β -tubulin III immunfluoreszcencia követett, a szaglóhámiban található érzőidegsejtek (OSN) identifikálása céljából. Ennek során az EWcp immunfluoreszcens vizsgálatánál is leírt protokollt alkalmaztuk a következő antitestekkel: poliklonális nyúl anti- β -tubulin III primer antitest (1:200-as hígításban; Merck, Sigma Aldrich GmbH; Schnelldorf, Németország; ld. **2. táblázat**) és Alexa Fluor 488-al konjugált szamár anti-nyúl szekunder antitest (1:500 arányban hígított; Thermo Fisher Scientific; ld. **2. táblázat**).

Próba	Katalógusszám	Fluorofórok	Hígítás
Mm- <i>Trpa1</i>	400211-C2	TSA Plus Cy3	1:750
Mm- <i>NeuN</i>	313311-C3	TSA Plus Cy5	1:750
Mm- <i>Vglut1</i>	416631	TSA Plus Fluorescein	1:3000
Mm- <i>Gad1</i>	400951-C3	TSA Plus Cy5	1:3000
Mm- <i>Ucn1</i>	466261	TSA Plus Cy3	1:3000
Mm-3-plex pozitív kontroll	320881	TSA Plus Fluorescein, Cy3, Cy5	1:750
3-plex negatív kontroll	320871	TSA Plus Fluorescein, Cy3, Cy5	1:750

1. táblázat: Az RNAscope *in situ* hibridizáció során alkalmazott próbák adatai. *Trpa1*: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 mRNS; *NeuN*: neuronális nukleáris fehérje mRNS; *Vglut1*: vezikuláris glutamát transzporter 1 mRNS; *Gad1*: glutamát dekarboxiláz 1 mRNS; *Ucn1*: urocortin 1; Mm: *Mus musculus*; TSA: tiramid szignál amplifikáció; Cy3: Cyanine 3; Cy5: Cyanine 5.

Primer antitest (hígítás)	Katalógusszám	Szekunder antitest (hígítás)	Katalógusszám
nyúl anti- β -tubulin III (1:200)	T2200	Alexa 488 konjugált szamár anti-nyúl (1:500)	A-11012
nyúl anti-urocortin 1 (1:10.000)	Abcam ab283503	Alexa 488 konjugált szamár anti-nyúl (1:500)	711-545-152

2. táblázat: Az immunfluoreszcencia során alkalmazott antitestek adatai.

3.5 Mikroszkópia, morfometria

A képkészítéshez Olympus Fluoview FV-1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkópot és FluoView FV-1000S-IX81 képelemző szoftvert (Olympus Europa, Hamburg, Németország) használtunk. A digitális képeket az egyes fluorofóroknak megfelelő analóg üzemmódban történő szekvenciális pásztázással készítettük annak érdekében, hogy az emissziós spektrumok átfedéséből adódó fals pozitív jelet kiküszöböljük, illetve, hogy a fluoreszcens szignált megbízhatóan számszerűsíteni tudjuk. A konfokális apertúrát 80 μ m-re állítottuk. Az analóg szekvenciális szkennelést a BO, PC és OE mintákon 40 \times -es (NA: 0,75), míg az EWcp mintákon

60×-os objektívvel végeztük (NA:1,35). A szaglópálya struktúráinak vizsgálatánál szoftveresen 1 µm-es, míg az EWcp esetében 3,5 µm-es optikai vastagsággal számoltunk. Mindkét esetben 1.024×1.024 pixeles felbontást, valamint 4 µs-os pixelenkénti gerjesztési időt alkalmaztunk. A DAPI-t 405, a fluoreszcenst és az Alexa Fluor 488-at 488, a Cy3-at 543, a Cy5-öt pedig 647 nm-en gerjesztettük. A különböző célpontok vizualizálása során a következő virtuális színeket rendeltük a fluoreszkáló jelekhez: kék a DAPI, zöld a fluoreszcein és az Alexa 488, piros a Cyanine 3 és fehér a Cyanine 5 esetében.

Az EWcp-t tartalmazó szeletekből a fotózás során nyert nyers képeken az ImageJ szoftver (1.52a verzió, NIH, Egyesült Államok) segítségével morfometriát végeztünk. Az *Ucn1* mRNS és az UCN1 peptid esetében állatonként négy EWcp szeletről készült nem szerkesztett kép alapján, szeletenként 5-10 sejttestben határoztuk meg a fluoreszcens jelintenzitást. A vizsgált régiót a neuronok citoplazmatikus területein manuálisan határoztuk meg. A specifikus jelintenzitást (SSD) önkényes egységben (au) fejeztük ki. Metszetenként 5-10 neuronban határoztuk meg az SSD értékét, melyeket minden egyes szeletben átlagoltunk, és az így kapott átlagolt jelintenzitásából az adott metszet háttér denzitásának átlagát minden alkalommal levontuk. A fent részletezett méréseket és számításokat állatonként négy szeletben végeztük el, majd az így kapott metszetenkénti értékeket is átlagoltuk. E négy érték átlaga egy egér háttér denzitással korrigált SSD-értéket jelentette. A *Trpa1* mRNS jel esetében szintén manuálisan, szeletenként 5-10 neuronban számoltuk meg a sejtenkénti kópiák számát, állatonként négy szeletben. A számolás során az egyes sejtek határának megállapításához az UCN1 immunfluoreszcencia citoplazmatikus jelét használtuk. Az így kapott értékeket a fentiekhez hasonló módon átlagoltuk, majd statisztikai vizsgálatot végeztünk.

3.6 Predátor tesztek

A predátor szaggal kiváltott kísérleteket elszívófülke alatt végeztük két egymástól (kontroll vs. predátor szagnak kitett csoport) elkülönített hangszigetelt helyiségben *Trpa1* WT és KO állatokon. A modell során a dobozok sarkába egy szűrőpapírkorongot helyeztünk, melyet a kontroll állatoknál fiziológiás sóoldattal itattunk át, míg a predátor szagnak kitett egereknél rókaszagot imitáló 2-metil-2-tiazolinnal (Sigma-Aldrich, kat.sz.: 2346-00-1), vagy a macskaszagra jellemző valeriánsavval (Merck, Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Németország, kat.sz.: 800821) kezeltünk. A szaganyagokat sóoldattal hígítottuk (50 µl vegyületet 2 ml-re), és minden egyes kísérleti állatnál 50 µl-t használtunk az így készített oldatokból. Az egyes vizsgálatok között 70%-os etil-alkohol oldattal tisztítottuk ki a dobozokat,

valamint frissen átítatott szűrőpapírt helyeztünk a dobozokba. A kísérlet során a dobozok felett elhelyezett videokamerákkal rögzítettük az egerek viselkedését, melyet később számítógépes szoftver (Solomon coder, <https://solomon.andraspeter.com/>, 2019) segítségével értékeltünk ki úgy, hogy a vizsgáló személy az egerek csoportbeosztását nem ismerte. Ennek során az alábbi viselkedési mintázatokat vizsgáltuk: ledermedés/freezing (nincs nyilvánvaló aktivitás (a veleszületett félelemválaszt reprezentálja)), szimatolás (a szagot tartalmazó korong szaglászása), valamint exploráció (minden egyéb mozgással járó tevékenység). A kiértékelés során mind az egyes viselkedési mintázatok százalékban kifejezett időtartamát, mind pedig azok gyakoriságát (frekvenciáját) regisztráltuk.

3.7 Radioimmun-assay

A predátor tesztek követően az állatokat azonnal dekapitáltuk, majd vért gyűjtöttünk tőlük. A vérmintákat 3000 rpm fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk 4 °C fokon. Az így nyert szérummintákat, további ACTH és kortikoszteron szint meghatározásig, -20 °C-on tároltuk. A hormonszinteket radioimmun-assay segítségével határoztuk meg a szagaverziós tesztek követően nyert szérum mintákban (ACTH: 50 µl; kortikoszteron: 10 µl), mindkét esetben a Kísérletes Orvostudományi Kutató Intézet (Budapest, Magyarország) által kifejlesztett antitestek felhasználásával (Zelena és mtsai. 2003). A vizsgálaton belüli variációs koefficiens 7,5%, illetve 4,7% volt. Egy adott kísérletből származó összes mintát egy munkamenetben mértünk le.

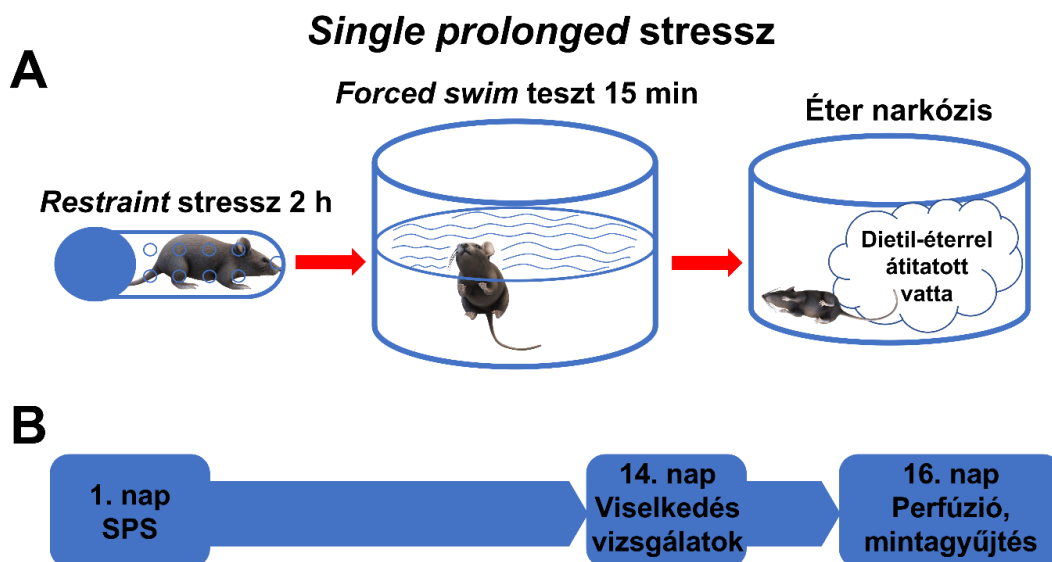
3.8 A Ca²⁺ beáramlás mérése áramlási citometriával

Az egér és humán TRPA1-et overexpresszáló sejtvonalak a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetéből származnak (Pozsgai és mtsai. 2017). A táptalajt (500 ml *Dulbecco's-Modified Eagle Medium* (DMEM), 50 ml főtális szarvasmarha szérum albumin, 10 ml L-glutamin (200 mmol/l), 10 ml MEM nem-esszenciális aminosav oldat, 500 µl penicillin és streptomycin) óvatosan eltávolítottuk a sejtekről, majd a sejteket 5 percig tripszin oldatnak (250 µl, 0,1% PBS-ben oldva) tettük ki. Minden egyes mintához körülbelül 10⁴ TRPA1-overexpresszáló CHO sejtet reszuszpendáltunk 100 µl sejtenyésző médiumban. Ezt követően Fluo-4 AM-et (Invitrogen, 0,4 µl, 1 µg/µl DMSO-ban) adtunk az oldathoz, majd a sejteket 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően extracelluláris oldatot ((ECS) 400 µl, amely összetétele (mmol/l-ben kifejezve): NaCl, 160; KCl, 2,5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glükóz, 10; pH 7,3) adtunk a sejtszuspenzióhoz, majd azt 500 µl ECS-ben szuszpendált,

2-MT-t (Sigma-Aldrich, kat.sz.: 2346-00-1) vagy valeriánsavat (Merck, Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, Németország, kat.sz.: 800821) három különböző koncentrációban (100; 1.000 vagy 10.000 $\mu\text{mol/l}$) tartalmazó oldattal inkubáltuk. Ezt követően a sejtszuspenziókon áramlási citometriát végeztünk, mely során a Fluo-4 AM-et 488 nm-es lézerrel gerjesztettük. A fluoreszcenciát 504 nm-en detektáltuk. A minták átlagos zöld fluoreszcenciáját festékkel töltött kontrollsejtek alapfluoreszcenciájával, valamint 100 $\mu\text{mol/l}$ -es TRPA1 agonista oldattal (allil-izotiocianát) aktivált sejtek fluoreszcenciájával hasonlítottuk össze, ami 100%-os aktivációnak tekinthető (Pozsgai és mtsai. 2017).

3.9 SPS PTSD modell

Vizsgálataink során a *Trpa1* KO (n=12) és WT (n=9) egerek egy-egy csoportját *single prolonged stressz* tesztnek tettük ki, míg egy másik csoport KO (n=10) és WT (n=10) állatot nem stresszelt kontroll csoportokként használtunk. Az SPS modell végrehajtását követően az állatokat két hétre stresszmentes környezetbe helyeztük, majd ezen időtartam elteltével, mind a stressznek kitett, mind pedig az intakt csoportokon viselkedés vizsgálatokat (*forced swim* teszt és *restraint* teszt) végeztünk. Az SPS modellt és a kapcsolódó viselkedési teszteket a korai sötét fázisban (egerek aktív fázisa) végeztük 18 és 22 óra között. A viselkedés tesztekhez kapcsolódó akut stressz hatásának kizárása érdekében, az állatokat az utolsó vizsgálat elvégzését követően 36 órával termináltuk, és morfológiai vizsgálatok céljából mintát gyűjtöttünk (7. ábra).



7. ábra: Az *single prolonged stressz* (SPS) modell sémás ábrázolása (A). A kísérletek időbeli elrendezése (B).

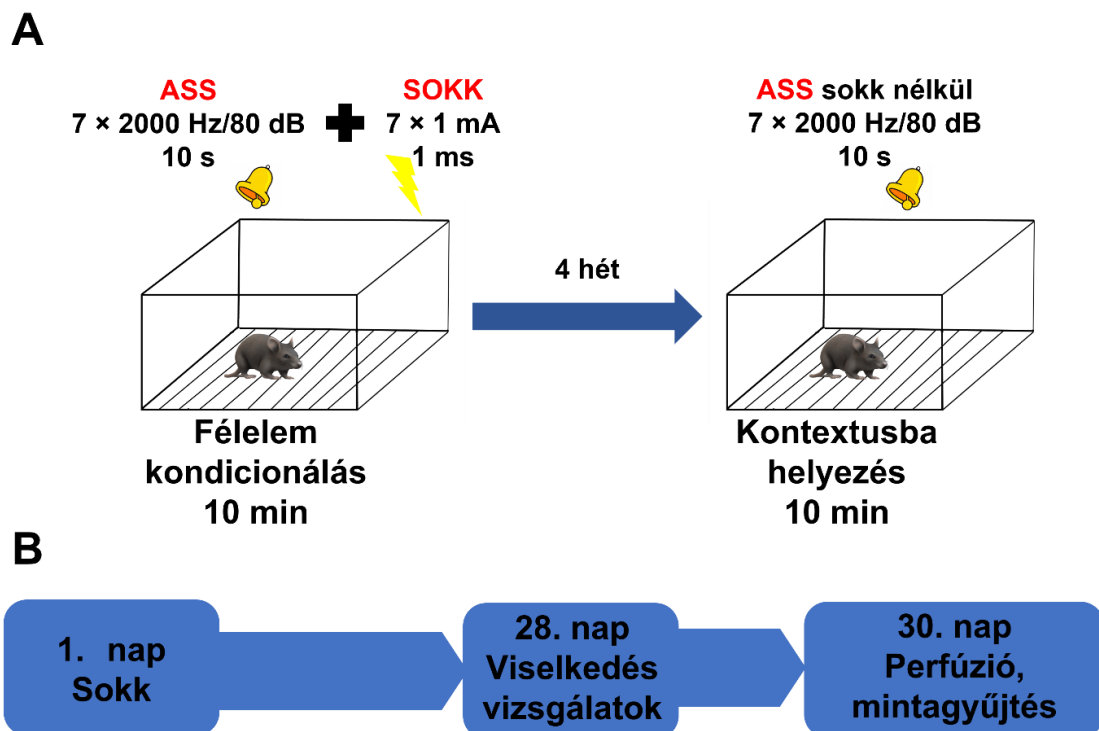
Az SPS protokoll során minden egyes stresszelt állatot először egy 2 órán keresztül tartó ún. *restraint* stressznek tettünk ki, mely során az egereket egy zárt 50 ml-es kúpos, a falán szellőzőnyílásokkal ellátott, műanyag csőbe zártuk, melyben az egerek mozgása nagy mértékben korlátozott. Közvetlenül a *restraint*-t követően az állatok *forced swim* tesztben vettek részt, mely során az egereket 15 percig egy 24 ± 1 °C-os vízzel 20 cm-es mélységig megtöltött 2 literes Pyrex® mérőpohárba helyeztük. Ezt követően az állatokat törlőkendővel megszáritottuk, majd 15 percre saját ketrecükbe helyeztük. Végül az egereket dietil-éterrel átitatott vattát tartalmazó edénybe helyezve éter-narkózist váltottunk ki, melynek beálltát követően azonnal új alommal ellátott ketrecekbe helyeztük az állatokat, ahol két hétig további stresszorok alkalmazása nélkül tartottuk őket.

Az SPS modell elvégzését követő 14. napon az összes kísérleti csoporton viselkedés teszteket hajtottunk végre. A viselkedés vizsgálatok során először a fent ismertetett protokoll szerint *restraint* stressznek tettük ki mind a négy kísérleti csoport állatait, azzal az egyetlen lényeges különbséggel, hogy ezúttal mindössze 15 percig alkalmaztuk ezt a stresszort. Mivel a PTSD-re is jellemző depresszió-szerű viselkedés jól jellemezhető a nagyobb mértékű immobilitással (Török és mtsai. 2019; Kormos és mtsai. 2022), ezért ennek során elsősorban az állatok mozdulatlan állapotban eltöltött idejét, illetve a helyzetből való aktív menekülésre tett kísérleteket vizsgáltuk.

A *restraint* stresszt követően az állatokat 60 percig nyugalomba helyeztük, majd szintén mind a négy csoporton a korábban leírtaknak megfelelően FST-t hajtottunk végre, mely ezúttal azonban csupán 6 percig tartott. Az FST során vizsgált három lényegesebb paraméter a lebegés (nincs nyilvánvaló aktivitás, vagy csak az egyik hátsó lábbal való egyensúlyozás a vízben), ami tulajdonképpen az immobilitásnak feleltethető meg, az úszás (mely során az állat hátsó végtagjai segítségével körkörösén haladó mozgást végez a vízzel teli edényben), valamint a küzdés (ennek során az egér összes végtagjával csapkodva intenzíven igyekszik menekülni a vízből). Az utóbbi két paraméter együttesen az állat mobilitását adja meg, melyek aktív megküzdési stratégiának felelnek meg. Ezzel szemben a lebegéssel jellemezhető immobilitás egyféle passzív belenyugvásnak tekinthető (Sabban és mtsai. 2015; Kormos és mtsai. 2022), és a szakirodalom egy a PTSD-re is jellemző depresszió-szerű viselkedési mintázatként tartja számon (Török és mtsai. 2019). Az egyes viselkedési paraméterek rögzítése videokamerával történt, melyeket később egy, a kezelési csoportokat nem ismerő megfigyelő, a szagaverziós teszteknél is használt számítógépes szoftver segítségével értékelt ki.

3.10 Elektrosokk PTSD modell

Az általunk használt, PTSD kiváltására szintén alkalmas állatkísérletes modell az elektromos lábsokk alkalmazása. Ennek során az SPS modellben leírtakhoz hasonlóan az állatokat négy csoportra osztottuk. A *Trpa1* KO (n=10), és WT (n=10) egerek egy csoportját hanghatással (akusztikus riasztó stimulus; ASS) kombinált elektromos lábsokk által kiváltott stressznek tettük ki (félelem kondicionálás), míg a nem stresszelt kontroll KO (n=9) és WT (n=11) csoportok csupán hanghatásban részesültek sokk leadása nélkül. Az állatokat négy hétre nyugalomba helyeztük a saját környezetükbe, majd ezt követően minden egyes csoportot a korábban alkalmazott stresszorhoz köthető környezetbe helyeztünk vissza (kontextusba helyezés/ emlékeztető szituáció), azonban ezen alkalommal sokk leadása nélkül kizárólag ASS-t használtunk, mind az eredetileg stresszelt, mind pedig a kontroll csoportokban. A PTSD kiváltására alkalmazott elektrosokk protokollt, illetve az azt követő viselkedési tesztek, hasonlóan az SPS-nél leírtakhoz, az állatok aktív fázisában végeztük. A tesztek akut stresszt kiváltó hatásának elkerülése érdekében, 36 órával a viselkedés tesztek követően végeztük az állatok terminálását, valamint a mintagyűjtést (8. ábra).



8. ábra: Az elektrosokk modell sémás ábrázolása (A). A kísérletek időbeli elrendezése (B). ASS: akusztikus riasztó stimulus.

Az elektromos lábsokkal kiváltott PTSD modell során a stresszhatásnak kitett *Trpa1* WT és KO típusú egereket erre a célra kialakított speciális plexi ketrecbe (30 cm × 30 cm × 30 cm) helyeztük, amely egy elektromos áramütés leadására alkalmas rácsos talapzatot tartalmaz. A sokkolt csoportok esetében egy 3 percig tartó expozíciómentes ún. habituációs szakaszt követően összesen hét, eltérő időközönként leadott, alkalmanként 1 ms-ig tartó és 1 mA áramerősségű elektromos sokkot alkalmaztunk, melyeket minden alkalommal egy 10 másodpercig tartó, 2000 Hz frekvenciájú és 80 dB intenzitású hanginger (ASS) vezetett be (kondicionált félelem kiváltása). A kontrollként használt nem stresszelt WT és KO állatok esetében szintén a már említett rácsozott aljú plexi ketrecet használtuk, azonban ezen egereknél csupán a fent részletezett hanghatást alkalmaztuk elektromos sokk leadása nélkül. A kísérlet végeztével az állatokat négy hétre stressz-mentes környezetbe, saját ketrecükbe helyeztük vissza.

Az elektromos lábsokk modellhez kapcsolódó viselkedés vizsgálatokat négy hét elteltével végeztük el. Ennek során mind a négy kísérleti csoport egyedét visszahelyeztük a korábban használt elektrosokk, illetve hanghatás leadására képes plexi ketrecbe, ugyanakkor ezen vizsgálatok alatt kizárólag az eltérő időközönként leadott ASS-t alkalmaztuk, elektrosokk expozíció nélkül (kontextusba helyezés/emlékeztető szituáció). A fent ismertetett elektromos lábsokk által kiváltott PTSD modell a kondicionált félelemre koncentrál, vagyis arra a jelenségre, amikor egy averzív/félelmet kiváltó inger valamilyen semleges kontextushoz (ebben az esetben a hanginger, illetve a környezet) társul (Török és mtsai. 2019). A viselkedés vizsgálatok során ezen protokollnál elsősorban az állatok lefagyási reakciójának (egy másodpercnél hosszabb immobilitás), illetve a kontextus által kiváltott (hanghatásra vagy attól függetlenül bekövetkező) *hyperarousalt* jellemző ugrálásának vizsgálatára fókuszáltunk. A viselkedési paraméterek rögzítése, illetve szoftveres kiértékelése hasonló módon történt, mint az SPS modell esetén.

3.11 Statisztikai analízis

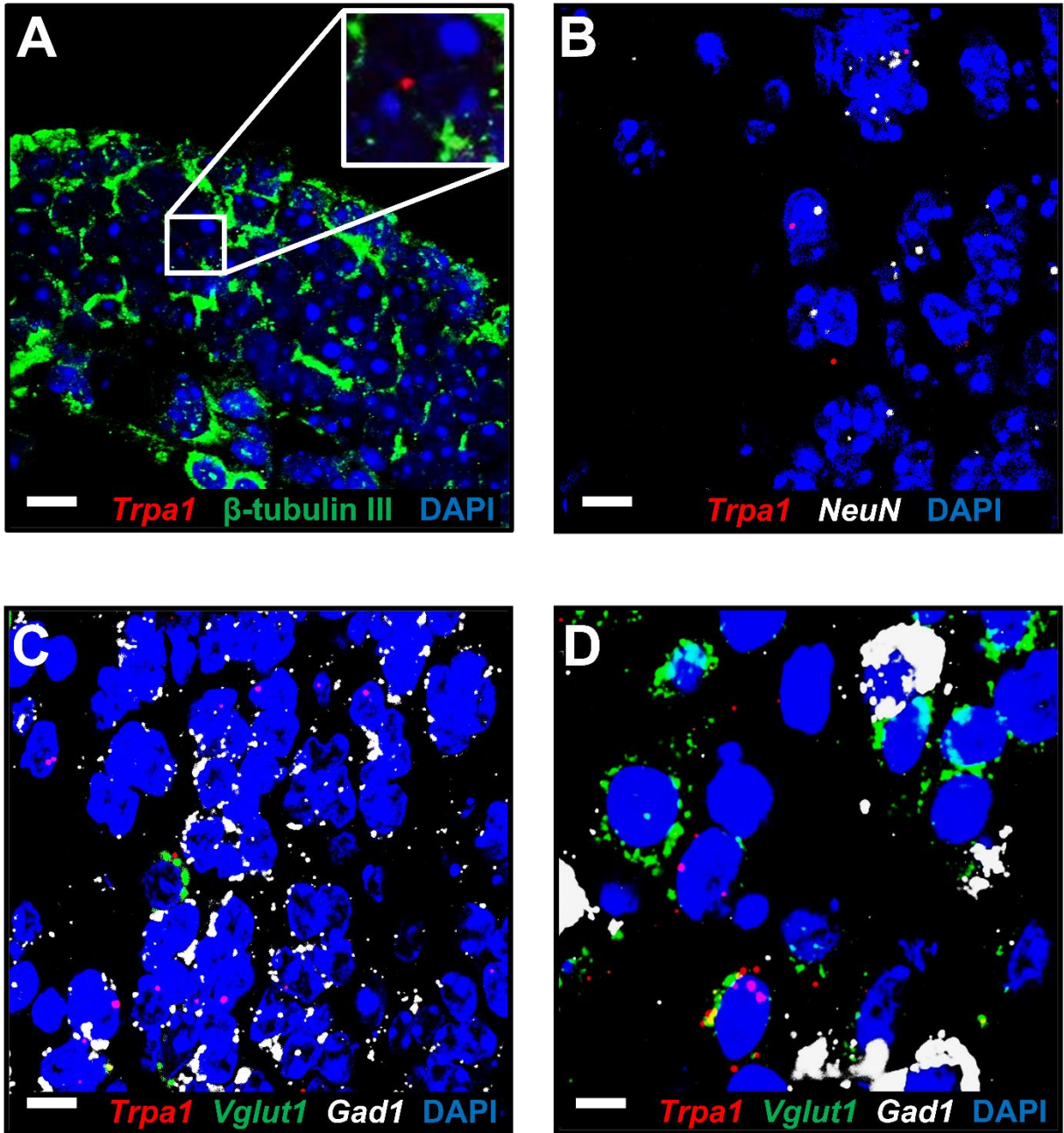
A statisztikai értékelést a Statistica 13.5.0 szoftverrel végeztük. Az adatokat átlag ± SEM-ben adtuk meg. Az adathalmazokat minden esetben normális eloszlás és homogenitás vizsgálatoknak vetettük alá. A szagaverziós tesztek során a WT és KO egerek viselkedését, valamint a PTSD modellek esetében a nem stresszelt kontroll és a stressznek kitett WT állatoknál a *Trpa1* mRNS-expresszió összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük. A többi esetben a főhatásokat kétutas varianciaanalízissel (ANOVA, változók: stressz és genotípus)

vizsgáltuk, melyet követően Tukey-féle *post hoc* tesztet végeztünk. Azon eredményeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, melyeknél a p-érték 0,05-nél kisebb volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A *Trpa1* mRNS expresszió vizsgálata egér szaglópálya területén

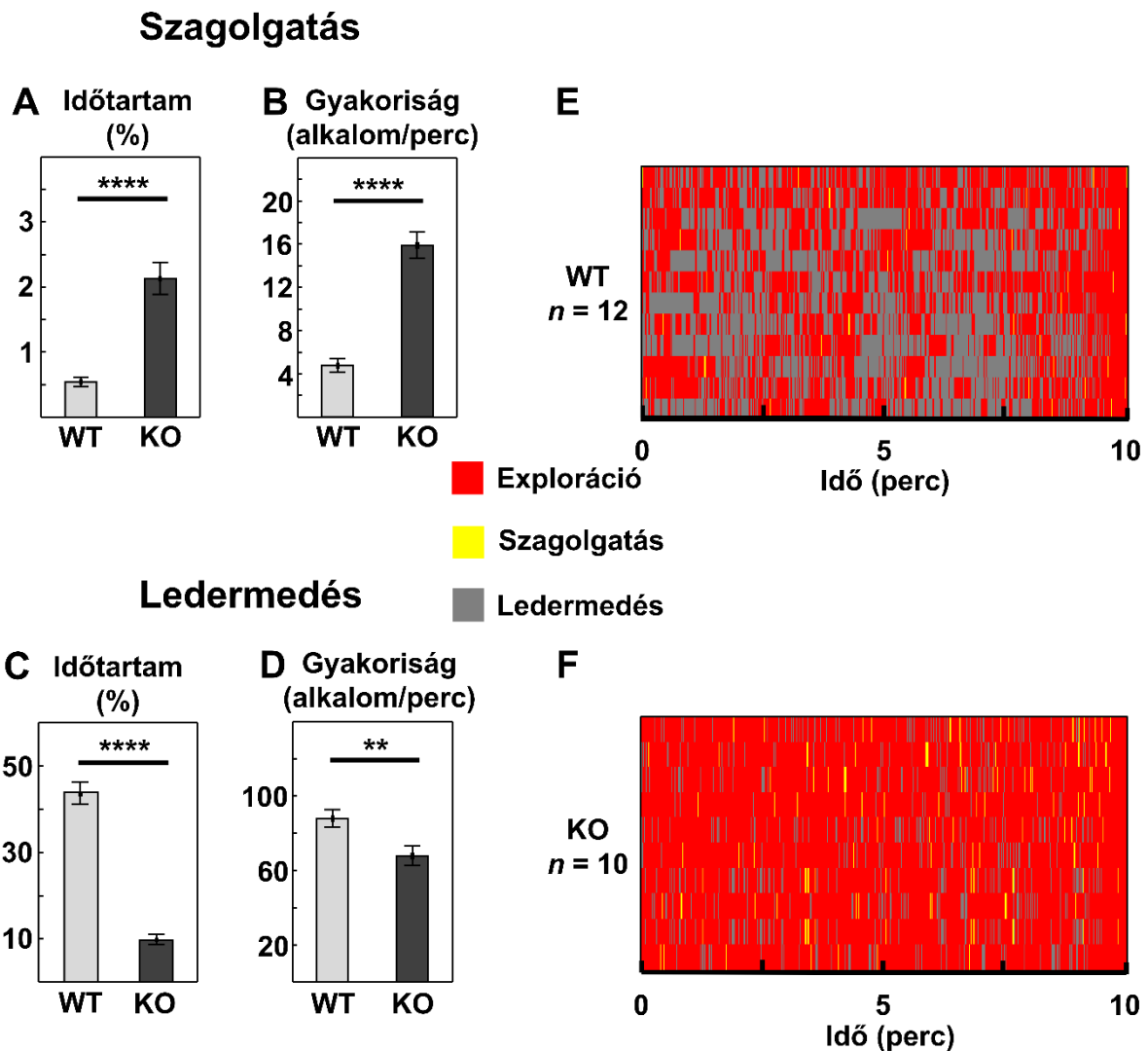
A *Trpa1* lehetséges expressziójának meghatározásához a szaglópálya érzőidegsejtjein RNAscope ISH-val kombinált anti- β -tubulin III immunfluoreszcenciát végeztünk, ami egy a szaglópálya általunk vizsgált sejt típusára szelektív immunmarker (Lee és Pixley 1994; Packard és mtsai. 2016). A vizsgálat során a *Trpa1* mRNS igen alacsony kópiaszámban expresszáldott az OE-ben, és kolokalizáció a β -tubulin III-al nem volt detektálható (**9. ábra A**). A BO mintákon elvégzett kettős RNAscope jelölés során a *Trpa1* mRNS minden esetben a neuronokra specifikus *NeuN* mRNS-el kolokalizált jelezve, hogy ezen receptor kizárólag neuronális elemeken található meg (**9. ábra B**). Továbbá ugyanezen szövetben elvégzett hármas RNAscope jelölés alkalmazásával a *Trpa1* mRNS mérsékelt expressziója volt kimutatható a *Gad1* mRNS-t tartalmazó GABAerg gátló neuronokban, míg a glutamáterg serkentő neuronokra specifikus *Vglut1* mRNS-t expresszáló sejtekkel kolokalizáció alig volt detektálható (**9. ábra C**). A PC-ben a *Trpa1* mRNS-t kizárólag a *Vglut1* mRNS-t is tartalmazó serkentő neuronokban detektáltuk, a *Gad1* pozitív GABA-erg sejtekkel nem volt kimutatható kolokalizáció (**9. ábra D**).



9. ábra: A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (*Trpa1*) mRNS expressziója a C57BL/6 egerek szaglópályájának különböző régióiban. A *Trpa1* (piros) mRNS expresszióját a szaglóhám területén anti- β -tubulin III (zöld) immunfluoreszcenciával kombinált RNAscope technikával vizsgáltuk (A). A *Trpa1* mRNS neuronális elemekkel való kolokalizációjának kimutatásához a *bulbus olfactorius* területén neuronális nukleáris fehérje (*NeuN*; fehér) mRNS-re specifikus próbával kettős (B), míg ugyanezen régióban a serkentő, illetve a gátló idegsejtekkel való kolokalizáció vizsgálatához vezikuláris glutamát transzporter 1 (*Vglut1*; zöld) és glutamát dekarboxiláz 1 (*Gad1*; fehér) mRNS-re specifikus próbákkal hármas (C) RNAscope jelölést végeztünk. A piriform kéregben a *Trpa1* mRNS kolokalizációjának megállapításához szintén *Vglut1* és *Gad1* specifikus próbákkal hajtottunk végre RNAscope vizsgálatot (D). Méretsávok: 10 μ m. $n = 4$ /agyterület. A sejtmagok vizualizálásához minden esetben 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk (kék).

4.2 A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szaggal kiváltott félelemválaszban

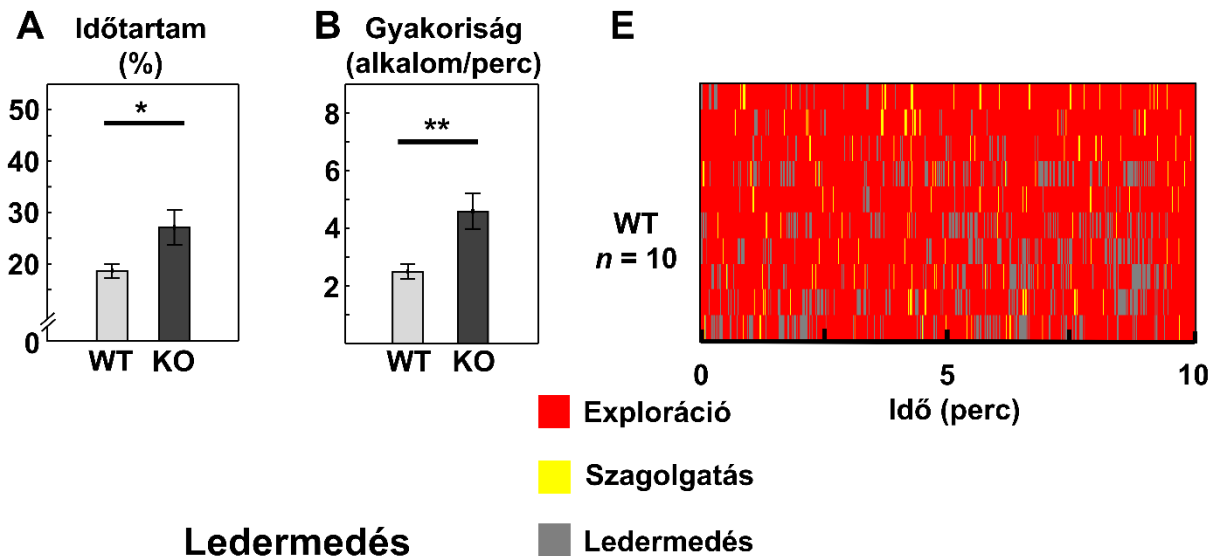
A WT és KO egerek között jelentős különbségeket észleltünk a 2-MT által kiváltott szagaverziós teszt során. Mind a szagforrás szagolgasának időtartama, mind pedig annak gyakorisága szignifikánsan nagyobb volt a *Trpa1* KO egereknél a WT állatokhoz képest ($t_{\text{időtartam}}(2,23) = -6,52, p < 0,0001$; $t_{\text{gyakoriság}}(2,23) = -8,43, p < 0,0001$) (10. ábra A, B). Ezzel párhuzamosan a ledermedés lényegesen rövidebb ideig tartott, és sokkal ritkábban fordult elő KO egerekben ($t_{\text{időtartam}}(2,23) = 11,78, p < 0,0001$; $t_{\text{gyakoriság}}(2,23) = 2,81, p < 0,01$) (10. ábra C, D).



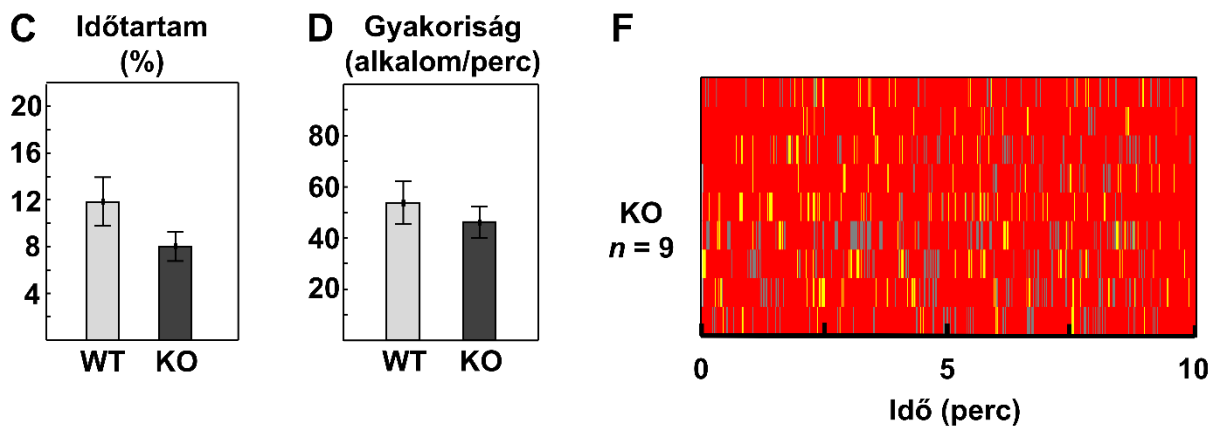
10. ábra: A 2-metil-2-tiazolin (2-MT) hatása a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhiányos (KO) egerek viselkedésére. Az oszlopdigrammok a két genotípus szagolgasával vagy ledermedéssel töltött idejét (A, C), és ezen paraméterek gyakoriságát (B, D) mutatják. A Gantt-diagramokon az egyes állatok viselkedésének időbeli változása látható (E, F). Kétmintás t-próba; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; $n = 10-12$.

Valeriánsavat alkalmazva hasonló különbségeket figyeltünk meg a genotípusok között a szagolgtatás tekintetében ($t_{\text{időtartam}}(2,19) = -3,27, p < 0,005$; $t_{\text{gyakoriság}}(2,19) = -2,40, p < 0,03$) (11. ábra A, B), ugyanakkor a ledermedés esetében csak a hasonló tendenciát tudtuk kimutatni szignifikáns különbség nélkül ($p_{\text{gyakoriság}} > 0,49, p_{\text{időtartam}} > 0,14$) (11. ábra C, D).

Szagolgtatás

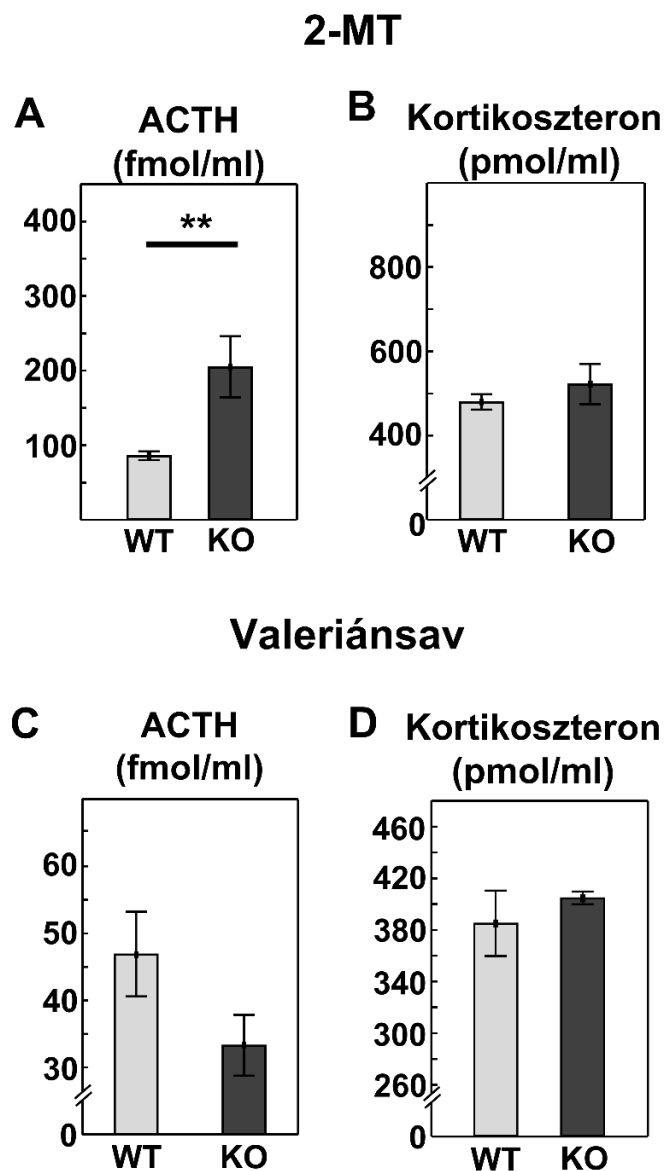


Ledermedés



11. ábra: A valeriánsav által kiváltott viselkedésbeli különbségek a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhíányos (KO) egereknél. Az oszlopdigrammok a két genotípus szagolgtatással vagy ledermedéssel töltött idejét (A, C), és ezen paraméterek gyakoriságát (B, D) mutatják. A Gantt-diagramokon az egyes állatok viselkedésének időbeli változása látható (E, F). Kétmintás t-próba; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 9-10$.

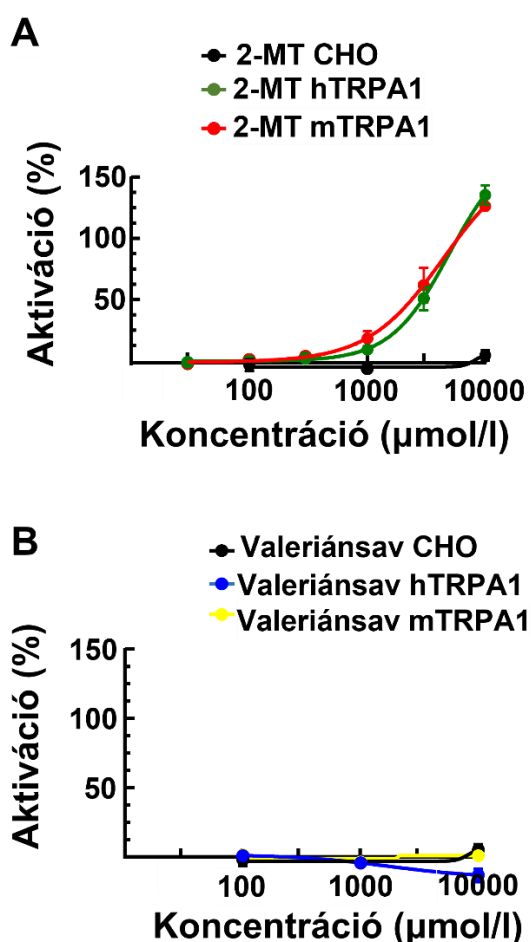
A 10 perces szagexpoziációt követően vett vérminták vizsgálata során szignifikánsan magasabb ACTH-szintet detektáltunk a KO-egereknél 2-MT használata után ($t(1,19) = -3,02, p < 0,008$) (**12. ábra A**). Ugyanakkor a szérumszint mérés során nem lehetett különbséget megállapítani a két genotípus között ($t(1,23) = -0,85, p > 0,4$) (**12. ábra B**). A valeriánsavval elvégzett szagexpoziációt követően sem az ACTH ($t(1,11) = 1,69, p > 0,11$), sem pedig a kortikoszteronszintek ($t(1,13) = -0,71, p > 0,49$) között nem volt kimutatható szignifikáns eltérés (**12. ábra C, D**).



12. ábra: A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhiányos (KO) egerek szérumszintje adrenokortikotrop hormon (ACTH) és kortikoszteron szintje 2-metil-2-tiazolin (2-MT) (**A, B**) valamint valeriánsav (**C, D**) alkalmazását követően. Kétmintás t-próba; ** $p < 0,01$; $n = 10$.

4.3 A valeriánsav és a 2-MT TRPA1-aktiválóképességének vizsgálata

A humán és az egér TRPA1-ioncsatornát overexpresszáló CHO sejteknél ($n = 5-6 \times 10^4$ sejt mintánként) a 2-MT hatására mindkét sejtvonal esetében az átlagos zöld fluoreszcencia koncentrációfüggő növekedése volt kimutatható a festékkel töltött, nem stimulált sejtekhez képest. A két faj 2-MT által kiváltott receptoraktivációja között szignifikáns különbség nem volt detektálható (13. ábra A). Az EC_{50} érték 5010 $\mu\text{mol/l}$ volt a humán és 4419 $\mu\text{mol/l}$ az egér TRPA1-et expresszáló sejtekben. A negatív kontrollként használt, TRPA1-et nem expresszáló CHO sejtek nem reagáltak egyik vegyületre sem, illetve egyik TRPA1-et expresszáló sejtvonal sem reagált a valeriánsavra (13. ábra B).



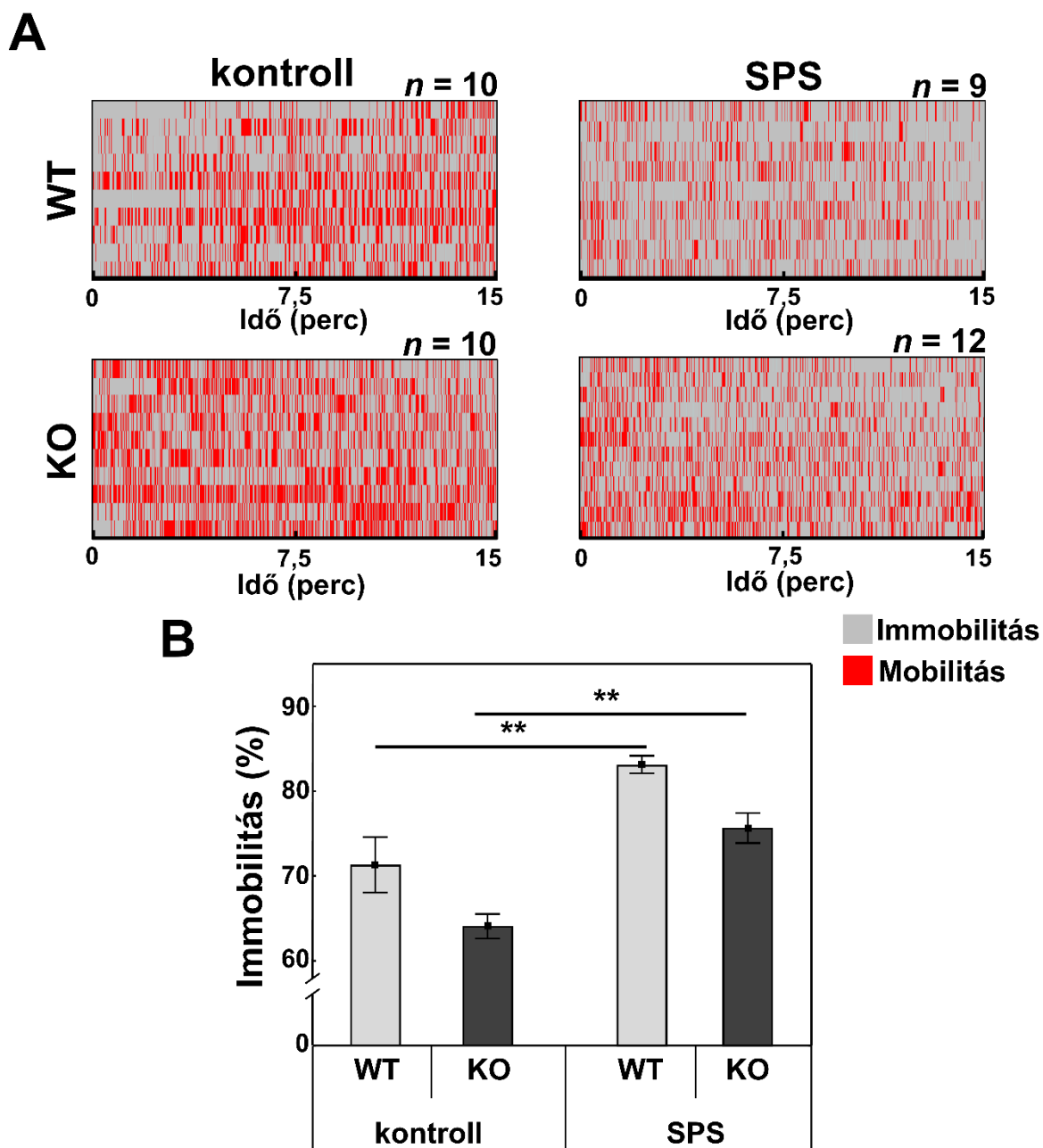
13. ábra: A róka (A) és a macskaszag (B) hatása a *Chinese Hamster Ovary* (CHO) sejtek kalcium beáramlására humán és egér tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptorokat expresszáló sejtekben. A fokozott kalciumválaszt a Fluo-4 AM fluoreszcenciának a festékkel töltött, nem stimulált sejtek fluoreszcenciájához viszonyított megnövekedése jelezte. $n = 5-6 \times 10^4$ sejt mindkét sejtvonalnál, minden kísérletet négyszer végeztünk el. 2-MT: 2-metil-2-tiazolin, EC_{50} : 50%-os hatás kiváltásához szükséges ligandum koncentráció, h: humán, m: egér.

4.4 A TRPA1 szerepének vizsgálata PTSD egérmodellekben

4.4.1 SPS modell

Restraint stresszt alkalmazva fokozott immobilitást észleltünk mindkét stressznek kitett csoportban a kontroll (nem stresszelt) állatokhoz képest, szignifikáns stressz főhatással az ANOVA során ($F_{\text{SPS}}(1,36) = 30,34$, $p < 0,0001$, Tukey-féle *post hoc* összehasonlítással mind a $p_{\text{WT kontroll/WT SPS}}$, mind pedig a $p_{\text{KO kontroll/KO SPS}} < 0,003$). Ugyanakkor a genotípus főhatás tekintetében megfigyelhető szignifikáns különbség ($F_{\text{genotípus}}(1,36) = 11,81$, $p < 0,002$) azt jelezte, hogy a mozdulatlanság alacsonyabb mértékű volt a KO egerek mindkét csoportjában a megfelelő WT állatokhoz képest, bár a Tukey-féle *post hoc* teszt során ezen csoportok között szignifikáns különbség nem igazolódott ($p_{\text{WT kontroll/KO kontroll}} = 0,11$, míg a $p_{\text{WT SPS/KO SPS}} = 0,08$), továbbá a stressz és a genotípus között kölcsönhatás nem volt kimutatható ($F_{\text{interakció}}(1,36) = 0,001$, $p > 0,97$) (14. ábra).

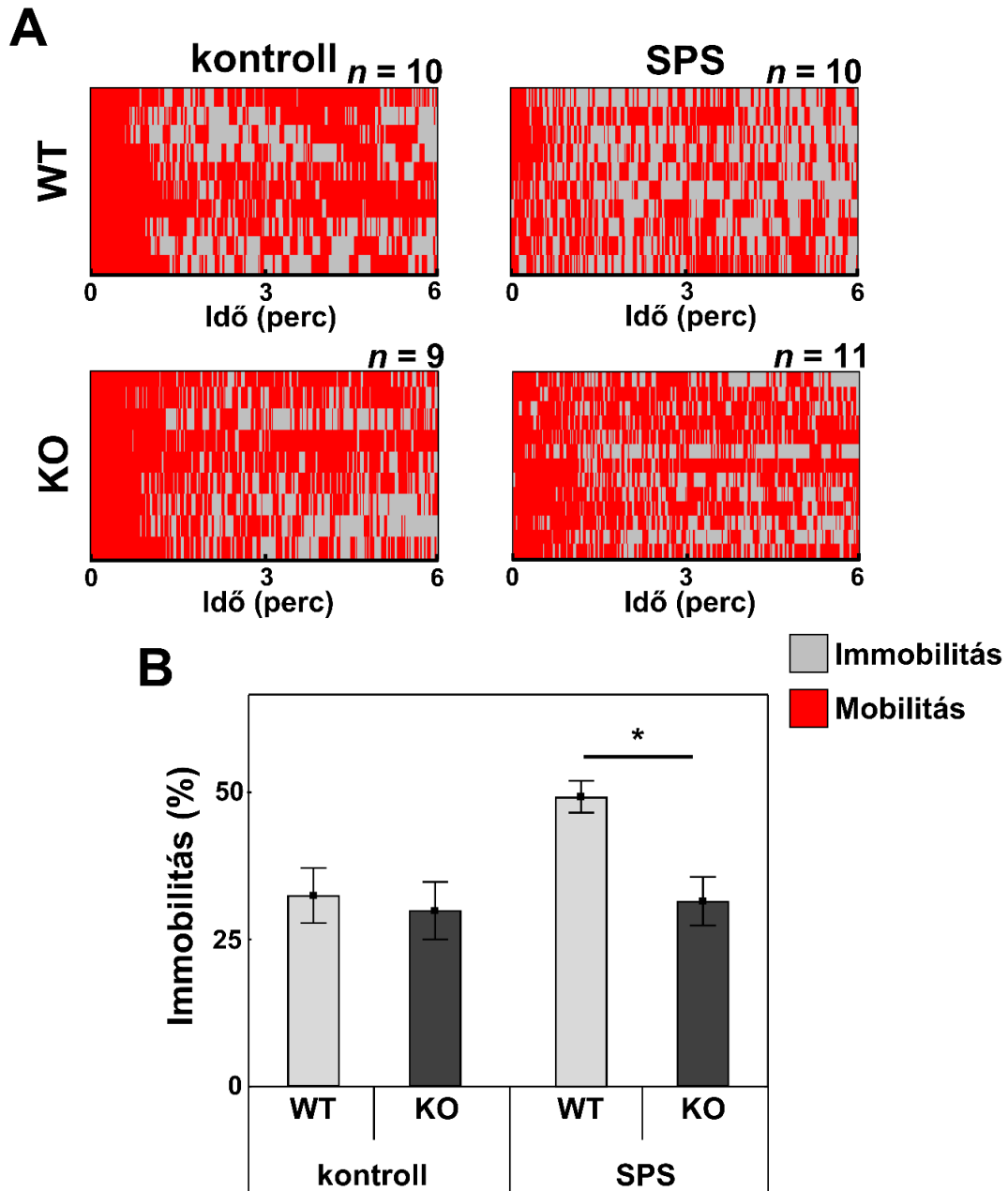
Restraint stressz



14. ábra: A viselkedési paraméterek változásai tranzien receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhányos (KO) egerekben a *restraint* stressz során. A Gantt-diagramokon megfigyelhető az egyes állatok viselkedésének időbeli változása (A). Az oszlopdiaagram az egyes csoportoknak a teljes vizsgálati időtartamhoz viszonyított mozdulatlansággal töltött idejét adja meg százalékban kifejezve (B). Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; ** $p < 0,01$; $n = 9-12$. SPS: *single prolonged* stressz.

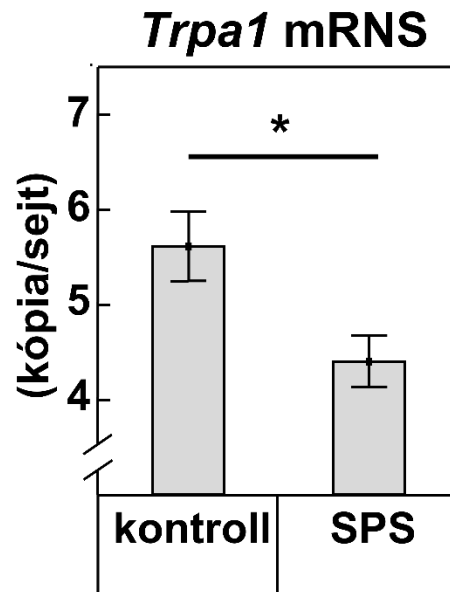
Az FST során a stressznek kitett WT egerek szignifikánsan nagyobb mértékű mozdulatlanságot mutattak kontroll (nem stresszelt) társaikhoz képest, míg hasonló különbségek a KO állatok esetén nem voltak detektálhatók. A kétutas ANOVA szignifikáns genotípus főhatást igazolt ($F_{\text{genotípus}}(1,37) = 4,57, p < 0,04$), melynek háttérében a stresszelt WT egereknek a KO állatokhoz viszonyított fokozott immobilitása állt ($p < 0,05$), továbbá erős tendenciát mutatott a stressz főhatás ($F_{\text{SPS}}(1,37) = 4,07, p < 0,06$) esetén, ugyanakkor, a két változó közötti interakció a *restraint*-hez hasonlóan itt sem volt kimutatható ($F_{\text{interakció}}(1,37) = 2,37, p > 0,13$) **(15. ábra)**.

Forced swim teszt

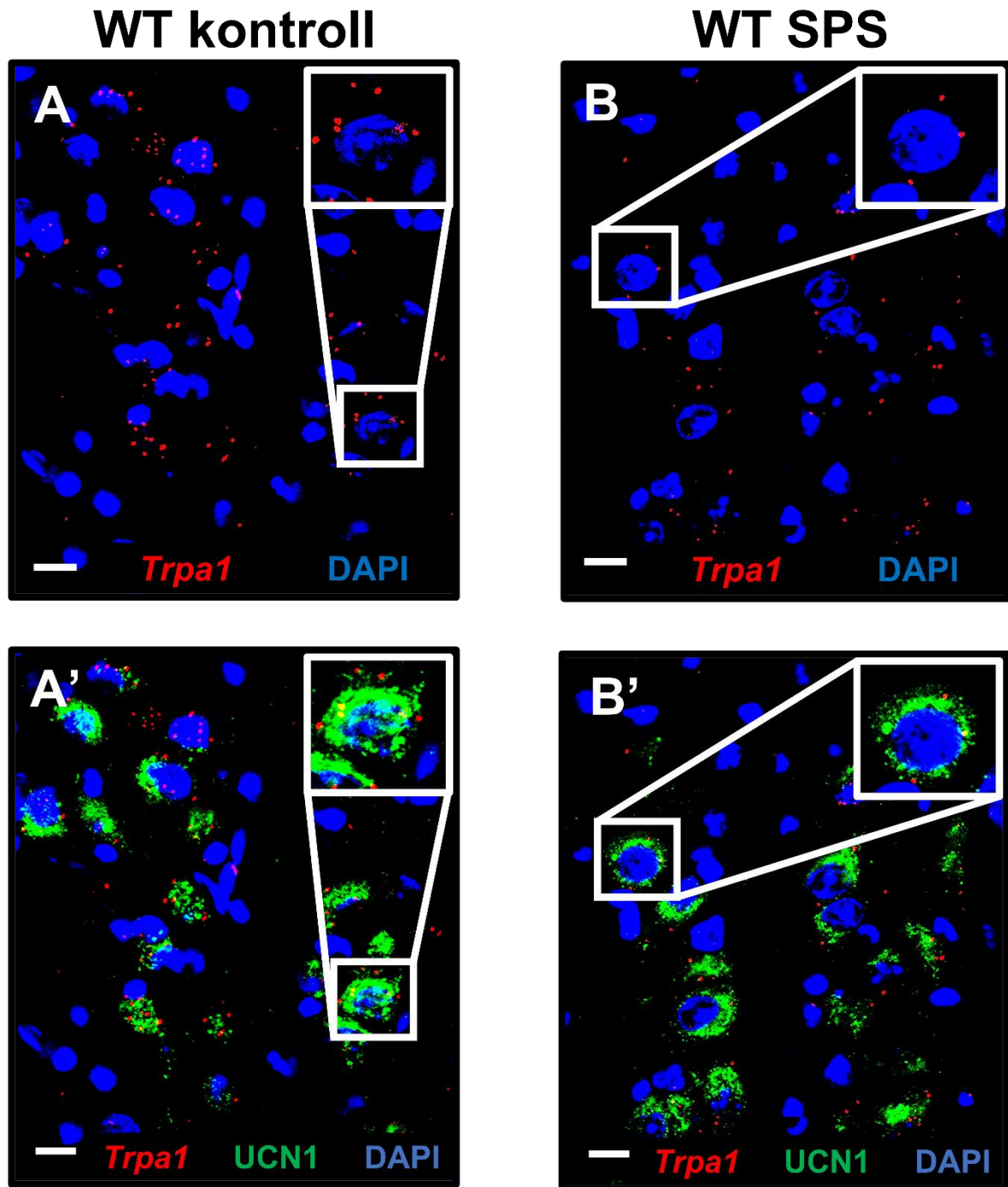


15. ábra: A viselkedési paraméterek változásai a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhányos (KO) egerekben az *forced swim* teszt során. A Gantt-diagramokon megfigyelhető az egyes állatok viselkedésének időbeli változása (A). Az oszlopdiagram az egyes csoportoknak a teljes vizsgálati időtartamhoz viszonyított mozdulatlansággal töltött idejét adja meg százalékban kifejezve (B). Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; * $p < 0,05$; $n = 9-11$. SPS: *single prolonged stressz*.

A *Trpa1* mRNS expresszió vizsgálatához WT állatokban az EWcp területén UCN1 immunfluoreszcenciával kombinált RNAscope ISH-t használtunk. Ennek során megerősítettük a *Trpa1* mRNS kópiák kolokalizációját az UCN1 peptiddel az EWcp neuronokban (**17. ábra**), illetve SPS modellt alkalmazva szignifikánsan csökkent *Trpa1* mRNS expressziót detektáltunk a stresszes állatok urocortinerg sejtjeiben a kontroll csoporthoz képest ($t_{\text{kópia/sejt}}(2,14) = 2,65$, $p < 0,02$) (**16. ábra**).

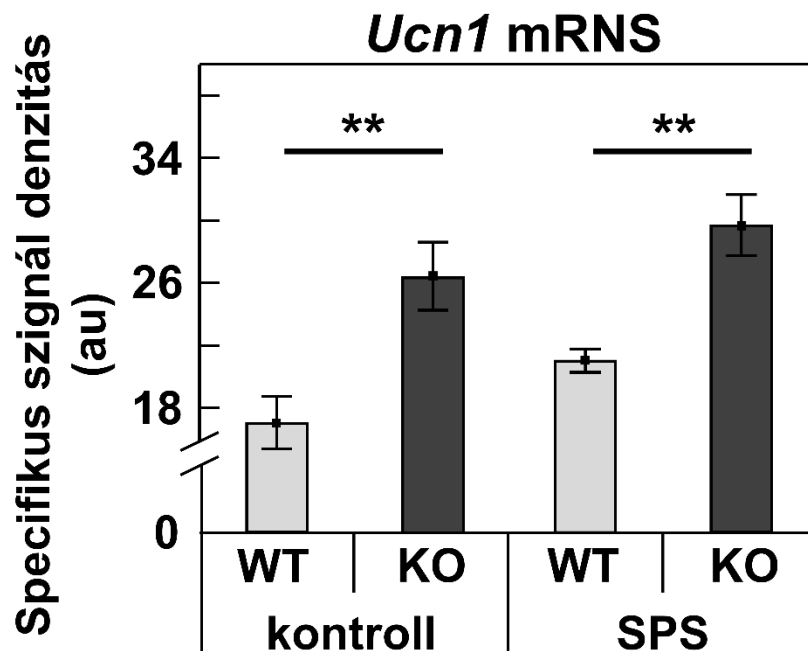


16. ábra: A *single prolonged stressz* (SPS) hatására bekövetkező sejtenkénti tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (*Trpa1*) mRNS kópiaszám változás *Trpa1* vad típusú állatok centrális projekciójú Edinger-Westphal magjának neuronjaiban. Kétmintás t-próba; * $p < 0,05$; $n = 8$.

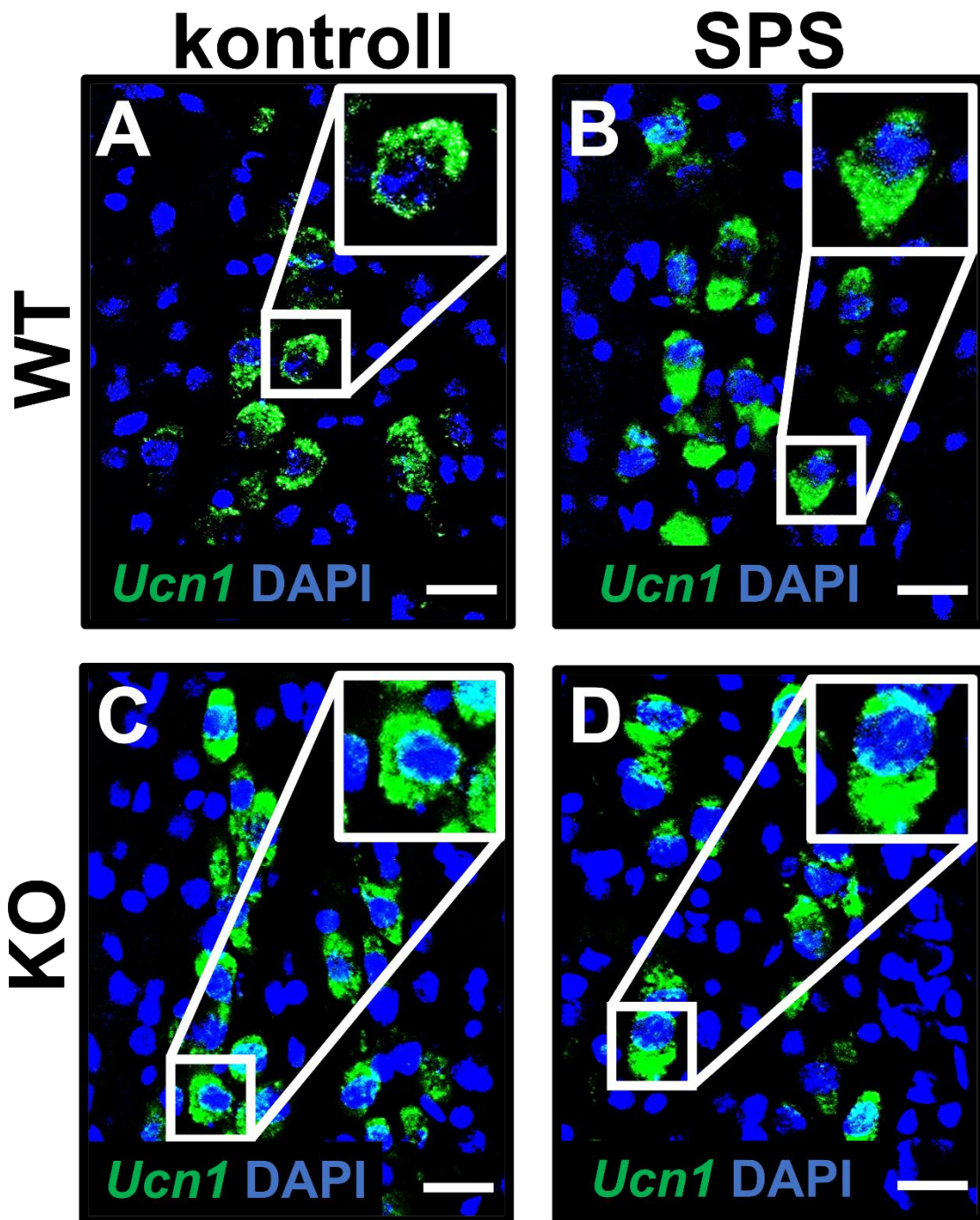


17. ábra: A *single prolonged stressz* (SPS) modell hatása a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) urocortinerg neuronjain található tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (*Trpa1*) mRNS expresszióra. Reprezentatív fotók a *Trpa1* mRNS (piros) expresszióról vad típusú (WT) egerek EWcp neuronjaiban (A). Az SPS hatása a *Trpa1* mRNS expresszióra (B). A *Trpa1* mRNS és az urocortinerg sejtek kolokalizációjának megállapításához urocortin 1 (UCN1; zöld) immunfluoreszcenciát alkalmaztunk (A', B'). A sejtmagok vizualizálásához 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk (kék). Méretség: 25 μm.

Az *Ucn1* mRNS expresszió változásainak identifikálásához kontroll és SPS-nek kitett WT és KO egerek EWcp neuronjain RNAscope ISH-t végeztünk (**19. ábra**). Ennek során mind a bazális, mind pedig az SPS indukálta *Ucn1* mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett volt a KO állatokban a WT társaikhoz képest, a genotípust ($F_{\text{genotípus}}(1,22) = 30,70, p < 0,0001$, Tukey-féle *post hoc* vizsgálatot elvégezve a $p_{\text{WT kontroll/KO kontroll}} < 0,004$, míg a $p_{\text{WT SPS/KO SPS}} < 0,005$), illetve a stresszt is érintő jelentős főhatással ($F_{\text{SPS}}(1,22) = 4,99, p < 0,04$), ugyanakkor a két változó közötti szignifikáns kölcsönhatás nélkül ($F_{\text{interakció}}(1,22) = 0,05, p > 0,82$). Bár az ANOVA során a stressz főhatása kimutatható volt, azonban a *post hoc* összehasonlításnál szignifikáns különbség nem volt detektálható (mind a $p_{\text{WT kontroll/WT SPS}}$, mind pedig a $p_{\text{KO kontroll/KO SPS}} > 0,30$) (**18. ábra**).

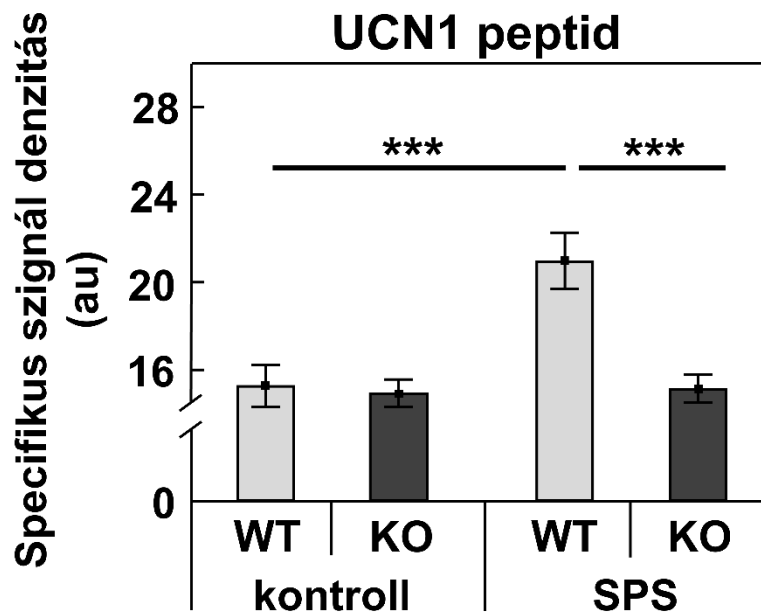


18. ábra: Az *single prolonged* stressz (SPS) hatására bekövetkező urocortin 1 (*Ucn1*) mRNS specifikus jelenlét változása transziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génihiányos (KO) állatok centrális projekciójú Edinger-Westphal mag neuronjaiban. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; ** $p < 0,01$; $n = 8$. au: *arbitrary unit*/önkéntes egység.

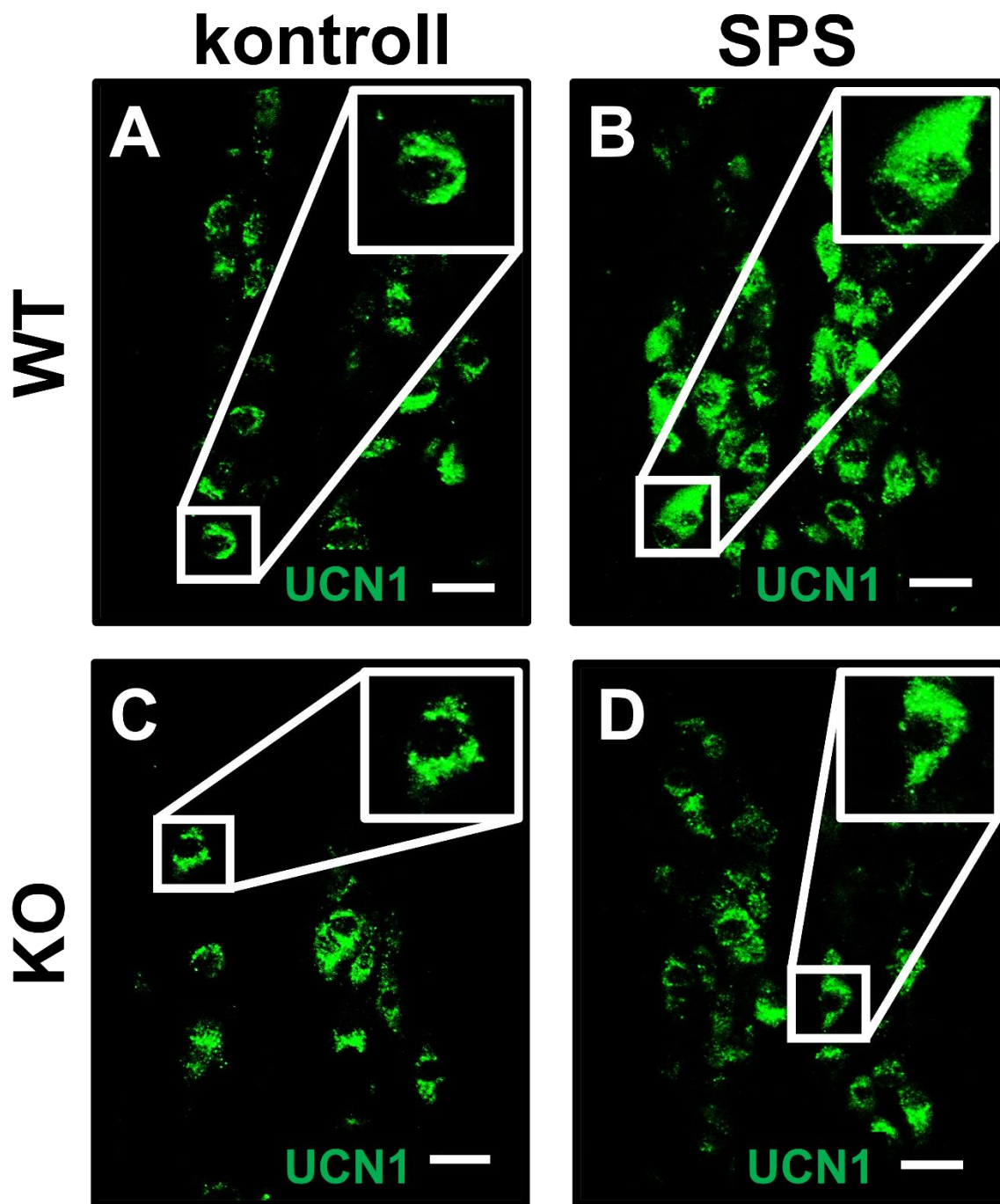


19. ábra: Az urocortin 1 (*Ucn1*) mRNS (zöld) expressziójának változása kontroll (A, C) és *single prolonged* stressznek (SPS) kitett (B, D) tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhíányos (KO) egerek centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) urocortinerg neuronjaiban. A sejtmagok vizualizálására 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk (kék). Méretsávok: 25 μ m.

Az UCN1 peptid tartalom változásainak kimutatására immunfluoreszcens festést végeztünk a WT és KO egerek EWcp neuronjain (**21. ábra**). Az UCN1 mennyiség jelentősen fokozódott a WT állatokban SPS hatására ($F_{\text{SPS}}(1,28) = 10,29, p < 0,004$), azonban hasonló SPS által okozott változások nem voltak megfigyelhetők a KO egerekben ($F_{\text{genotípus}}(1,28) = 11,36, p < 0,003$), amit a két változó közötti szignifikáns kölcsönhatás támasztott alá az ANOVA során ($F_{\text{interakció}}(1,28) = 8,95, p < 0,006$; Tukey-féle *post hoc* összehasonlítással mind a $p_{\text{WT kontroll/WT SPS}}$, mind pedig a $p_{\text{WT SPS/KO SPS}} < 0,001$) (**20. ábra**).



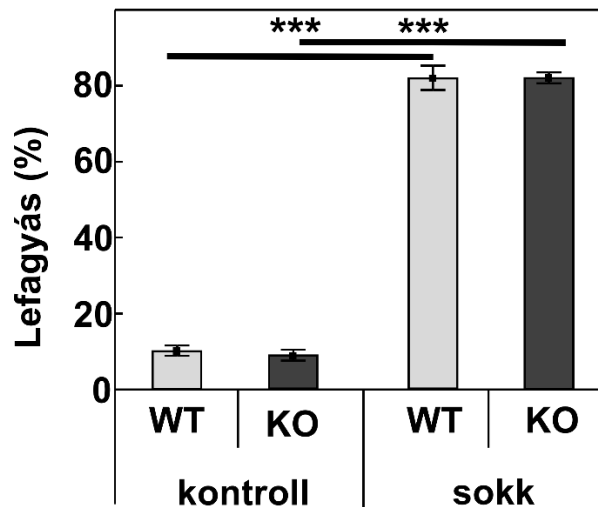
20. ábra: A *single prolonged stressz* (SPS) hatására bekövetkező urocortin 1 (UCN1) peptid specifikus jelenség változása tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhányos (KO) állatok centrális projekciójú Evinger-Westphal mag neuronjaiban. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; *** $p < 0,001$; $n = 8$. au: arbitrary unit/önkéntes egység.



21. ábra: Az urocortin 1 (UCN1) peptid (zöld) tartalom változása kontroll (A, C) és *single prolonged* stressznek (SPS) kitett (B, D) tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhíányos (KO) egerek centrális projekciójú Edinger-Westphal magjának urocortinerg neuronjaiban. Méretség: 25 μ m.

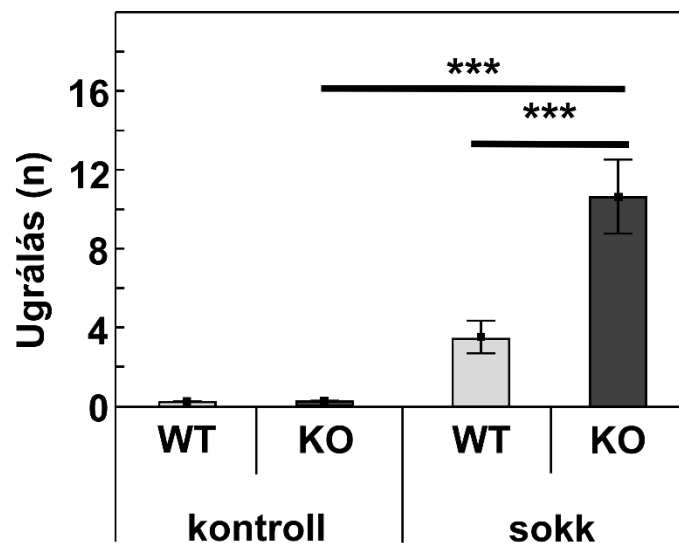
4.4.2 Elektrosokk PTSD modell

Az elektromos lábsokkal kiváltott PTSD modellben - az emlékeztető szituáció alkalmazásával jelentősen fokozott lefagyás volt detektálható mindkét stressznek kitett csoportban a kontroll (nem sokkolt) állatokhoz képest, szignifikáns stressz főhatással az ANOVA során ($F_{\text{sokk}}(1,36) = 307,33, p < 0,0001$, Tukey-féle *post hoc* összehasonlítással mind a $p_{\text{WT kontroll/WT sokk}}$, mind pedig a $p_{\text{KO kontroll/KO sokk}} < 0,0002$), ugyanakkor a genotípus esetén szignifikáns főhatás nem volt igazolható ($F_{\text{genotípus}}(1,36) = 0,05, p > 0,81$), illetve a genotípus és stressz közötti szignifikáns kölcsönhatás sem volt kimutatható $F_{\text{interakció}}(1,36) = 0,05, p > 0,81$) (22. ábra).



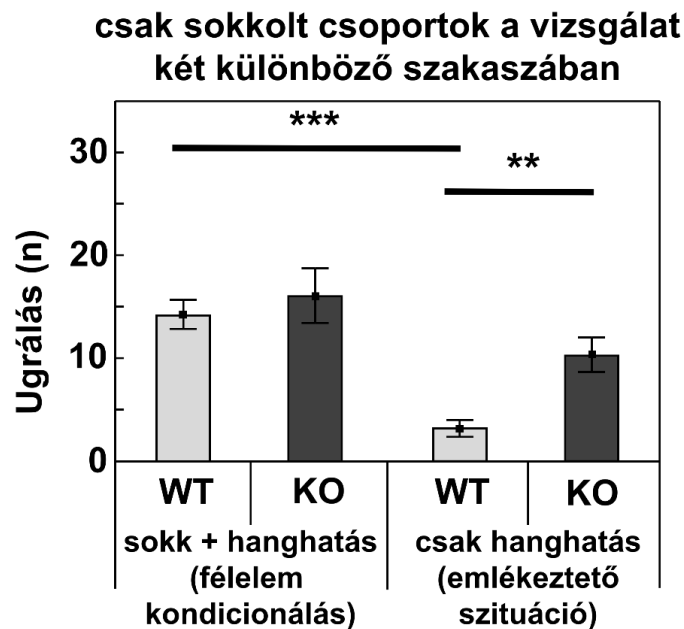
22. ábra: A poszttraumás stressz betegség elektrosokk modelljében az emlékeztető szituáció alkalmazása során megfigyelhető, kondicionált félelemválaszt reprezentáló lefagyás százalékos időtartama tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhiányos (KO) egerekben. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; *** $p < 0,001$; $n = 9-12$.

Mindemellett a sokkra emlékeztető hanghatás használata jelentősen fokozott ugrálási gyakoriságot eredményezett a stressznek kitett KO állatokban kontroll társaikhoz képest ($p < 0,0002$), míg a WT egereknél hasonló eltérés nem volt detektálható ($p > 0,12$), szignifikáns stressz főhatással az ANOVA során ($F_{\text{sokk}} (1,36) = 42,63, p < 0,0001$). A genotípus főhatásban megfigyelhető különbség háttérében ($F_{\text{genotípus}} (1,36) = 11,63, p < 0,002$) a stresszelt KO állatoknak az emlékeztető szituáció során a WT egerekhez viszonyított fokozott ugrálási gyakorisága állt ($p < 0,0003$), ami a két változó közötti szignifikáns kölcsönhatással együtt volt kimutatható ($F_{\text{interakció}} (1,36) = 11,63, p < 0,002$) (23. ábra).



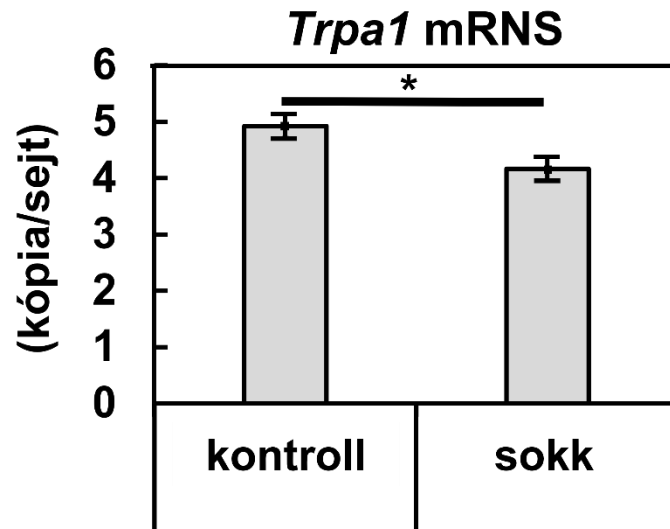
23. ábra: A poszttraumás stressz betegség elektrosokk modelljében az emlékeztető szituáció alkalmazása során megfigyelhető, kulcsinger (hanghatás) által kiváltott ugrálás gyakorisága tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhíányos (KO) egerekben. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; *** $p < 0,001$; $n = 9-12$.

Ugyanakkor a sokk leadása során (a félelem kondicionálás fázisában) nem volt különbség a két sokkolt genotípus ugrálásának gyakorisága között ($p > 0,97$), vagyis a sokknak kitett KO állatok csak az emlékeztető szituáció alkalmazása alatt ugráltak többet WT társaikhoz képest ($p < 0,002$), szignifikáns genotípus főhatással az ANOVA során ($F_{\text{genotípus}}(1,38) = 9,64$ $p < 0,004$). Mindemellett a sokkolt KO állatoknál nem volt statisztikailag igazolható különbség az ugrálásban a két alkalom között (sokk leadása, illetve az emlékeztető szituáció, $p > 0,16$), míg a WT egerek ugrálási gyakorisága az emlékeztető során jelentősen csökkent a sokk leadásának szakaszához képest ($p < 0,0002$), az ANOVA során szignifikáns főhatással az alkalomra ($F_{\text{alkalom}}(1,38) = 29,44$, $p < 0,0001$), illetve a két változó közötti kölcsönhatásra ($F_{\text{interakció}}(1,38) = 6,31$, $p < 0,02$) (24. ábra).

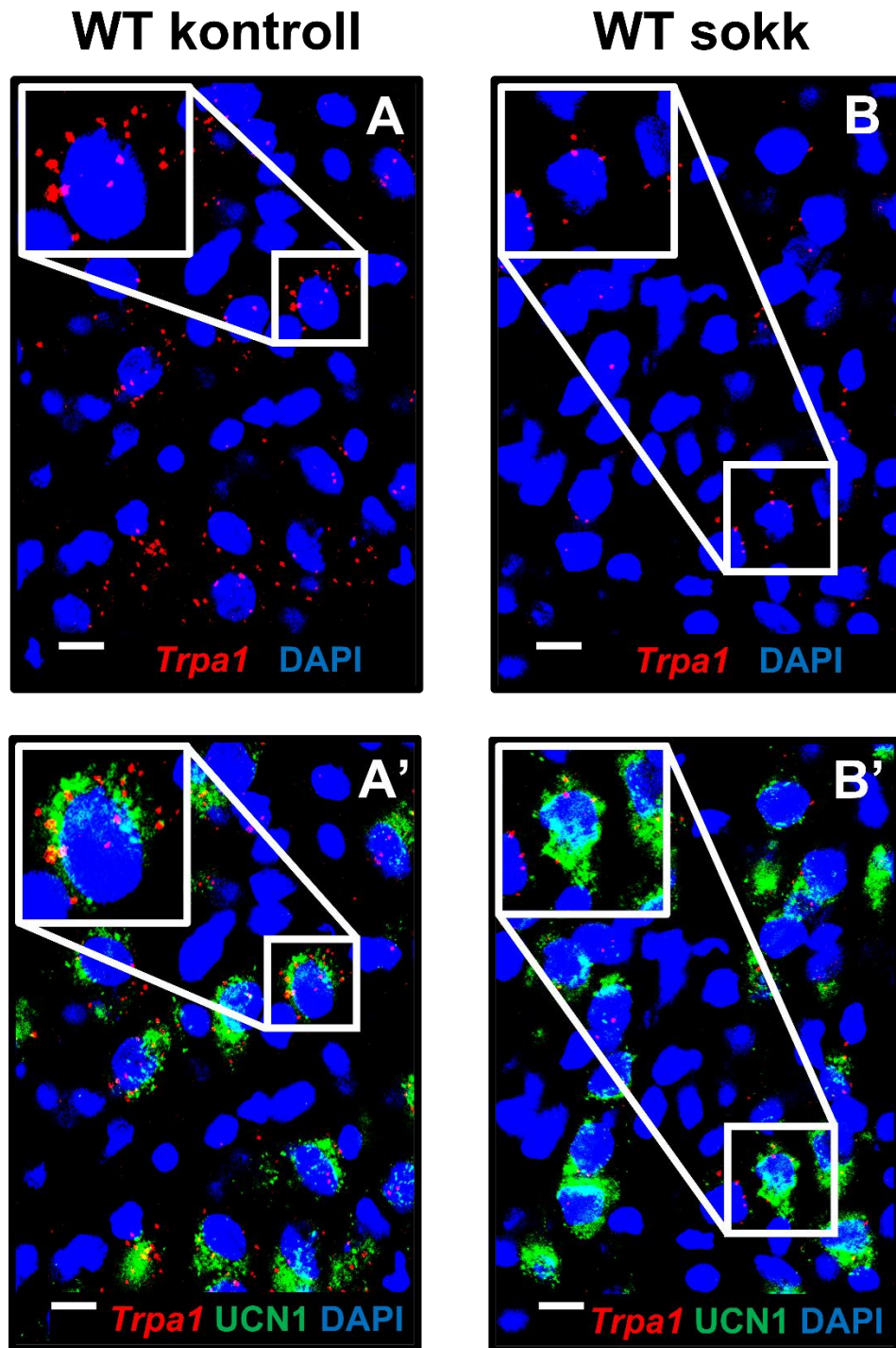


24. ábra: A félelem kondicionálási, valamint a szituációs emlékeztető szakaszok során detektált különbségek az ugrálás gyakoriságában az elektrosokknak kitett tranzien receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhiányos (KO) állatokban. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 9-12$.

A PTSD kiváltását követően szignifikánsan alacsonyabb számú *Trpa1* mRNS expressziót detektáltunk a stressznek kitett WT állatok EWcp urocortinerg neuronjaiban a kontroll csoporthoz képest ($t_{\text{kópia/sejt}}(2,14) = 2.494, p < 0,03$) (25. és 26. ábra).

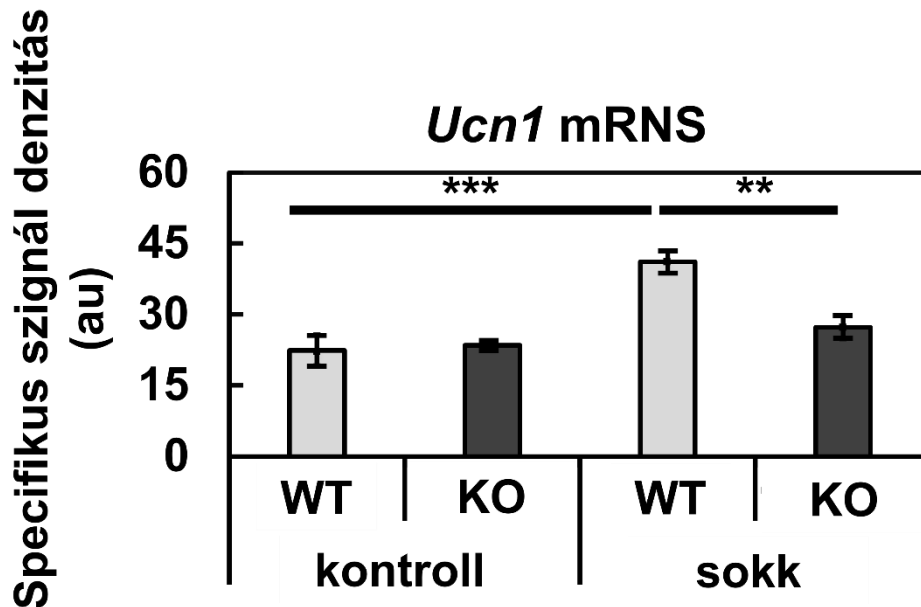


25. ábra: Az elektromos lábsokk hatására bekövetkező sejtenkénti tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (*Trpa1*) mRNS kópiaszám változása vad típusú állatok centrális projekciójú Evinger-Westphal magjának neuronjaiban. Kétmintás t-próba; * $p < 0,05$; $n = 8$.

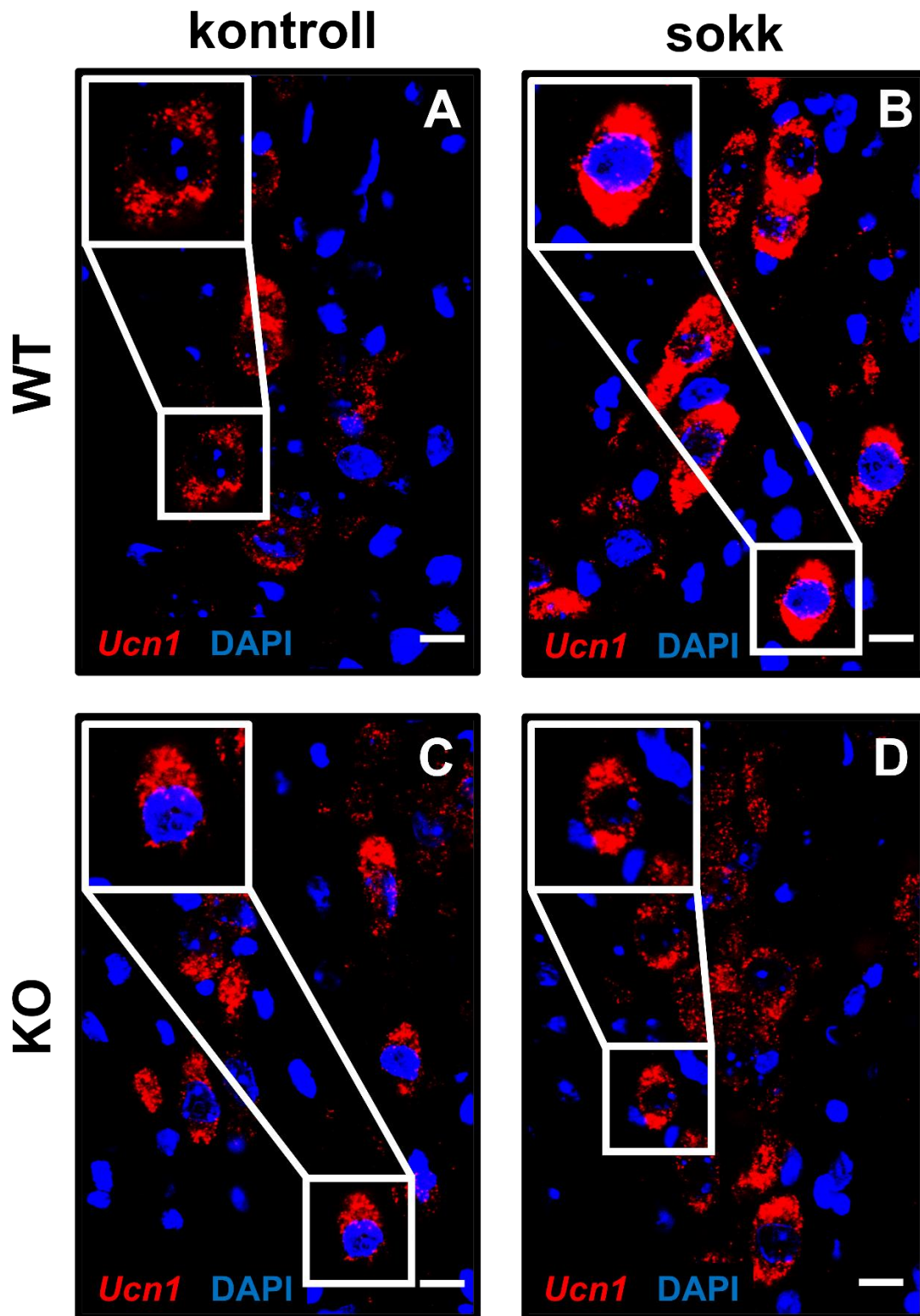


26. ábra: Az elektromos lábsokk modell hatása a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) urocortinerg neuronjain található tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (*Trpa1*) mRNS expresszióra. Reprezentatív fotók a *Trpa1* mRNS (piros) expresszióról vad típusú (WT) egerek EWcp neuronjaiban (A). A sokk hatása a *Trpa1* mRNS expresszióra (B). A *Trpa1* mRNS és az urocortinerg sejtek kolokalizációjának megállapításához urocortin 1 (UCN1; zöld) immunfluoreszcenciát alkalmaztunk (A', B'). A sejtmagok vizualizálásához 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk (kék). Méretség: 25 μ m.

A további RNAscope-os vizsgálat során szignifikánsan magasabb *Ucn1* mRNS expressziót észleltünk a WT állatokban az elektromos lábsokk alkalmazását követően ($F_{\text{sokk}} (1,26) = 21,94$, $p < 0,0001$), míg a KO egerekben hasonló sokk-indukálta változások nem voltak megfigyelhetők ($F_{\text{genotípus}} (1,26) = 7,08$, $p < 0,02$), amit a két változó között kimutatható szignifikáns kölcsönhatás is igazolt ($F_{\text{interakció}} (1,26) = 9,60$, $p < 0,005$; Tukey-féle *post hoc* összehasonlítással a $p_{\text{WT kontroll/WT sokk}} < 0,0002$, a $p_{\text{WT sokk/KO sokk}} < 0,002$ (27. és 28. ábra).

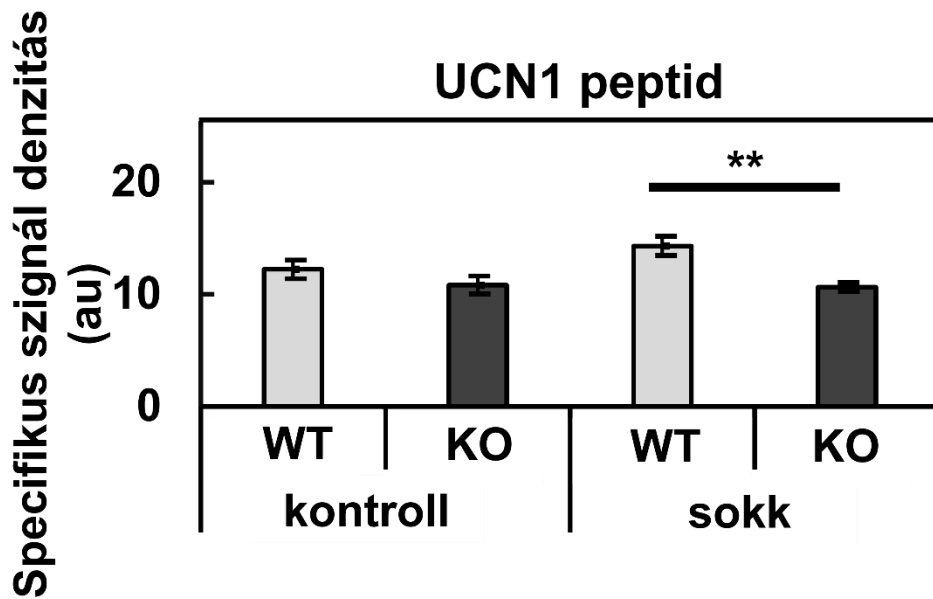


27. ábra: Az elektromos lábsokk hatására bekövetkező urocortin 1 (*Ucn1*) mRNS specifikus jelenség változása tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és géniányos (KO) állatok centrális projekciójú Edinger-Westphal mag neuronjaiban. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* teszttel; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 8$. au: *arbitrary unit*/önkényes egység.

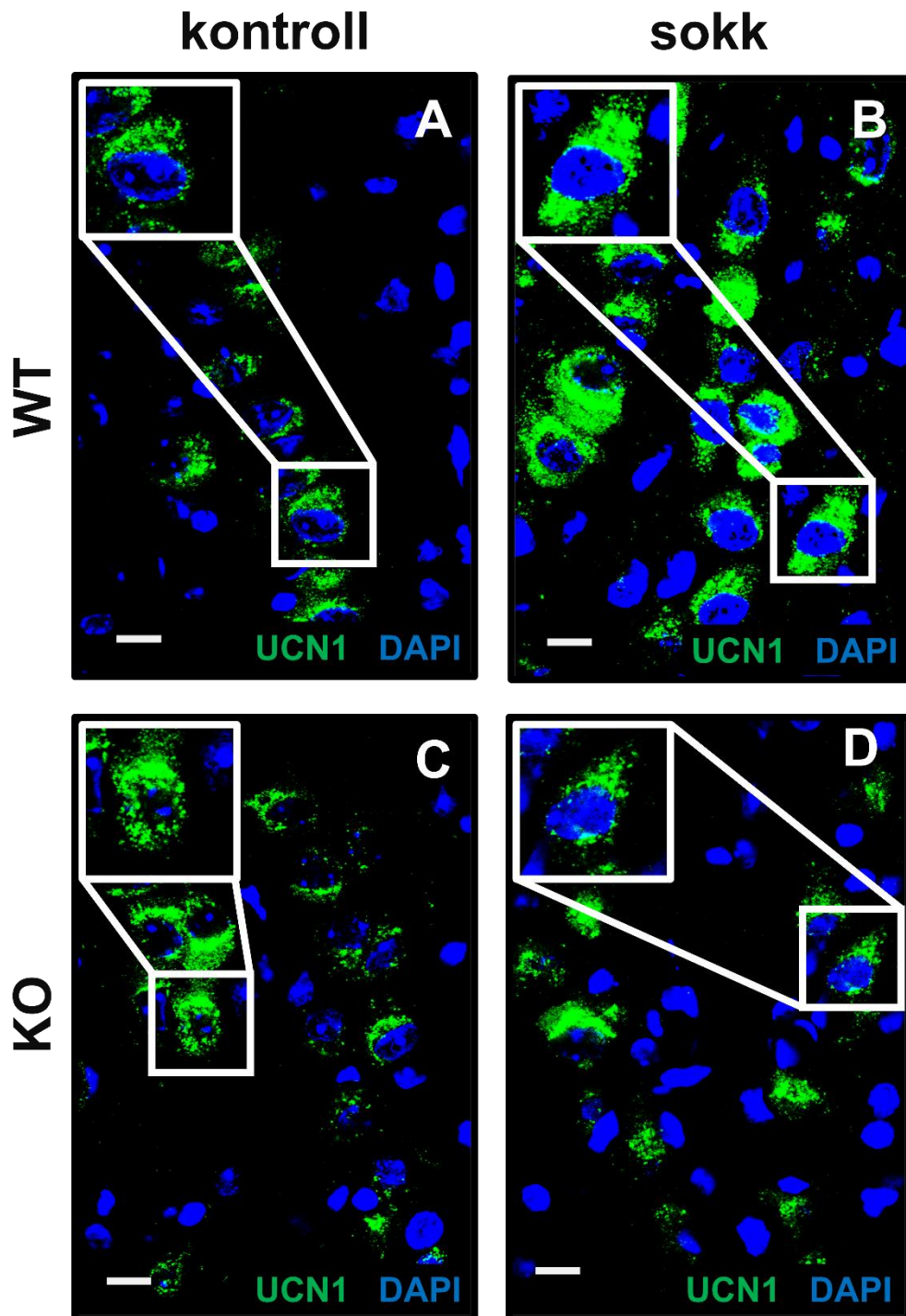


28. ábra: Az urocortin 1 (*Ucn1*) mRNS (piros) expressziójának változása kontroll (A, C) és sokknak kitett (B, D) tranzien receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és géniányos (KO) egerek centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) urocortinerg neuronjaiban. A sejtmagok vizualizálására 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk (kék). Méretség: 25 μ m.

Az UCN1 immunfluoreszcencia során bár a sokk hatására az UCN1 mennyisége egyik genotípusnál sem változott szignifikáns mértékben ($F_{\text{sokk}}(1,26) = 1,59, p > 0,21$), ugyanakkor a peptid tartalom sokk által kiváltott tendenciózus növekedése, mely csak WT állatokban volt megfigyelhető (Tukey-féle *post hoc* összehasonlításnál $p_{\text{WT kontroll/WT sokk}} = 0,25$, míg $p_{\text{KO kontroll/KO sokk}} > 0,99$) a genotípus főhatás szignifikáns különbségével társult ($F_{\text{genotípus}}(1,26) = 11,87, p < 0,002$, a *post hoc* teszt során $p_{\text{WT sokk/KO sokk}} < 0,008$), a két változó közötti szignifikáns kölcsönhatás nélkül ($F_{\text{interakció}}(1,26) = 2,28, p > 0,14$) (29. és 30. ábra).



29. ábra: Az elektromos lábsokk hatására bekövetkező urocortin 1 (UCN1) peptid specifikus jelenség változása tranziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és géniányos (KO) állatok centrális projekciójú Edinger-Westphal mag neuronjaiban. Kétutas ANOVA Tukey-féle *post-hoc* tesztel; ** $p < 0,01$; $n = 8$. au: *arbitrary unit*/önkéntes egység.



30. ábra: Az urocortin 1 (UCN1) peptid (zöld) tartalom változása kontroll (A, C) és sokknak kitett (B, D) transziens receptor potenciál ankyrin 1 vad típusú (WT) és génhíányos (KO) egerek centrális projekciójú Edinger-Westphal magjának urocortinerg neuronjaiban. A sejtmagok vizualizálására 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk (kék). Méretség: 25 μ m.

5. DISZKUSSZIÓ

Elsőként igazoltuk a *Trpa1* mRNS expresszióját a szaglópálya területén. RNAscope ISH vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy a *Trpa1* mRNS jelentős kópiaszámban expresszálódik a BO GABAerg, illetve kisebb mértékben annak glutamáterg neuronjain, ugyanakkor a PC területén kizárólag a glutamáterg sejtekkel való kolokalizációt sikerült igazolni. A *Trpa1* WT és KO állatokon elvégzett szagaverziós vizsgálatok megerősítették továbbá a TRPA1 ioncsatorna szerepét a predátor szaggal kiváltott veleszületett félelemválasz kialakulásában, melyet más szakirodalom is alátámaszt (Wang és mtsai. 2018). Az *in vitro* vizsgálati eredményeink, melyek során TRPA1-overexpresszáló CHO sejtvonalakon vizsgáltuk a 2-MT és a valeriánsav hatását ugyanakkor megerősítették, hogy kizárólag a rókaszagot imitáló 2-MT képes közvetlenül aktiválni a TRPA1 receptorokat.

A rókaszag közvetlen aktivátorként képes hatni a szaglópályában található kemoszensor tulajdonságú TRPA1 receptorokon (Wang és mtsai. 2018), amit kutatócsoportunk a 2-MT alkalmazása során a TRPA1-et expresszáló CHO sejtekben mért Ca^{2+} -beáramlás meghatározásával mind egér, mind pedig humán receptorok esetében igazolt. Ugyanakkor az általunk elvégzett kísérletekben a 2-MT EC_{50} -el jellemezhető hatékony koncentrációja egy nagyságrenddel nagyobb volt a korábban közölt eredményekhez képest (Wang és mtsai. 2018). A különbségek hátterében a felhasznált sejtvonalak közötti különbségek, valamint az eltérő kísérleti elrendezés állhat. Másfelől a macskaszagot imitáló valeriánsavat alkalmazva egyik TRPA1-et overexpresszáló sejtvonalon sem sikerült fokozott Ca^{2+} -beáramlást igazolni. Ennek magyarázata az lehet, hogy a nyílt láncú, telített monokarbonsavak homológ sorába tartozó valeriánsav szerkezetéből adódóan nem rendelkezik elektrofil tulajdonságokkal, ezért feltehetően nem képes közvetlenül befolyásolni a TRPA1 receptorok működését. Érdekes módon ugyanakkor a WT és a KO egerek viselkedésében különbséget tapasztaltunk valeriánsav alkalmazása esetén is, bár ezen eltérések jóval kevésbé voltak kifejezettek, mint a rókaszag expozíció során. A macskaszag alkalmazásánál bár a két genotípus közötti különbség detektálható volt ugyan, ez az eltérés azonban csak a KO állatoknak a WT társaikhoz képest a szagot tartalmazó cső hosszabb idejű és gyakoribb szagolgtatásában nyilvánult meg, míg a lefagyási reakciót egyáltalán nem érintette. A kétféle predátor szagra adott különböző viselkedési válaszok egyik lehetséges magyarázata, hogy a valeriánsav szaga általánosságban kevésbé félelmetes az egerek számára: rókaszagot alkalmazva a lefagyási reakció a teljes időtartam mintegy 45%-át tette ki a WT egereknél, míg a KO állatokban mindössze 10% volt, ezzel szemben a macskaszag alkalmazása során a WT egerekben kb. 10%, míg a KO állatokban

mintegy 5% volt ennek a paraméternek a hossza. Bár a korábban részletezett eredmények alapján a TRPA1 ioncsatorna hozzájárul ugyan a predátor szagra adott viselkedési eltérésekhez, azonban annak hiánya általánosságban nem csökkenti a félelemválasz mértékét. Ezt támasztja alá egy korábbi tanulmány is, mely során az egerek kondicionális félelem válaszát vizsgálva (melynek kialakulásában az *amygdala*, a hippokampusz és a PFC közötti interakciók játszanak szerepet (Moustafa és mtsai. 2013)) a *Trpa1* KO állatokban fokozott lefagyási reakció volt kimutatható (Lee és mtsai. 2017). Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a szaginger irányába mutatott érdeklő viselkedés kiváltásában inkább a szaglórendszer centrális részein (pl.: BO vagy PC) található TRPA1 receptorok szerepe lehet hangsúlyosabb, nem pedig a OE területén expresszáldó ioncsatornáké. Ezen hipotézisünket erősíti meg, hogy egyrészt az OE területén nagyon alacsony *Trpa1* expressziót mértünk, másrészt az itt található receptorok inkább az irritáló anyagok szaglása kapcsán kialakuló fájdalomérzet közvetítésében játszanak szerepet (Talavera és mtsai. 2020). A TRPA1 agonisták (ideértve a rókaszagot is) közvetlenül képesek aktiválni a szaglópályaiban lévő trigeminális nociceptorokat, melyek a lokális fájdalomválasz kiváltásában játszanak szerepet (Talavera és mtsai. 2020), ezáltal jelentősen befolyásolva az állatok viselkedési válaszait. A kialakuló fájdalom, illetve a PC és a PVN közötti közvetlen kapcsolat (Kondoh és mtsai. 2016) fokozhatja a neuronális aktivitást a stresszre érzékeny agyterületeken (pl.: PAG és PVN) (Wang és mtsai. 2018), valamint egyes limbikus rendszeri struktúrákban (pl.: hippokampusz, BNST) (Matsukawa és mtsai. 2016). A *Trpa1* KO állatok a 2-MT kezelésre emelkedett ACTH szintekkel reagáltak, míg a kortikoszteronszintekben genotípus eltérések nem voltak detektálhatók. Az ellentmondásosnak tűnő megfigyelést a KO egerek kevésbé kifejezett lefagyási reakciójához társuló fokozott mozgékonyásával magyarázhatjuk, melyet egy korábbi tanulmány során a lokomotoros aktivitás és az ACTH szint között leírt összefüggés is megerősít (White-Welkley és mtsai. 1995). Egy másik tanulmányban, szemben az általunk kapott eredményekkel, a 2-MT alkalmazása során a KO állatokban kisebb mértékű kortikoszteronszint emelkedést mutattak ki a WT társaikhoz képest (Wang és mtsai. 2018). A különbség hátterében a 2-MT két vizsgálatban alkalmazott eltérő koncentrációja, valamint a kísérletek eltérő időtartama állhat. Vizsgálataink során a valeriánsav alkalmazásával egyik fent említett stressz hormon szintjében sem volt detektálható eltérés a két genotípus között. Ez az eredmény további bizonyítékkal szolgál arra, hogy a különböző szagok érzékelése eltérő útvonalakat aktiválhat, melyeknél a TRPA1 receptorok különböző folyamatokat befolyásolhatnak (pl.: rókaszag esetében a TG által mediált fájdalom stressz tengely aktivációt idézhet elő, míg macskaszagnál az OB/PC útvonal az állatok viselkedésének alakításában játszhat szerepet).

A TRPA1 szaglásban betöltött jelentőségének igazolására, kimutattuk annak jelenlétét a szaglórendszer egyes központi idegrendszeri részein. Ugyanakkor az OE területén elvégzett immunfluoreszcenciával kombinált RNAscope vizsgálat során a *Trpal* mRNS csak alacsony kópiaszámban volt kimutatható a szaglóhámban, és egyáltalán nem kolokalizált az OSN-re specifikus anti- β -tubulin III immunmarkerrel (Lee és Pixley 1994; Packard és mtsai. 2016), mely felveti, hogy a receptor más OE struktúrákon (pl.: a trigeminális neuronok végződésein vagy a B-sejteken) expresszálódhat (Koike és mtsai. 2021). A TRPA1 receptorfehérje szintézise túlnyomórészt a TG neuronok perikarionjában történhet, ahol korábban már mRNS szinten igazolták a *Trpal* expresszióját (Diogenes és mtsai. 2007; Nilius és mtsai. 2007; Marone és mtsai. 2018), így hozzájárulva különböző élettani-kórélettani állapotok kialakulásához (Talavera és mtsai. 2020). A BO központi szerepet tölthet be az averzív szagingerek hatásainak kialakításában, mivel ezen a területen a *Trpal* mRNS mérsékelt expresszióját mutattuk ki. Az RNAscope technika során alkalmazott hármassal jelöléssel a *Trpal* mRNS-t legnagyobb kópiaszámban a GABAerg gátló neuronokon tudtuk detektálni, bár a glutamáterg idegsejteken -ugyan jóval kisebb mennyiségben - szintén kimutatható volt néhány *Trpal* transzkript. Az így kapott eredményeinket egy korábbi tanulmány is megerősíti, mely során valós idejű PCR technikát alkalmazva BO-ból származó mintákon a *Trpal* mRNS jelenlétét sikerült igazolni, továbbá *single-cell* PCR módszerrel megerősítették annak expresszióját a glutamáterg mitrális, valamint a GABAerg szemcse-sejteken is (Dong és mtsai. 2012). Jelen tudásunk szerint kutatócsoportunk elsőként mutatta ki továbbá, hogy a *Trpal* mRNS a PC területén is expresszálódik, kizárólag a *Vglut1* pozitív glutamáterg neuronokon. Ezen sejtek tekinthetők a PC fő neuron típusának, melyekhez más szaglórendszeri struktúrákból (pl.: OB), limbikus területekről (pl.: BLAM), valamint az agy számos más részéről is érkezik ingerület. Az itt található sejtek szerteágazó afferentációja határozza meg az információ kódolásának formálását (Wang és mtsai. 2020).

A fent részletezett viselkedés vizsgálatok, valamint morfológiai eredmények felvetik a TRPA1 receptornak a szaginformáció centrális feldolgozásában, illetve a különböző szagok által kiváltott viselkedési mintázatok alakításában betöltött szerepét.

Munkacsoportunk korábbi kísérletei során a *Trpal* mRNS expresszió csökkenését figyeltük meg az EWcp/UCN1 neuronjain a depresszió CVMS egérmodelljében, valamint öngyilkos személyekből származó humán mintákban (Kormos és mtsai. 2022). Ez a megfigyelés felveti a lehetőségét, hogy az UCN1 neuronokon expresszálódó TRPA1 receptorok szerepet játszhatsanak a stresszre adott adaptív válaszok szabályozásában, és ezáltal érintettek lehetnek bizonyos

stressz adaptációs zavarok, például a PTSD pathomechanizmusában. Korábbi tanulmányok közvetlen kapcsolatot mutattak ki az EWcp, valamint a PTSD kialakulásában érintett leglényegesebb agyi struktúrák (PFC, *amygdala* és hippokampusz) között (Li és mtsai. 2018; Zuniga és Ryabinin 2020; Priest és mtsai. 2021; Topilko és mtsai. 2022). A közlemények szerint egyrészt az EWcp területéről efferens rostok érkezik a PFC-hez, valamint az *amygdala* egyes magcsoportjaihoz (Zuniga és Ryabinin 2020; Priest és mtsai. 2021; Topilko és mtsai. 2022), másrészt az EWcp közvetlen afferenseket kap a hippokampusz - szerotonin receptor 2c izoformát expresszáló - piramis sejtjeitől (Li és mtsai. 2018). A PTSD pathomechanizmusában érintett mindhárom agyterületen (PFC, *amygdala*, hippokampusz) kimutatható a CRH receptorok jelenléte (Deussing és Chen 2018), további összefüggést sugallva ezen stressz adaptációs zavar és az EWcp között.

A fentiek alapján feltételeztük, hogy az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronjainak szerepe lehet a PTSD kialakulásában, melynek igazolásához két különböző PTSD modellben (SPS és elektromos lábsokk) vizsgáltunk *Trpa1* WT és KO állatokat. Az SPS modell transzlációs értékét az adja, hogy a legtöbb humán PTSD-s betegnél, a kórkép kialakulásához kombinált stresszorok vezetnek (Lisieski és mtsai. 2018), melyek a stresszorokra adott fokozott félelemválaszhoz és annak csökkent kioldódásához vezetnek (Yamamoto és mtsai. 2008; Ganon-Elazar és Akirav 2012; Perrine és mtsai. 2016). Ezzel szemben az elektrosokk modell jelentősége abban áll, hogy jól tükrözi a félelem asszociációhoz szükséges hippokampusz, illetve a félelem-függő memóriához szükséges *amygdala* funkciókat (Lee és mtsai. 2017), és az így kialakuló kondicionált félelem válasz modellezni képes egyes PTSD-re jellemző tüneteket (pl.: kontextus/kulcsinger hatására kialakuló lefagyási reakció és *hyperarousal*) (Török és mtsai. 2019).

A validálás során mindkét kísérleti paradigma (SPS és elektromos lábsokk) alkalmasnak bizonyult a PTSD modellezésére, mivel a *Trpa1* WT egerek mind az SPS után elvégzett FST és *restraint* stressz, mind pedig a sokkot követően alkalmazott emlékeztető szituáció során a betegségre jellemző fokozott immobilitást/lefagyást mutattak (Yamamoto és mtsai. 2009; Serova és mtsai. 2013; 2014; Sabban és mtsai. 2015; Bentefour és mtsai. 2015; Verma és mtsai. 2016; Schöner és mtsai. 2017; Lisieski és mtsai. 2018; Török és mtsai. 2019; Verbitsky és mtsai. 2020). A FST során igazoltuk továbbá, hogy a TRPA1 ioncsatornák funkcionális hiánya megakadályozhatja egyes stressz-függő viselkedési változások kialakulását, ami összhangban van az irodalomban leírt eredményekkel (De Moura és mtsai. 2014; Kormos és mtsai. 2022). Ugyanakkor szemben egy korábbi közlemény eredményeivel, mely szerint a *Trpa1* KO állatok

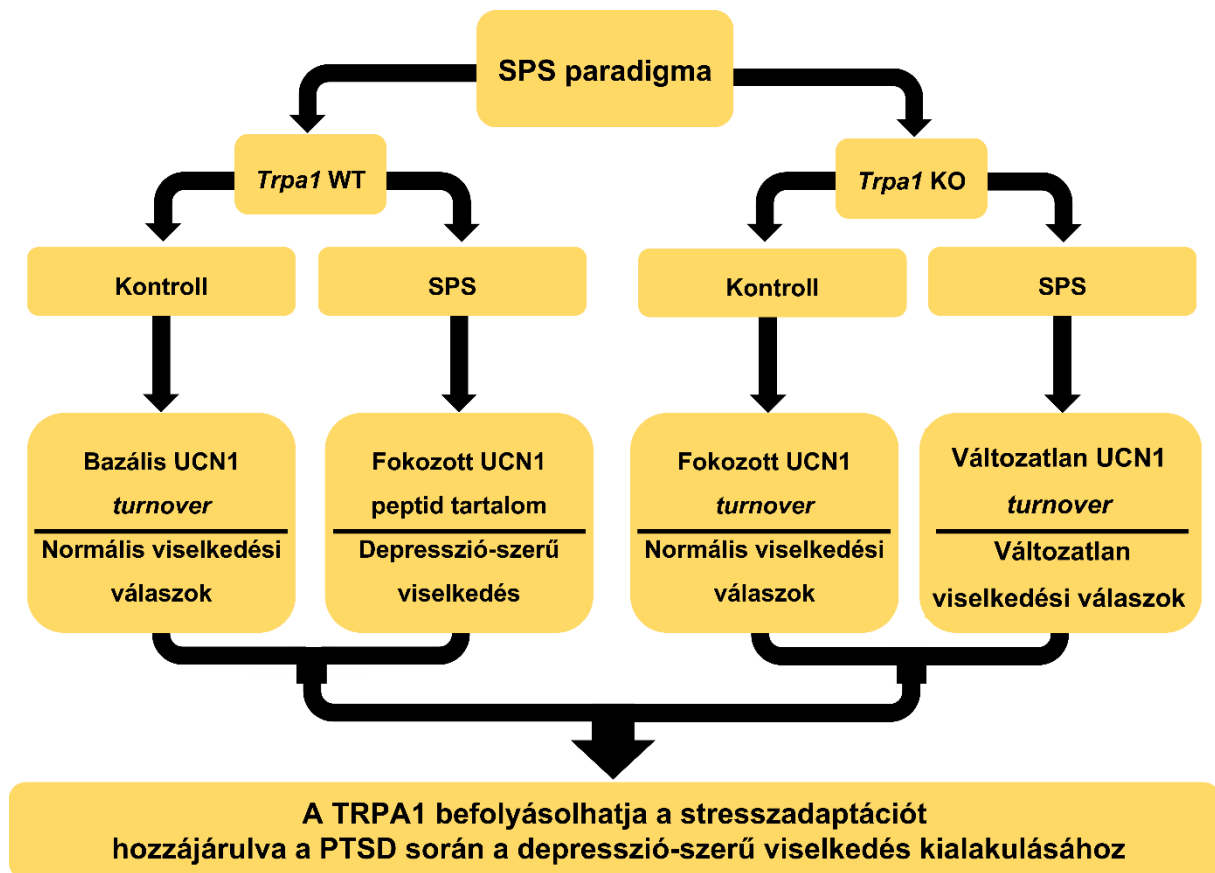
a lábsokkot követően alkalmazott emlékeztető szituáció során fokozott lefagyási választ mutatnak WT társaikhoz képest (Lee és mtsai. 2017), hasonló eltérést a két genotípus lefagyásának időtartamában nem detektáltunk. Ezen eltérő eredmények hátterében a sokk protokollok eltérő kísérleti elrendezése, valamint az alkalmazott lábsokk fizikai paramétereinek különbözősége állhat. Lényeges azonban, hogy a sokk modellben a KO egerek általunk tapasztalt fokozott ugrálási gyakorisága hasonlóan a lefagyáshoz a kondicionált félelemválasz/félelem-függő memória jellemzésére használható paraméter, és mindkét viselkedési mintázat kialakulásában a CeA tölt be kulcsszerepet (Hitchcock és mtsai. 1989; Davis 1992; Sonner és mtsai. 1998; Lee és mtsai. 2017). Hangsúlyozni kell ugyanakkor, hogy míg a lefagyási reakció hátterében - ami feltehetően a predátorral szembeni passzív védekezést szolgálja - elsősorban a PAG aktivációja áll (Hammer és Kapp 1986; Davis 1992; Kim és mtsai. 1993; Farook és mtsai. 2004; Török és mtsai. 2019), addig az akusztikus riasztó ingerekkel (ASS) kiváltott ugrálás a *locus coeruleus* felerősödött noradrenerg neurotranszmissziója és a következményes szimpatoadrenomedulláris aktiváció által mediált - pszichomotoros nyugtalanságot jelző - fokozott izgalmi állapotnak (*hyperarousal*) tekinthető (Hitchcock és mtsai. 1989; Davis 1992; Sonner és mtsai. 1998; Kohda és mtsai. 2007; Gresack és Risbrough 2011; Sauerhöfer és mtsai. 2012; Fifield és mtsai. 2015; Török és mtsai. 2019; Stauffer és mtsai. 2022). A fentiek alapján feltételezhető, hogy a TRPA1 receptorok funkcionális ablációja a CeA által meghatározott félelem kondicionálást felerősíti és/vagy annak kioltását nehezíti, ami - az irodalomban leírt, kifejezettebbé váló passzív elkerülő viselkedés mellett (Lee és mtsai. 2017) - eleve fokozottabb vagy tartósabban magas szinten perzisztáló izgalmi állapotot eredményez a KO állatoknál. Az SPS és a sokk modell során detektált - viselkedési paramétereket érintő - eltérések további bizonyítékot szolgáltathatnak arra, hogy a TRPA1 ioncsatornáknak szerepe lehet a PTSD pathomechanizmusában.

Mivel a *Trpa1* mRNS legnagyobb kópiaszámában a stressz adaptáció szabályozásában is kulcsszerepet betöltő EWcp/UCN1 neuronjain expresszálódik, ezért a továbbiakban morfológiai vizsgálatokat végeztünk ezen agyterületen. Ennek során mindkét modellnél sikerült reprodukálnunk munkacsoportunk korábbi eredményeit, melyek szerint a *Trpa1* az EWcp-ben kizárólag az UCN1 tartalmú sejteken mutatható ki (Kormos és mtsai. 2022; Al-Omari és mtsai. 2023). Ezt követően igazoltuk, hogy WT állatokban mind az SPS, mind pedig az elektrosokk alkalmazását követően szignifikánsan csökkent a *Trpa1* mRNS expressziója, ami szintén összhangban áll a CVMS modellben kapott korábbi eredményeinkkel (Kormos és mtsai. 2022). A TRPA1 stressz adaptációs zavarokban betöltött humán transzlációs jelentőségét

hangsúlyozza továbbá, hogy korábbi eredmények szerint a *TRPA1* mRNS downregulációja figyelhető meg öngyilkos személyekből származó EWcp mintákban is (Kormos és mtsai. 2022). A *Trpa1* fent ismertetett stressz modellekben bekövetkező downregulációja miatt felmerül ugyanakkor a kérdés, hogy milyen mechanizmus állhat ezen változás hátterében. Farmakológiai szempontból nézve az egyik lehetséges magyarázat a *Trpa1* - agonista-receptor kölcsönhatás által előidézett - downregulációja lehet, mely folyamat a túlzott receptor aktiváció következtében létrejövő elnyújtott agonista hatást hívatott megelőzni (Rang és mtsai. 2018). Ilyen negatív *feedback* alapon kialakuló receptorszám csökkenést idézhetnek elő a környező gliasejtekből származó reaktív szabad gyökök (Hori és Kim 2019; Oroian és mtsai. 2021), ideértve egyes prosztanoidokat és lipidperoxidációs termékeket (Logashina és mtsai. 2019; Talavera és mtsai. 2020), valamint az oxidatív stressz és a neuroinflammáció során felszabaduló mediátorok, melyek igazoltan szerepet játszanak a PTSD pathomechanizmusában (Yehuda 1998; Kasckow és mtsai. 2001; Rohleder és mtsai. 2010; Ozdemir és mtsai. 2012; Aschbacher és mtsai. 2013; Bulut és mtsai. 2013; Miller és mtsai. 2015; Atli és mtsai. 2016; Stoop 2016; Miller és mtsai. 2018; Hori és Kim 2019; Oroian és mtsai. 2021). További farmakológiai vizsgálatok szükségesek az említett gyulladási mediátorok - EWcp területén található *Trpa1* expressziójára gyakorolt - feltételezett szabályozó hatásainak pontos meghatározásához. Limitációként említendő, hogy megbízható antitest hiányában a TRPA1 fehérje szintű változásait nem tudjuk vizsgálni a PTSD modellekben. Fontos azonban, hogy elektrofiziológiai módszer segítségével igazoltuk funkcionálisan aktív TRPA1 ioncsatornák jelenlétét az EWcp/UCN1 neuronjain (Al-Omari et al 2023), illetve a jövőben tervezzük, hogy fluoreszcens specifikus TRPA1 ligandum segítségével állapítanánk meg a receptorfehérje központi idegrendszeri lokalizációját.

A stressz adaptációhoz társuló viselkedési válaszokban betöltött szerepe mellett, morfológiai vizsgálatokkal igazoltuk a TRPA1 receptorok EWcp/UCN1 neuronokra kifejtett hatását. Ezek során a WT egereknél egyrészt kimutattuk, hogy mindkét PTSD modellben a *Trpa1* mRNS expressziójának csökkenésével párhuzamosan fokozódott az UCN1 peptid tartalom. Másrészt a WT állatokban mind az SPS során, mind pedig elektromos lábsokkot alkalmazva fokozott *Ucn1* mRNS expressziót detektáltunk a kontroll csoporthoz képest, bár ezen különbség csak a sokk paradigma esetén bizonyult szignifikánsnak, SPS-nél csupán a tendencia volt kimutatható. Ugyanakkor az ioncsatorna funkcionális hiánya esetén - KO állatokban - egyik PTSD modell alkalmazásának hatására sem következett be szignifikáns fokozódás a neuronális *Ucn1* mRNS vagy UCN1 peptid tartalomban a kontroll csoporthoz képest.

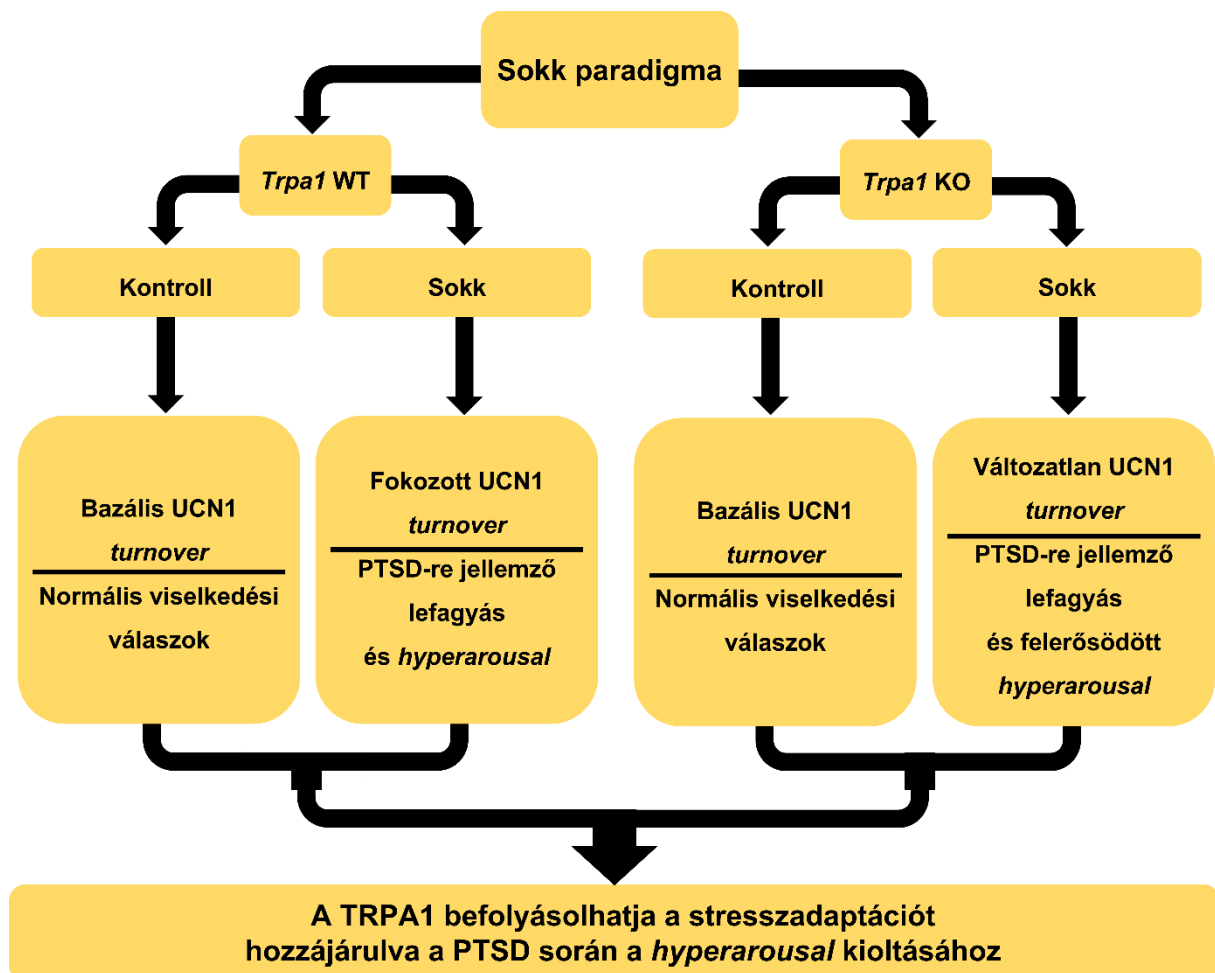
Lényeges, hogy az SPS-nek kitett génhíányos állatoknál észlelt hiányzó *Ucn1*/UCN1 expresszió fokozódás összhangban van az immobilitás - FST során detektált - változatlan időtartamával. Ezen megváltozott stressz válasz háttérében a KO állatok EWcp/UCN1 sejtjeinek beszűkült adaptációs képessége állhat, mely mind a WT egerekhez viszonyított magasabb bazális *Ucn1* mRNS expressziós szintekben, mind pedig az SPS-re adott hiányzó viselkedési és urocortinerg válaszokban is megmutatkozik (31. ábra).



31. ábra: A *single prolonged* stressz (SPS) modell során tapasztalt eredmények összefoglalása. *Trpa1*: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 mRNS, TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 ioncsatorna, UCN1: urocortin 1 peptid, PTSD: poszttraumás stressz betegség, WT: vad típus, KO: *Trpa1 knockout*.

Ezzel szemben elektrosokkot alkalmazva a KO állatoknál megfigyelhető hiányzó *Ucn1* mRNS és UCN1 peptid tartalom fokozódás a WT egerekhez viszonyított fokozott ugrálási gyakorisággal járt együtt a szituációs emlékeztető során, ami a PTSD-re jellemző *hyperarousal*-al ekvivalens viselkedési mintázatnak tekinthető (Hitchcock és mtsai. 1989; Gresack és Risbrough 2011; Török és mtsai. 2019; Stauffer és mtsai. 2022). Irodalmi adatok szerint az EWcp/UCN1 neuronjai a stressz adaptáció késői fázisában a normális homeosztázis helyreállításához és a stresszválasz megszűnéséhez járulhatnak hozzá (Adams és Hempelmann

1991; Hsu és Hsueh 2001; Gaszner és mtsai. 2004), így felmerül, hogy a sokk modell alkalmazása során a KO egereknél megfigyelhető tartósan fokozott izgalmi állapot az UCN1 neuronok stresszre adott csökkent válaszával magyarázható, ami a stressz tengelyre kifejtett szabályozó funkció zavarához, és így egyes stressz-függő viselkedési válaszok nem megfelelő kioltásához vezethet (32. ábra).



32. ábra: Az elektromos lábsokk modell során tapasztalt eredmények összefoglalása. *Trpa1*: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 mRNS, TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 ioncsatorna, UCN1: urocortin 1 peptid, PTSD: poszttraumás stressz betegség, WT: vad típus, KO: *Trpa1 knockout*.

A szakirodalom a stresszorokat két nagy csoportba sorolja. A szisztémás vagy más néven fiziológiai stresszorok - mint például a súlyos vérzésem sokk, vagy immunválasz - azonnali válaszreakciót igénylő, az életet akutan veszélyeztető állapotok. Ezzel szemben a második csoporthoz tartozó neurogén/emocionális vagy másik nevükön pszichológiai stresszorok - mint a *restraint* stressz, vagy a lábsokk - önmagukban nem életveszélyes multimodális ingerek, melyek tartós vagy ismételt alkalmazásuk során váltanak ki stressz válaszokat (Sawchenko és

mtsai. 2000; Dayas és mtsai. 2001; Gaszner és mtsai. 2004). Az egyes stresszorok eltérő mértékű neuronális aktivációt válthatnak ki a különböző stresszre érzékeny agyi területeken (így az EWcp/UCN1 neuronjaiban is), és ezen neuronális mintázatok hozzájárulhatnak a stresszorok kategorizálásához, valamint a stresszor-típusára specifikus útvonalakon keresztül hozzák létre a stresszre adott különböző válaszokat (Dayas és mtsai. 2001; Gaszner és mtsai. 2004). A fentiek alapján feltételezzük, hogy az eltérő stresszorokat alkalmazó PTSD modellek (SPS vs. lábsokk), egymástól eltérő neuronális aktivációs mintázatot, illetve viselkedési válaszokat válthatnak ki. Ezzel kapcsolatos lényeges eredményünk, hogy míg az SPS-nél leírt *Ucn1* mRNS expresszióját érintő különbségek mindkét genotípusnál sokban hasonlítanak a CVMS modellben kapott korábbi eredményekhez (Kormos és mtsai. 2022), addig elektrosokk modell esetén ezektől lényegesen eltérő *Ucn1* mRNS expressziós dinamikát tapasztaltunk. Ennek magyarázata tehát az lehet, hogy míg az SPS és CVMS paradigmák során részben hasonló stresszorokat (pl.: *restraint* stressz, FST) alkalmaztunk, addig az elektromos lábsokk által kiváltott PTSD a nociceptív hatáson alapul (Sawchenko és mtsai. 2000; Dayas és mtsai. 2001).

Az *Ucn1* mRNS expressziójára kifejtett hatásain túl feltételezhető, hogy a TRPA1 receptor befolyásolhatja az UCN1 felszabadulását és ezáltal a stressz adaptáció folyamatát (Kozicz és mtsai. 2001; Gaszner és Kozicz 2003; Gaszner és mtsai. 2007; Rouwette és mtsai. 2011; Gaszner és mtsai. 2012; Kormos és Gaszner 2013; Kormos és mtsai. 2022; Ujvári és mtsai. 2022). A TRPA1 kationcsatorna aktivációja az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedés révén fokozhatja a neuropeptidek (így az UCN1) felszabadulását (Denner és mtsai. 2017; Casello és mtsai. 2022). Ezzel kapcsolatban felmerül, hogy a *Trpa1* mRNS expresszió stressz által kiváltott csökkenése a túlzott mértékű UCN1 felszabadulást és a kapcsolódó viselkedési válaszokat hívatott kompenzálni, ezen feltételezés igazolásához további vizsgálatokat tervezünk. Ugyanakkor az SPS modellt kivitelezve látszólagos ellentmondás volt a stressznek kitett TRPA1 KO állatok alacsony EWcp/UCN1 peptid szintjei, valamint az *Ucn1* mRNS expresszió fokozódása között, mely ellentmondás magyarázata az UCN1 peptid felszabadulás megváltozott dinamikája lehet. A TRPA1 ioncsatorna korábban említett intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepe, valamint lehetséges hatása az embrionális fejlődésre (Asai és mtsai. 2010) további bizonyítékot szolgáltathat ezen feltételezésünkre, bár nem zárható ki, hogy az EWcp/UCN1 neuronjain található egyéb kationcsatornák (Zuniga és Ryabinin 2020) kompenzálhatják a TRPA1 hiányát a KO egerekben.

Végezetül ismert, hogy a PTSD-hez gyakran társuló komorbiditások a fokozott fájdalom érzékenység (Gibson 2012), illetve egyes szomatoform kórképek (Afari és mtsai. 2014; Egle és mtsai. 2016). Ennek kapcsán érdekes megfigyelés a TRPA1 gén promóterének epigenetikai módosulása az ezen állapotok által érintett betegek humán fehérvérsejtjeiben (Achenbach és mtsai. 2019). Mivel a gének promóter régióinak epigenetikai profilja hasonló lehet a periférián és a központi idegrendszerben (Davies és mtsai. 2012), ezért kézenfekvő magyarázatnak tűnik, hogy az epigenetikai változások érinthetik az EWcp/UCN1 neuronokban található TRPA1 gén promóterét is. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az anyai depriváció tompíthatja az UCN1 sejtek válaszkészségét a patkány EWcp-ben (Gaszner és mtsai. 2009), illetve ezzel összhangban - a CVMS egér modelljének alkalmazása során - az élet korai szakaszában fellépő stressz hiszton H3 acetilációt érintő epigenetikai módosulást okoz az EWcp/UCN1 neuronokban (Gaszner és mtsai. 2022). Az ismertetett eredmények alapján felmerül a lehetősége, hogy az EWcp/UCN1 neuronok nem csupán a major depresszió kialakulásához járulhatnak hozzá (Kormos és Gaszner 2013; Farkas és mtsai. 2017), hanem szerepük lehet a PTSD pathomechanizmusában is, mely betegség hátterében hasonló epigenetikai-pathobiológiai folyamatok állhatnak (Blacker és mtsai. 2019).

6. KONKLÚZIÓ, EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Eredményeink összegzéseken elmondható, hogy a TRPA1 ioncsatornák expressziója a szaglópálya különböző szintjein lényeges szerepet tölthet be az averzív/irritáló szagok érzékelésében. A TRPA1 receptorok - szaglópálya központi struktúráiban való - jelenléte alapján felmerül továbbá, hogy ezen ioncsatornának szerepe lehet a szagingerek központi feldolgozásában, így hozzájárulva az azokhoz társuló emocionális válaszok és viselkedési mintázatok kialakításához.

Az általunk alkalmazott mindkét PTSD modell során a *Trpa1* mRNS expressziójának csökkenése fokozott UCN1 peptid tartalommal járt együtt a WT állatok EWcp neuronjaiban, mely eredmények alapján feltételezhető, hogy a TRPA1 ioncsatornák hatással lehetnek a stressz adaptációs válaszokra, ezáltal befolyásolhatják a PTSD pathomechanizmusát. A KO állatok SPS modellnél tapasztalt csökkent immobilitása, illetve elektrosokk alkalmazásánál detektált fokozott ugrálási gyakorisága felveti a TRPA1 lehetséges szerepét a PTSD során fellépő depresszió-szerű viselkedés kialakulásában, valamint a *hyperarousal* kioltásában.

Végezetül a TRPA1 receptorok viselkedésben, illetve stressz adaptációs zavarokban betöltött lehetséges szerepe alapján felmerül, hogy ezen ioncsatorna a jövőben ígéretes gyógyszer-támadáspont lehet bizonyos - emocionális és viselkedési zavarokkal társuló - maladaptív kórképekben.

Új eredmények:

- Elsőként igazoltuk a *Trpa1* mRNS jelenlétét a PC glutamáterg neuronjain.
- Kimutattuk, hogy a *Trpa1* hiánya befolyásolja a predátor szag (róka és macska) hatására kialakuló viselkedési válaszokat.
- A *Trpa1* mRNS csökkent expresszióját detektáltuk PTSD egérmodelljeiben.
- Bizonyítottuk, hogy a *Trpa1* hiánya befolyásolja az EWcp urocortinerg neuronjainak működését, *Ucn1* mRNS és UCN1 peptid tartalmát, valamint a viselkedési válaszokat PTSD egérmodelljeiben.
- Elsőként vetettük fel az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronok lehetséges szerepét a PTSD pathomechanizmusában.

7. JÖVŐBENI TERVEK

Jövőbeni kísérleteinket kondicionális *Trpa1* KO állatok bevonásával tervezzük kivitelezni. Tekintettel a WT és a KO állatoknak a fent részletezett betegség modellekben detektált különböző viselkedésére, illetve neuromorfológiai eltéréseire, további célunk az esetlegesen ezek háttérben álló komplex neuroendokrin változások (ACTH, kortikoszteron, adrenalin, noradrenalin szintek) összehasonlítása a két genotípusban, továbbá a lábsokkal kiváltott PTSD során vizsgálni szeretnénk, hogy centrális támadáspontú szimpatolitikum adása milyen hatással lehet ezen viselkedési és endokrin válaszokra. Mivel korábbi vizsgálataink során mindkét PTSD modellnél mindössze egy-egy adott időpontban hajtottunk végre viselkedés tesztet, így a betegségre jellemző viselkedési változásokról (depresszió-szerű viselkedés, *hyperarousal*) csupán pillanatnyi képet kaptunk, ezért azok pontos időbeli dinamikájának feltérképezéséhez a jövőbeni kísérleteknél - meghatározott időközönként - egymást követő viselkedés vizsgálatokat végeznénk. A fent ismertetett PTSD modellek segítségével tervezzük vizsgálni továbbá, hogy az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronok részvétele a neuroinflammációs és epigenetikai folyamatokban milyen hatással lehet a betegség kialakulására. További célkitűzéseink közé tartozik az EWcp urocortinerg neuronjai és a PTSD pathomechanizmusában érintett főbb agyterületek (PFC, CeA, hippocampusz) közötti - a kórkép szempontjából releváns - interakciók feltérképezése. Ezen kívül a DRN-nek a PTSD-hez társuló hangulatzavarokban, valamint a CeA-nak és egyes agytörzsi struktúráknak a betegségre jellemző félelemválasz kialakulásában és kioltásában (lefagyás - PAG; *hyperarousal* - *locus coeruleus*) betöltött szerepe alapján a továbbiakban fel szeretnénk deríteni az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronoknak ezen agyterületekre kifejtett hatásait a PTSD egér modelljeiben. Végezetül a KO állatok felhasználása mellett, a jövőben centrálisan ható TRPA1 antagonistá alkalmazásával is tervezzük vizsgálni, hogy ezen ioncsatorna potenciális gyógyszer támadáspontként szóba jöhet-e a PTSD kezelésében.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Achenbach J, Rhein M, Gombert S, Meyer-Bockenamp F, Buhck M, Eberhardt M, Leffler A, Frieling H és Karst M. Childhood traumatization is associated with differences in TRPA1 promoter methylation in female patients with multisomatoform disorder with pain as the leading bodily symptom. *Clinical Epigenetics*. 2019 Aug;28;11(1):126. doi: 10.1186/s13148-019-0731-0. PMID: 31455424.
2. Adams HA, és Hempelmann G. Die endokrine Streßreaktion in Anästhesie und Chirurgie-Ursprung und Bedeutung. *AINS - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*. 1991; 26(6): 294-305. doi: 10.1055/s-2007-1000588.
3. Afari N, Ahumada SM, Wright LJ, Mostoufi S, Golnari G, Reis V és Cuneo JG. Psychological trauma and functional somatic syndromes: a systematic review and meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*. 2014 Jan;76(1):2-11. doi: 10.1097/PSY.000000000000010. PMID: 24336429.
4. Al-Omari A, Kecskés M, Gaszner B, Biró-Sütő T, Fazekas B, Berta G, Kuzma M, Pintér E és Kormos V. Functionally active TRPA1 ion channel is downregulated in peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus upon acute alcohol exposure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023 Jan;10;10:1046559. doi: 10.3389/fcell.2022.1046559. PMID: 36704197.
5. Asai Y, Holt JR és Géléoc GS. A quantitative analysis of the spatiotemporal pattern of transient receptor potential gene expression in the developing mouse cochlea. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2010 Mar;11(1):27-37. doi: 10.1007/s10162-009-0193-8. PMID: 19834762.
6. Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y és Epel E. Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Sep;38(9):1698-708. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.02.004. PMID: 23490070.
7. Atli A, Bulut M, Bez Y, Kaplan İ, Özdemir PG, Uysal C, Selçuk H és Sir A. Altered lipid peroxidation markers are related to post-traumatic stress disorder (PTSD) and not trauma itself in earthquake survivors. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2016 Jun;266(4):329-36. doi: 10.1007/s00406-015-0638-5. PMID: 26324882.
8. Auxéméry Y. Post-traumatic psychiatric disorders: PTSD is not the only diagnosis. *Presse Medicale*. 2018 May;47(5):423-430. doi: 10.1016/j.lpm.2017.12.006. PMID: 29580906.
9. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW és Lee KF. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nature Genetics*. 2000 Apr;24(4):410-4. doi: 10.1038/74263. PMID: 10742108.
10. Bale TL, Lee KF és Vale WW. The role of corticotropin-releasing factor receptors in stress and anxiety. *Integrative and Comparative Biology*. 2002 Jul;42(3):552-5. doi: 10.1093/icb/42.3.552. PMID: 21708750.

11. Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW és Lee KF. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *Journal of Neuroscience* 2002 Jan;1;22(1):193-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00193.2002. PMID: 11756502.
12. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI és Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 2006 Mar;24;124(6):1269-82. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023. PMID: 16564016.
13. Bentefour Y, Bennis M, Garcia R és M'hamed SB. Effects of paroxetine on PTSD-like symptoms in mice. *Psychopharmacology (Berlin)*. 2015 Jul;232(13):2303-12. doi: 10.1007/s00213-014-3861-2. PMID: 25585683.
14. Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C és Nawroth PP. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Feb;18;100(4):1920-5. doi: 10.1073/pnas.0438019100. PMID: 12578963.
15. Blacker CJ, Frye MA, Morava E, Kozicz T és Veldic M. A review of epigenetics of PTSD in comorbid psychiatric conditions. *Genes (Basel)*. 2019 Feb;13;10(2):140. doi: 10.3390/genes10020140. PMID: 30781888.
16. Boesveldt S és Parma V. The importance of the olfactory system in human well-being, through nutrition and social behavior. *Cell and Tissue Research*. 2021 Jan;383(1):559-567. doi: 10.1007/s00441-020-03367-7. PMID: 33433688.
17. Bosson A, Paumier A, Boisseau S, Jacquier-Sarlin M, Buisson A és Albrieux M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca²⁺ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide. *Molecular Neurodegeneration*. 2017 Jul;6;12(1):53. doi: 10.1186/s13024-017-0194-8. PMID: 28683776.
18. Boulis NM és Davis M. Footshock-induced sensitization of electrically elicited startle reflexes. *Behavioral Neuroscience*. 1989 Jun;103(3):504-8. doi: 10.1037//0735-7044.103.3.504. PMID: 2544200.
19. Bromis K, Calem M, Reinders AATS, Williams SCR és Kempton MJ. Meta-Analysis of 89 structural MRI studies in posttraumatic stress disorder and comparison with major depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*. 2018 Oct;1;175(10):989-998. doi: 10.1176/appi.ajp.2018.17111199. PMID: 30021460.
20. Bulut M, Selek S, Bez Y, Karababa IF, Kaya MC, Gunes M, Emhan A, Aksoy N és Sir A. Reduced PON1 enzymatic activity and increased lipid hydroperoxide levels that point out oxidative stress in generalized anxiety disorder. *Journal of Affective Disorders*. 2013 Sep;25;150(3):829-33. doi: 10.1016/j.jad.2013.03.011. PMID: 23706841.
21. Burde RM és Williams F. Parasympathetic nuclei. *Brain Research*. 1989 Oct;2;498(2):371-5. doi: 10.1016/0006-8993(89)91119-0. PMID: 2790489.

22. Camats Perna J és Engelmann M. Recognizing others: rodent's social memories. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2017;30:25-45. doi: 10.1007/7854_2015_413. PMID: 26643999.
23. Casello SM, Flores RJ, Yarur HE, Wang H, Awanyai M, Arenivar MA, Jaime-Lara RB, Bravo-Rivera H és Tejeda HA. Neuropeptide system regulation of prefrontal cortex circuitry: implications for neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neural Circuits*. 2022 Jun;21;16:796443. doi: 10.3389/fncir.2022.796443. PMID: 35800635.
24. Christiansen DM és Berke ET. Gender- and sex-based contributors to sex differences in PTSD. *Current Psychiatry Reports*. 2020 Mar;3;22(4):19. doi: 10.1007/s11920-020-1140-y. PMID: 32125541.
25. Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D és Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*. 2004 Dec;9;432(7018):723-30. doi: 10.1038/nature03066. PMID: 15483558.
26. Daskalakis NP, Cohen H, Nievergelt CM, Baker DG, Buxbaum JD, Russo SJ és Yehuda R. New translational perspectives for blood-based biomarkers of PTSD: from glucocorticoid to immune mediators of stress susceptibility. *Experimental Neurology*. 2016 Oct;284(Pt B):133-140. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.07.024. PMID: 27481726.
27. Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC és Mill J. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biology*. 2012 Jun;15;13(6):R43. doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r43. PMID: 22703893.
28. Davis M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1992 Jan;13(1):35-41. doi: 10.1016/0165-6147(92)90014-w. PMID: 1542936.
29. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y és Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *European Journal of Neuroscience*. 2001 Oct;14(7):1143-52. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01733.x. PMID: 11683906.
30. Deering-Rice CE, Romero EG, Shapiro D, Hughen RW, Light AR, Yost GS, Veranth JM és Reilly CA. Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP. *Chemical Research in Toxicology*. 2011 Jun;20;24(6):950-9. doi: 10.1021/tx200123z. PMID: 21591660.
31. Denner AC, Vogler B, Messlinger K és De Col R. Role of transient receptor potential ankyrin 1 receptors in rodent models of meningeal nociception - experiments in vitro. *European Journal of Pain*. 2017 May;21(5):843-854. doi: 10.1002/ejp.986. PMID: 27977070.

32. Deppermann S, Storchak H, Fallgatter AJ és Ehrlis AC. Stress-induced neuroplasticity: (mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD--a critical overview. *Neuroscience*. 2014 Dec;26;283:166-77. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.037. PMID: 25193848.
33. Deussing JM és Chen A. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. *Physiological Reviews*. 2018 Oct;1;98(4):2225-2286. doi: 10.1152/physrev.00042.2017. PMID: 30109816.
34. Diogenes A, Akopian AN és Hargreaves KM. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *Journal of Dental Research*. 2007 Jun;86(6):550-5. doi: 10.1177/154405910708600612. PMID: 17525356.
35. Dong HW, Davis JC, Ding S, Nai Q, Zhou FM, és Ennis M. Expression of transient receptor potential (TRP) channel mRNAs in the mouse olfactory bulb. *Neuroscience Letters*. 2012 Aug;22;524(1):49-54. doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.013. PMID: 22820212.
36. Dunlop BW és Wong A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD: pathophysiology and treatment interventions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019 Mar;8;89:361-379. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.10.010. PMID: 30342071.
37. Eberhardt MJ, Filipovic MR, Leffler A, de la Roche J, Kistner K, Fischer MJ, Fleming T, Zimmermann K, Ivanovic-Burmazovic I, Nawroth PP, Bierhaus A, Reeh PW és Sauer SK. Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Aug;17;287(34):28291-306. doi: 10.1074/jbc.M111.328674. PMID: 22740698.
38. Egle UT, Egloff N és von Känel R. Stress-induced hyperalgesia (SIH) as a consequence of emotional deprivation and psychosocial traumatization in childhood: implications for the treatment of chronic pain. *Schmerz (Berlin, Germany)*. 2016 Dec;30(6):526-536. doi: 10.1007/s00482-016-0107-8. PMID: 27324753.
39. Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA és Urban MO. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Molecular Pain*. 2008 Oct;27;4:48. doi: 10.1186/1744-8069-4-48. PMID: 18954467.
40. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D és Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017 Jun;23;354:11-29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019. PMID: 28450265.
41. Farook JM, Wang Q, Moochhala SM, Zhu ZY, Lee L és Wong PT. Distinct regions of periaqueductal gray (PAG) are involved in freezing behavior in hooded PVG rats on the cat-freezing test apparatus. *Neuroscience Letters*. 2004 Jan;9;354(2):139-42. doi: 10.1016/j.neulet.2003.10.011. PMID: 14698458.

42. Fekete EM és Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2007 Apr;28(1):1-27. doi: 10.1016/j.yfrne.2006.09.002. PMID: 17083971.
43. Fifield K, Hebert M, Williams K, Linehan V, Whiteman JD, Mac Callum P és Blundell J. Time-dependent effects of rapamycin on consolidation of predator stress-induced hyperarousal. *Behavioural Brain Research*. 2015 Jun;1;286:104-11. doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.045. PMID: 25746515.
44. Fox JH és Lowry CA. Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior. *Frontiers in Neuroscience*. 2013 Sep;20;7:169. doi: 10.3389/fnins.2013.00169. PMID: 24065880.
45. Ganon-Elazar E és Akirav I. Cannabinoids prevent the development of behavioral and endocrine alterations in a rat model of intense stress. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Jan;37(2):456-66. doi: 10.1038/npp.2011.204. PMID: 21918506.
46. Gaszner B és Kozicz T. Interaction between catecholaminergic terminals and urocortinergic neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Brain Research*. 2003 Oct;31;989(1):117-21. doi: 10.1016/s0006-8993(03)03367-5. PMID: 14519518.
47. Gaszner B, Csernus V és Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 2004 Dec;6;480(2):170-9. doi: 10.1002/cne.20343. PMID: 15514930.
48. Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW és Kozicz T. Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. 2007 Feb;1;500(4):708-19. doi: 10.1002/cne.21177. PMID: 17154253.
49. Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW és Kozicz T. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2009 Aug;27(5):439-51. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006. PMID: 19460425.
50. Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D és Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2012 Jan;27;202:283-99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.046. PMID: 22178610.
51. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Berta G, Csernus V, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglodi D, Kormos V és Gaszner B. Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy. *Frontiers in*

- Endocrinology (Lausanne). 2022 Sep;23;13:995900. doi: 10.3389/fendo.2022.995900. PMID: 36213293.
52. Gibson CA. Review of posttraumatic stress disorder and chronic pain: the path to integrated care. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 2012;49(5):753-76. doi: 10.1682/jrrd.2011.09.0158. PMID: 23015584.
53. Goodnight JRM, Ragsdale KA, Rauch SAM és Rothbaum BO. Psychotherapy for PTSD: an evidence-based guide to a theranostic approach to treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019 Jan;10;88:418-426. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.05.006. PMID: 29786514.
54. Gresack JE és Risbrough VB. Corticotropin-releasing factor and noradrenergic signalling exert reciprocal control over startle reactivity. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2011 Oct;14(9):1179-94. doi: 10.1017/S1461145710001409. PMID: 21205416.
55. Hamilton NB, Kolodziejczyk K, Kougioumtzidou E és Attwell D. Proton-gated Ca(2+)-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*. 2016 Jan;28;529(7587):523-7. doi: 10.1038/nature16519. PMID: 26760212.
56. Hammer GD és Kapp BS. The effects of naloxone administered into the periaqueductal gray on shock-elicited freezing behavior in the rat. *Behavioral and Neural Biology*. 1986 Sep;46(2):189-95. doi: 10.1016/s0163-1047(86)90668-0. PMID: 3767831.
57. Harnett NG, Goodman AM és Knight DC. PTSD-related neuroimaging abnormalities in brain function, structure, and biochemistry. *Experimental Neurology*. 2020 Aug;330:113331. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113331. PMID: 32343956.
58. Henckens MJ, van Wingen GA, Joëls M és Fernández G. Time-dependent effects of corticosteroids on human amygdala processing. *Journal of Neuroscience*. 2010 Sep;22;30(38):12725-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3112-10.2010. PMID: 20861377.
59. Hendrickson RC és Raskind MA. Noradrenergic dysregulation in the pathophysiology of PTSD. *Experimental Neurology*. 2016 Oct;284(Pt B):181-195. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.05.014. PMID: 27222130.
60. Herman JP, Mueller NK és Figueiredo H. Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 Jun;1018:35-45. doi: 10.1196/annals.1296.004. PMID: 15240350.
61. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK és Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2005 Dec;29(8):1201-13. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.08.006. PMID: 16271821.
62. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM és Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Dec;19;103(51):19564-8. doi: 10.1073/pnas.0609598103. PMID: 17164327.

63. Hitchcock JM, Sananes CB és Davis M. Sensitization of the startle reflex by footshock: blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem. *Behavioral Neuroscience*. 1989 Jun;103(3):509-18. doi: 10.1037//0735-7044.103.3.509. PMID: 2544201.
64. Heiland Hogan MB, Subramanian S és M Das J. Neuroanatomy, Edinger–Westphal nucleus (accessory oculomotor nucleus). *StatPearls*. 2022 Dec 26. PMID: 32119442.
65. Hori H és Kim Y. Inflammation and post-traumatic stress disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2019 Apr;73(4):143-153. doi: 10.1111/pcn.12820. PMID: 30653780.
66. Hsu SY és Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nature Medicine*. 2001 May;7(5):605-11. doi: 10.1038/87936. PMID: 11329063.
67. Hupalo S, Bryce CA, Bangasser DA, Berridge CW, Valentino RJ és Floresco SB. Corticotropin-releasing factor (CRF) circuit modulation of cognition and motivation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2019 Aug;103:50-59. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.06.010. PMID: 31212019.
68. Janitzky K, D'Hanis W, Kröber A és Schwegler H. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. *Brain Research*. 2015 Mar;2;1599:1-8. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.030. PMID: 25532494.
69. Jiang L, Ma D, Grubb BD és Wang M. ROS/TRPA1/CGRP signaling mediates cortical spreading depression. *Journal of Headache and Pain*. 2019 Mar;6;20(1):25. doi: 10.1186/s10194-019-0978-z. PMID: 30841847.
70. Julius D. TRP channels and pain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2013;29:355-84. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833. PMID: 24099085.
71. Im E. Multi-facets of corticotropin-releasing factor in modulating inflammation and angiogenesis. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2015 Jan;1;21(1):25-32. doi: 10.5056/jnm14076. PMID: 25540945.
72. Inagaki TK, Muscatell KA, Irwin MR, Cole SW és Eisenberger NI. Inflammation selectively enhances amygdala activity to socially threatening images. *Neuroimage*. 2012 Feb;15;59(4):3222-6. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.10.090. PMID: 22079507.
73. Kamiya K és Abe O. Imaging of posttraumatic stress disorder. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2020 Feb;30(1):115-123. doi: 10.1016/j.nic.2019.09.010. PMID: 31759567.
74. Karl A, Schaefer M, Malta LS, Dörfel D, Rohleder N és Werner A. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2006;30(7):1004-31. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.03.004. PMID: 16730374.

75. Kasckow JW, Baker D és Geraciotti TD Jr. Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides*. 2001 May;22(5):845-51. doi: 10.1016/s0196-9781(01)00399-0. PMID: 11337099.
76. Kheradpezhohu E, Choy JMC, Daria VR és Arabzadeh E. TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex. *Open Biology*. 2017 Apr;7(4):160314. doi: 10.1098/rsob.160314. PMID: 28424320.
77. Kim JJ, Rison RA és Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience*. 1993 Dec;107(6):1093-8. doi: 10.1037//0735-7044.107.6.1093. PMID: 8136063.
78. Kitayama N, Vaccarino V, Kutner M, Weiss P és Bremner JD. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*. 2005 Sep;88(1):79-86. doi: 10.1016/j.jad.2005.05.014. PMID: 16033700.
79. Kohda K, Harada K, Kato K, Hoshino A, Motohashi J, Yamaji T, Morinobu S, Matsuoka N és Kato N. Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience*. 2007 Aug;10;148(1):22-33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.041. PMID: 17644267.
80. Koike K, Yoo SJ, Bleymehl K, Omura M, Zapiec B, Pyrski M, Blum T, Khan M, Bai Z, Leinders-Zufall T, Mombaerts P és Zufall F. Danger perception and stress response through an olfactory sensor for the bacterial metabolite hydrogen sulfide. *Neuron*. 2021 Aug;4;109(15):2469-2484.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2021.05.032. PMID: 34186026.
81. Koivisto A, Hukkanen M, Saarnilehto M, Chapman H, Kuokkanen K, Wei H, Viisanen H, Akerman KE, Lindstedt K és Pertovaara A. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy. *Pharmacological Research*. 2012 Jan;65(1):149-58. doi: 10.1016/j.phrs.2011.10.006. PMID: 22133672.
82. Kondoh K, Lu Z, Ye X, Olson DP, Lowell BB és Buck LB. A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature*. 2016 Apr;7;532(7597):103-6. doi: 10.1038/nature17156. PMID: 27001694.
83. Kormos V és Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 2013 Dec;47(6):401-19. doi: 10.1016/j.npep.2013.10.014. PMID: 24210138.
84. Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E és Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2022 May;4;47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187. PMID: 35508327.

85. Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW és Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the mouse. *Brain Research*. 2005 Jun;7;1046(1-2):172-9. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.012. PMID: 15885665.
86. Kozicz T, Li M és Arimura A. The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus following stress in rats. *Stress*. 2001 Jun;4(2):85-90. doi: 10.3109/10253890109115724. PMID: 22432129.
87. Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E és Roubos EW. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Jul;33(6):741-54. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.012. PMID: 18394812.
88. Kozicz T. On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation. *General and Comparative Endocrinology*. 2007 Aug-Sep;153(1-3):235-40. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.04.005. PMID: 17517410.
89. Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, Horn AK, Toledo CA és Ryabinin AE. The Edinger-Westphal nucleus: a historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *Journal of Comparative Neurology*. 2011 Jun;1;519(8):1413-34. doi: 10.1002/cne.22580. PMID: 21452224.
90. Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramírez JD, Zea J, Burley MW, Bedoya G, Bennett DL, Wood JN és Ruiz-Linares A. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron*. 2010 Jun;10;66(5):671-80. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.030. PMID: 20547126.
91. Lage-Rupprecht V, Zhou L, Bianchini G, Aghvami SS, Mueller M, Rózsa B, Sassoè-Pognetto M és Egger V. Presynaptic NMDARs cooperate with local spikes toward GABA release from the reciprocal olfactory bulb granule cell spine. *Elife*. 2020 Nov;30;9:e63737. doi: 10.7554/eLife.63737. PMID: 33252329.
92. Lee DJ, Schnitzlein CW, Wolf JP, Vythilingam M, Rasmusson AM és Hoge CW. Psychotherapy versus pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: systemic review and meta-analyses to determine first-line treatments. *Depression and Anxiety*. 2016 Sep;33(9):792-806. doi: 10.1002/da.22511. PMID: 27126398.
93. Lee KI, Lin HC, Lee HT, Tsai FC és Lee TS. Loss of transient receptor potential ankyrin 1 channel deregulates emotion, learning and memory, cognition, and social behavior in mice. *Molecular Neurobiology*. 2017 Jul;54(5):3606-3617. doi: 10.1007/s12035-016-9908-0. PMID: 27194300.
94. Lee SM, Cho YS, Kim TH, Jin MU, Ahn DK, Noguchi K és Bae YC. 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*. 2012 Oct;45(1-2):45-9. doi: 10.1016/j.jchemneu.2012.07.003. PMID: 22813698.

95. Lee VM és Pixley SK. Age and differentiation-related differences in neuron-specific tubulin immunostaining of olfactory sensory neurons. *Brain Research. Developmental Brain Research*. 1994 Dec;16;83(2):209-15. doi: 10.1016/0165-3806(94)00139-1. PMID: 7697881.
96. Levin SG és Godukhin OV. Modulating effect of cytokines on mechanisms of synaptic plasticity in the brain. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Mar;82(3):264-274. doi: 10.1134/S000629791703004X. PMID: 28320267.
97. Li X, Chen W, Pan K, Li H, Pang P, Guo Y, Shu S, Cai Y, Pei L, Liu D, Afewerky HK, Tian Q, Zhu LQ és Lu Y. Serotonin receptor 2c-expressing cells in the ventral CA1 control attention via innervation of the Edinger-Westphal nucleus. *Nature Neuroscience*. 2018 Sep;21(9):1239-1250. doi: 10.1038/s41593-018-0207-0. PMID: 30104733.
98. Lisieski MJ, Eagle AL, Conti AC, Liberzon I és Perrine SA. Single-prolonged stress: a review of two decades of progress in a rodent model of post-traumatic stress disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2018 May;15;9:196. doi: 10.3389/fpsy.2018.00196. PMID: 29867615.
99. Logashina YA, Korolkova YV, Kozlov SA és Andreev YA. TRPA1 channel as a regulator of neurogenic inflammation and pain: structure, function, role in pathophysiology, and therapeutic potential of ligands. *Biochemistry (Mosc)*. 2019 Feb;84(2):101-118. doi: 10.1134/S0006297919020020. PMID: 31216970.
100. Maercker A, Cloitre M, Bachem R, Schlumpf YR, Khoury B, Hitchcock C és Bohus M. Complex post-traumatic stress disorder. *Lancet*. 2022 Jul;2;400(10345):60-72. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00821-2. PMID: 35780794.
101. Marone IM, De Logu F, Nassini R, De Carvalho Goncalves M, Benemei S, Ferreira J, Jain P, Li Puma S, Bunnett NW, Geppetti P és Materazzi S. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain*. 2018 Aug;1;141(8):2312-2328. doi: 10.1093/brain/awy177. PMID: 29985973.
102. Matsukawa M, Imada M, Aizawa S és Sato T. Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. *Brain Research*. 2016 Jan;15;1631:46-52. doi: 10.1016/j.brainres.2015.11.020. PMID: 26607254.
103. May PJ, Reiner AJ és Ryabinin AE. Comparison of the distributions of urocortin-containing and cholinergic neurons in the periculomotor midbrain of the cat and macaque. *Journal of Comparative Neurology*. 2008 Mar;20;507(3):1300-16. doi: 10.1002/cne.21514. PMID: 18186029.
104. Meents JE, Ciotu CI és Fischer MJM. TRPA1: a molecular view. *Journal of Neurophysiology*. 2019 Feb;1;121(2):427-443. doi: 10.1152/jn.00524.2018. PMID: 30485151.
105. Miller MW, Wolf EJ, Sadeh N, Logue M, Spielberg JM, Hayes JP, Sperbeck E, Schichman SA, Stone A, Carter WC, Humphries DE, Milberg W és McGlinchey R. A novel locus in the oxidative stress-related gene ALOX12 moderates the association between

- PTSD and thickness of the prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Dec;62:359-65. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.09.003. PMID: 26372769.
106. Miller MW, Lin AP, Wolf EJ és Miller DR. Oxidative stress, inflammation, and neuroprogression in chronic PTSD. *Harvard Review of Psychiatry*. 2018 Mar/Apr;26(2):57-69. doi: 10.1097/HRP.000000000000167. PMID: 29016379.
107. Mohrhardt J, Nagel M, Fleck D, Ben-Shaul Y és Spehr M. Signal detection and coding in the accessory olfactory system. *Chemical Senses*. 2018 Nov;43(9):667-695. doi: 10.1093/chemse/bjy061. PMID: 30256909.
108. Moore C, Gupta R, Jordt SE, Chen Y és Liedtke WB. Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neuroscience Bulletin*. 2018 Feb;34(1):120-142. doi: 10.1007/s12264-017-0200-8. PMID: 29282613.
109. de Moura JC, Noroes MM, Rachetti Vde P, Soares BL, Preti D, Nassini R, Materazzi S, Marone IM, Minocci D, Geppetti P, Gavioli EC és André E. The blockade of transient receptor potential ankirin 1 (TRPA1) signalling mediates antidepressant- and anxiolytic-like actions in mice. *British Journal of Pharmacology*. 2014 Sep;171(18):4289-99. doi: 10.1111/bph.12786. PMID: 24846744.
110. Moustafa AA, Gilbertson MW, Orr SP, Herzallah MM, Servatius RJ és Myers CE. A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain and Cognition*. 2013 Feb;81(1):29-43. doi: 10.1016/j.bandc.2012.10.005. PMID: 23164732.
111. Mueller M és Egger V. Dendritic integration in olfactory bulb granule cells upon simultaneous multispine activation: low thresholds for nonlocal spiking activity. *PLoS Biology*. 2020 Sep;23;18(9):e3000873. doi: 10.1371/journal.pbio.3000873. PMID: 32966273.
112. Nemes B, Bölskei K, Kecskés A, Kormos V, Gaszner B, Aczél T, Hegedüs D, Pintér E, Helyes Z és Sándor Z. Human somatostatin SST4 receptor transgenic mice: construction and brain expression pattern characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Apr;4;22(7):3758. doi: 10.3390/ijms22073758. PMID: 33916620.
113. Nilius B, Owsianik G, Voets T és Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews*. 2007 Jan;87(1):165-217. doi: 10.1152/physrev.00021.2006. PMID: 17237345.
114. Oakley LD, Kuo WC, Kowalkowski JA és Park W. Meta-analysis of cultural influences in trauma exposure and PTSD prevalence rates. *Journal of Transcultural Nursing*. 2021 Jul;32(4):412-424. doi: 10.1177/1043659621993909. PMID: 33593236.
115. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M és Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2005 Sep;115(9):2393-401. doi: 10.1172/JCI25437. PMID: 16110328.

116. Oettl LL és Kelsch W. Oxytocin and olfaction. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2018;35:55-75. doi: 10.1007/7854_2017_8. PMID: 28812265.
117. Olah E, Rumbus Z, Kormos V, Tekus V, Pakai E, Wilson HV, Fekete K, Solymar M, Kelava L, Keringer P, Gaszner B, Whiteman M, Keeble J, Pinter E és Garami A. The hypothermic effect of hydrogen sulfide is mediated by the transient receptor potential ankyrin-1 channel in mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep;29;14(10):992. doi: 10.3390/ph14100992. PMID: 34681216.
118. Ong ZY és McNally GP. CART in energy balance and drug addiction: current insights and mechanisms. *Brain Research*. 2020 Aug;1;1740:146852. doi: 10.1016/j.brainres.2020.146852. PMID: 32335093.
119. Oroian BA, Ciobica A, Timofte D, Stefanescu C és Serban IL. New metabolic, digestive, and oxidative stress-related manifestations associated with posttraumatic stress disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 Dec;20;2021:5599265. doi: 10.1155/2021/5599265. PMID: 34966477.
120. Ozdemir O, Selvi Y, Ozkol H, Tuluçe Y, Besiroglu L és Aydin A. Comparison of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and adenosine deaminase activities between respiratory and nocturnal subtypes of patients with panic disorder. *Neuropsychobiology*. 2012;66(4):244-51. doi: 10.1159/000341880. PMID: 23095458.
121. Packard AI, Lin B és Schwob JE. Sox2 and Pax6 play counteracting roles in regulating neurogenesis within the murine olfactory epithelium. *PLoS One*. 2016 May;12;11(5):e0155167. doi: 10.1371/journal.pone.0155167. PMID: 27171428.
122. Paxinos G, és Franklin KBJ. *Mouse brain in stereotaxic coordinates*. Cambridge, MA, USA: Academic Press. 2001.
123. Perczel-Forintos D és Lisincki A. „A PTSD kezelése NICE irányelvek alapján 1”. 2020. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng116>.
124. Pérez-Gómez A, Bleyemehl K, Stein B, Pyrski M, Birnbaumer L, Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F és Chamero P. Innate predator odor aversion driven by parallel olfactory subsystems that converge in the ventromedial hypothalamus. *Current Biology*. 2015 May;18;25(10):1340-6. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.026. PMID: 25936549.
125. Perrine SA, Eagle AL, George SA, Mulo K, Kohler RJ, Gerard J, Harutyunyan A, Hool SM, Susick LL, Schneider BL, Ghoddoussi F, Galloway MP, Liberzon I és Conti AC. Severe, multimodal stress exposure induces PTSD-like characteristics in a mouse model of single prolonged stress. *Behavioural Brain Research*. 2016 Apr;15;303:228-37. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.056. PMID: 26821287.
126. Perry BD és Pollard R. Homeostasis, stress, trauma, and adaptation. A neurodevelopmental view of childhood trauma. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*. 1998 Jan;7(1):33-51, viii. PMID: 9894078.
127. Pinheiro Fde V, Villarinho JG, Silva CR, Oliveira SM, Pinheiro Kde V, Petri D, Rossato MF, Guerra GP, Trevisan G, Antonello Rubin M, Geppetti P, Ferreira J és André E. The

- involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. 2015 Jan;15;747:105-13. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.11.039. PMID: 25498793.
128. Plotsky PM. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology*. 1987 Sep;121(3):924-30. doi: 10.1210/endo-121-3-924. PMID: 3497798.
129. Plotsky PM, Cunningham ET Jr és Widmaier EP. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrine Reviews*. 1989 Nov;10(4):437-58. doi: 10.1210/edrv-10-4-437. PMID: 2558876.
130. Postel C, Viard A, André C, Guérolé F, de Flores R, Baleyte JM, Gerardin P, Eustache F, Dayan J és Guillery-Girard B. Hippocampal subfields alterations in adolescents with post-traumatic stress disorder. *Human Brain Mapping*. 2019 Mar;40(4):1244-1252. doi: 10.1002/hbm.24443. PMID: 30367743.
131. Powell ND, Bailey MT, Mays JW, Stiner-Jones LM, Hanke ML, Padgett DA és Sheridan JF. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain, Behavior and Immunity*. 2009 Feb;23(2):225-31. doi: 10.1016/j.bbi.2008.09.010. PMID: 18848983.
132. Pozsgai G, Payrits M, Sággy É, Sebestyén-Bátai R, Steen E, Szőke É, Sándor Z, Solymár M, Garami A, Orvos P, Tálosi L, Helyes Z és Pintér E. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2017 May;1;65:10-21. doi: 10.1016/j.niox.2017.01.012. PMID: 28137611.
133. Priest MF; Freda SN; Badong D; Dumrongprechachan V és Kozorovitskiy Y. „Peptidergic modulation of fear responses by the Edinger-Westphal nucleus.” *BioRxiv - the preprint server for biology*. 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.05.455317>.
134. de Quervain D, Schwabe L és Roozendaal B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017 Jan;18(1):7-19. doi: 10.1038/nrn.2016.155. PMID: 27881856.
135. Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D és Rang HP. *Rang & Dale's Pharmacology*, 9th Edition. London: Elsevier. 2018.
136. Rassnick S, Sved AF és Rabin BS. Locus coeruleus stimulation by corticotropin-releasing hormone suppresses in vitro cellular immune responses. *The Journal of Neuroscience*. 1994 Oct;14(10):6033-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-10-06033.1994. PMID: 7931560.
137. Rohleder N, Wolf JM és Wolf OT. Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2010 Sep;35(1):104-14. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.12.003. PMID: 20005894.

138. Rotermund N, Schulz K, Hirnet D és Lohr C. Purinergic signaling in the vertebrate olfactory system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019 Apr;16;13:112. doi: 10.3389/fncel.2019.00112. PMID: 31057369.
139. Rouwette T, Klemann K, Gaszner B, Scheffer GJ, Roubos EW, Scheenen WJ, Vissers K és Kozicz T. Differential responses of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 to acute pain stress in the rat brain. *Neuroscience*. 2011 Jun;2;183:15-24. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.054. PMID: 21463663.
140. Sabban EL, Serova LI, Alaluf LG, Laukova M és Peddu C. Comparative effects of intranasal neuropeptide Y and HS014 in preventing anxiety and depressive-like behavior elicited by single prolonged stress. *Behavioural Brain Research*. 2015 Dec;15;295:9-16. doi: 10.1016/j.bbr.2014.12.038. PMID: 25542511.
141. Dos Santos Júnior ED, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, Lima LB, Da Silva RJ, Diniz GB, Sita LV, Elias CF és Bittencourt JC. The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus--I: efferents in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2015 Oct;68:22-38. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.07.002. PMID: 26206178.
142. Sauerhöfer E, Pamplona FA, Bedenk B, Moll GH, Dawirs RR, von Hörsten S, Wotjak CT és Golub Y. Generalization of contextual fear depends on associative rather than non-associative memory components. *Behavioural Brain Research*. 2012 Aug;1;233(2):483-93. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.016. PMID: 22659395.
143. Sawchenko PE, Li HY és Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Progress in Brain Research*. 2000;122:61-78. doi: 10.1016/s0079-6123(08)62131-7. PMID: 10737051.
144. Schöner J, Heinz A, Endres M, Gertz K és Kronenberg G. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017 Oct;21(10):2248-2256. doi: 10.1111/jcmm.13161. PMID: 28374949.
145. Schrader C és Ross A. A review of PTSD and current treatment strategies. *Missouri Medicine*. 2021 Nov-Dec;118(6):546-551. PMID: 34924624.
146. Schreiber AL és Gilpin NW. Corticotropin-releasing factor (CRF) neurocircuitry and neuropharmacology in alcohol drinking. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2018;248:435-471. doi: 10.1007/164_2017_86. PMID: 29374836.
147. Serova LI, Tillinger A, Alaluf LG, Laukova M, Keegan K és Sabban EL. Single intranasal neuropeptide Y infusion attenuates development of PTSD-like symptoms to traumatic stress in rats. *Neuroscience*. 2013 Apr;16;236:298-312. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.040. PMID: 23376740.
148. Serova LI, Laukova M, Alaluf LG, Pucillo L és Sabban EL. Intranasal neuropeptide Y reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model. *European Neuropsychopharmacology*. 2014 Jan;24(1):142-7. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.11.007. PMID: 24326087.

149. Shapiro D, Deering-Rice CE, Romero EG, Hughen RW, Light AR, Veranth JM és Reilly CA. Activation of transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) in lung cells by wood smoke particulate material. *Chemical Research in Toxicology*. 2013 May;20;26(5):750-8. doi: 10.1021/tx400024h. PMID: 23541125.
150. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP és Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nature Neuroscience*. 2011 Dec;11;15(1):70-80. doi: 10.1038/nn.3000. PMID: 22158513.
151. Shigetomi E, Jackson-Weaver O, Huckstepp RT, O'Dell TJ és Khakh BS. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *Journal of Neuroscience*. 2013 Jun;12;33(24):10143-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5779-12.2013. PMID: 23761909.
152. Smith ME. Bilateral hippocampal volume reduction in adults with post-traumatic stress disorder: a meta-analysis of structural MRI studies. *Hippocampus*. 2005;15(6):798-807. doi: 10.1002/hipo.20102. PMID: 15988763.
153. Smith SM és Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2006;8(4):383-95. doi: 10.31887/DCNS.2006.8.4/ssmith. PMID: 17290797.
154. Smith TD és Bhatnagar KP. Anatomy of the olfactory system. *Handbook of Clinical Neurology*. 2019;164:17-28. doi: 10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2. PMID: 31604545.
155. Sonne J és Lopez-Ojeda W. Neuroanatomy, Cranial Nerve. 2022 Dec 9. StatPearls PMID: 29261885.
156. Sonner JM, Li J és Eger EI. Desflurane and the nonimmobilizer 1,2-dichlorohexafluorocyclobutane suppress learning by a mechanism independent of the level of unconditioned stimulation. *Anesthesia & Analgesia*. 1998 Jul;87(1):200-5. doi: 10.1097/0000539-199807000-00041. PMID: 9661574.
157. Souza Monteiro de Araujo D, Nassini R, Geppetti P és De Logu F. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2020 Oct;24(10):997-1008. doi: 10.1080/14728222.2020.1815191. PMID: 32838583.
158. Stauffer CS, Morrison TE, Meinzer NK, Leung D, Buffington J, Sheh EG, Neylan TC, O'Donovan A és Woolley JD. Effects of oxytocin administration on fear-potentiated acoustic startle in co-occurring PTSD and alcohol use disorder: a randomized clinical trial. *Psychiatry Research*. 2022 Feb;308:114340. doi: 10.1016/j.psychres.2021.114340. PMID: 34983010.
159. Stoop R. Sniffing and oxytocin: effects on olfactory memories. *Neuron*. 2016 May;4;90(3):431-3. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.033. PMID: 27151635.
160. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, Naert R és Nilius B. Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: from structure to

- disease. *Physiological Reviews*. 2020 Apr;1;100(2):725-803. doi: 10.1152/physrev.00005.2019. PMID: 31670612.
161. Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L és Flood PM. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal*. 2007 Feb;19(2):251-60. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.06.007. PMID: 16996249.
162. Tong X, Shigetomi E, Looger LL és Khakh BS. Genetically encoded calcium indicators and astrocyte calcium microdomains. *Neuroscientist*. 2013 Jun;19(3):274-91. doi: 10.1177/1073858412468794. PMID: 23264008.
163. Topilko T, Diaz SL, Pacheco CM, Verny F, Rousseau CV, Kirst C, Deleuze C, Gaspar P és Renier N. Edinger-Westphal peptidergic neurons enable maternal preparatory nesting. *Neuron*. 2022 Apr;20;110(8):1385-1399.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2022.01.012. PMID: 35123655.
164. Török B, Sipos E, Pivac N és Zelena D. Modelling posttraumatic stress disorders in animals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2019 Mar;2;90:117-133. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.013. PMID: 30468906.
165. Truex RC és Carpenter MB. *Human neuroanatomy*, 6th edition. Williams and Wilkins. 1969.
166. Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N és Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. *Journal of Neuroinflammation*. 2022 Feb;2;19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w. PMID: 35109869.
167. Valentino RJ, Lucki I és Van Bockstaele E. Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: linking stress coping and addiction. *Brain Research*. 2010 Feb;16;1314:29-37. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.100. PMID: 19800322.
168. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, és mtsai. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 1995 Nov;16;378(6554):287-92. doi: 10.1038/378287a0. PMID: 7477349.
169. Verbitsky A, Dopfel D és Zhang N. Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Translational Psychiatry*. 2020 May;6;10(1):132. doi: 10.1038/s41398-020-0806-x. PMID: 32376819.
170. Verma M, Bali A, Singh N és Jaggi AS. Investigating the role of nisoldipine in foot-shock-induced post-traumatic stress disorder in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2016 Apr;30(2):128-36. doi: 10.1111/fcp.12174. PMID: 26662718.
171. Verkhatsky A, Reyes RC és Parpura V. TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 2014;166:1-22. doi: 10.1007/112_2013_15. PMID: 23784619.

172. Viau V és Sawchenko PE. Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. repeated restraint stress: rapid publication. *Journal of Comparative Neurology*. 2002 Apr;15;445(4):293-307. doi: 10.1002/cne.10178. PMID: 11920708.
173. Vosshall LB. Social signals: the secret language of mice. *Current Biology*. 2005 Apr;12;15(7):R255-7. doi: 10.1016/j.cub.2005.03.027. PMID: 15823526.
174. Wang L, Zhang Z, Chen J, Manyande A, Haddad R, Liu Q és Xu F. Cell-type-specific whole-brain direct inputs to the anterior and posterior piriform cortex. *Frontiers in Neural Circuits*. 2020 Feb;7;14:4. doi: 10.3389/fncir.2020.00004. PMID: 32116571.
175. Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Beutler B és Liu Q. Large-scale forward genetics screening identifies *Trpa1* as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nature Communications*. 2018 May;23;9(1):2041. doi: 10.1038/s41467-018-04324-3. PMID: 29795268.
176. Wang Z, Neylan TC, Mueller SG, Lenoci M, Turan D, Marmar CR, Weiner MW és Schuff N. Magnetic resonance imaging of hippocampal subfields in posttraumatic stress disorder. *Archives of General Psychiatry*. 2010 Mar;67(3):296-303. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.205. PMID: 20194830.
177. Wei H, Hämäläinen MM, Saarnilehto M, Koivisto A és Pertovaara A. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiology*. 2009 Jul;111(1):147-54. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181a1642b. PMID: 19512877.
178. Wei L, Simen A, Mane S és Kaffman A. Early life stress inhibits expression of a novel innate immune pathway in the developing hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Jan;37(2):567-80. doi: 10.1038/npp.2011.239. PMID: 21993208.
179. Weninger SC, Peters LL és Majzoub JA. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology*. 2000 Jan;141(1):256-63. doi: 10.1210/endo.141.1.7277. PMID: 10614646.
180. Wesson DW. Sniffing behavior communicates social hierarchy. *Current Biology*. 2013 Apr;8;23(7):575-80. doi: 10.1016/j.cub.2013.02.012. PMID: 23477727.
181. Westphal C. „Über einem Fall von chronischer progressive Lähmung des Augenmuskeln (Ophthalmoplegia externa) nebst Beschreibung von Ganglienzellengruppen in Bereich des Oculomotoriuskerns”. *Arch Psychiatrie Nervenheilkunde* 1887;98: 846–71.
182. White-Welkley JE, Bunnell BN, Mougey EH, Meyerhoff JL és Dishman RK. Treadmill exercise training and estradiol differentially modulate hypothalamic-pituitary-adrenal cortical responses to acute running and immobilization. *Physiology & Behavior*. 1995 Mar;57(3):533-40. doi: 10.1016/0031-9384(94)00348-9. PMID: 7786348.

183. Wilson CB, Ebenezer PJ, McLaughlin LD és Francis J. Predator exposure/psychosocial stress animal model of post-traumatic stress disorder modulates neurotransmitters in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *PLoS One*. 2014 Feb;14;9(2):e89104. doi: 10.1371/journal.pone.0089104. PMID: 24551226.
184. Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, Kurata A, Kozuru T és Yamawaki S. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Aug;33(9):2108-16. doi: 10.1038/sj.npp.1301605. PMID: 17957211.
185. Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S és Liberzon I. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depression and Anxiety*. 2009;26(12):1110-7. doi: 10.1002/da.20629. PMID: 19918929.
186. Yehuda R. Psychoneuroendocrinology of post-traumatic stress disorder. *Psychiatric Clinics of North America*. 1998 Jun;21(2):359-79. doi: 10.1016/s0193-953x(05)70010-1. PMID: 9670231.
187. Yehuda R, McFarlane AC és Shalev AY. Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. *Biological Psychiatry*. 1998 Dec;15;44(12):1305-13. doi: 10.1016/s0006-3223(98)00276-5. PMID: 9861473.
188. Yehuda R, Bierer LM, Schmeidler J, Aferiat DH, Breslau I és Dolan S. Low cortisol and risk for PTSD in adult offspring of holocaust survivors. *The American Journal of Psychiatry*. 2000 Aug;157(8):1252-9. doi: 10.1176/appi.ajp.157.8.1252. PMID: 10910787.
189. Young MB, Howell LL, Hopkins L, Moshfegh C, Yu Z, Clubb L, Seidenberg J, Park J, Swiercz AP és Marvar PJ. A peripheral immune response to remembering trauma contributes to the maintenance of fear memory in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2018 Aug;94:143-151. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.05.012. PMID: 29783162.
190. Yu Z, Fukushima H, Ono C, Sakai M, Kasahara Y, Kikuchi Y, Gunawansa N, Takahashi Y, Matsuoka H, Kida S és Tomita H. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017 Jan;59:313-321. doi: 10.1016/j.bbi.2016.08.011. PMID: 27562421.
191. Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovács KJ, Tóth Z és Makara GB. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2003 Nov;285(5):E1110-7. doi: 10.1152/ajpendo.00219.2003. PMID: 14534078.
192. Zou J, Wang W, Pan YW, Lu S és Xia Z. Methods to measure olfactory behavior in mice. *Current Protocols in Toxicology*. 2015 Feb;2;63:11.18.1-11.18.21. doi: 10.1002/0471140856.tx1118s63. PMID: 25645244.
193. Zuniga A és Ryabinin AE. Involvement of centrally projecting Edinger-Westphal nucleus neuropeptides in actions of addictive drugs. *Brain Sciences*. 2020 Jan;26;10(2):67. doi: 10.3390/brainsci10020067. PMID: 31991932.

9. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-MT: 2-metil-2-tiazolin

A: *amygdala*

ACC: anterior cinguláris kéreg

ACTH: adrenokortikotrop hormon

AON: *nucleus olfactorius anterior*

aPC: *anterior piriform cortex*

ASS: akusztikus riasztó stimulus

au: *arbitrary unit*/önkéntes egység

BNST: *nucleus interstitialis striae terminalis*

BLA: *amygdala* bazolaterális magcsoportja

BO: *bulbus olfactorius*

CA: Ammon-szarv

CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript

CCK: kolekisztokinin

CeA: *amygdala* centrális magcsoportja

CHAT: kolin-acetil-transzferáz

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

CRH: kortikotropin *releasing* hormon

CRHR: kortikotropin *releasing* hormon receptor

CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz

Cy3: Cyanine 3

Cy5: Cyanine 5

Cys: cisztein

dabP: bakteriális D-box kötő PAR BZIP transzkripció faktor

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DG: *gyrus dentatus*

DIC: differenciális interferencia kontraszt

DMEM: *Dulbecco's-Modified Eagle Medium*

DRN: *nucleus raphe dorsalis*

EC: *entorhinalis* kéreg

EC₅₀: 50%-os hatás kiváltásához szükséges ligandum koncentráció

ECS: extracelluláris oldat

EW: Edinger-Westphal mag

EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag

EWpg: preganglionáris Edinger-Westphal mag

FST: *forced swim* teszt

GABA: gamma-amino-vajsav

Gad1: glutamát dekarboxiláz 1 mRNS

HPA: hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg

hTRPA1: humán tranziens receptor potenciál ankyrin 1 ioncsatorna

IL-1: interleukin 1

IL-6: interleukin 6

ISH: *in situ* hibridizáció

KO: *knockout*

LC: *locus coeruleus*

LH: laterális hipotalamusz

Lys: lizin

MeA: *amygdala* mediális magcsoportja

MRI: mágneses rezonancia *imaging*

Mm: *Mus musculus*

mTRPA1: egér tranziens receptor potenciál ankyrin 1 ioncsatorna

NeuN: neuronális nukleáris fehérje mRNS

NDS: *normal donkey serum*

OE: szaglóhám

OT: *tuberculum olfactorium*

OSN: a szaglóhám szenzoros bipoláris neuronjai

PAG: periaqueductális szürkeállomány

PBS: foszfát pufferelt sóoldat

PC: *piriform* kéreg

PCR: polimeráz láncreakció

PFA: paraformaldehid

PFC: prefrontális kéreg

Polr2a: RNS-polimeráz II A alegység

Ppib: peptidilprolil izomeráz B

PTSD: poszttraumás stressz betegség

PVN: *nucleus paraventricularis hypothalami*

S1-S6: transzmembrán szegmensek

SEM: *standard error of the mean*

SNS: szimpatikus idegrendszer

SON: *nucleus supraopticus*

SOC: *nucleus olivaris superior*

SP: P-anyag

SPS: *single prolonged* stressz

SSD: specifikus jeldenzitás

TG: trigeminális ganglion

TH: tirozin-hidroxiláz

TMT: 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolin

TNF- α : tumor nekrozis faktor- α

Trpa1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1 gén/mRNS

TSA: tiramid szignál amplifikáció

Ubc: ubikvitin C

Ucn1: *urocortin 1* mRNS

UCN1: *urocortin 1* peptid

Vglut1: vezikuláris glutamát transzporter 1 mRNS

vmPFC: ventromediális prefrontális kéreg

WT: vad típus

10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Konkoly J*, Kormos V*, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Al-Omari A, Szilágyi A, Szilágyi B, Zelena D, Pintér E

The role of TRPA1 channels in the central processing of odours contributing to the behavioural responses of mice

PHARMACEUTICALS (2021) 14(12):1336. doi: 10.3390/ph14121336.

Impakt faktor: 5,215

Független citáció: 1

Folyóirat besorolása (2022): Q1

* Megosztott elsőszerzős közlemény

Konkoly J*, Kormos V*, Gaszner B, Correia P, Berta G, Biró-Sütő T, Zelena D, Pintér E

Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel expressed by the Edinger-Westphal nucleus contributes to stress adaptation in murine model of posttraumatic stress disorder

FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2022) 10:1059073. doi: 10.3389/fcell.2022.1059073.

Impakt faktor: 5,5

Független citáció: 0

Folyóirat besorolása (2023): Q1

* Megosztott elsőszerzős közlemény

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 10,715

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összes független citációja: 1

11. KONFERENCIA RÉSZVÉTELEK

SZÓBELI ELŐADÁSOK

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Zelena D, Pintér E

Cerebral TRPA1 receptors influence the behavioural pattern of mice

OSCON 2022 – 4th International Translation Medicine Congress of Students and Young Physicans; Eszék (Horvátország); 2022. március 31- április 2.

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Zelena D, Pintér E

A centrális tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatornák szerepének vizsgálata poszttraumás stressz zavar (PTSD) egér modelljében

A MÉT 84. Vándorgyűlése - MMVBT 2022; Budapest (Magyarország); 2022. július 13-16.

POSZTER PREZENTÁCIÓK

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Zelena D, Pintér E

TRPA1 receptors expressed in the brain influence the sensation of odours and social behaviour of mice

XI. ISCTICO - HUPHAR - IUPHAR – Conference; Pécs (Magyarország); 2021. október 27-30.

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Zelena D, Pintér E

TRPA1 receptors expressed in the brain influence the sensation of odours and social behaviour of mice

X. Jubileumi Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia; Pécs (Magyarország); 2021. november 12-13.

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Török B, Correia P, Szabó A, Szidónia F, Berta G, Biró-Sütő T, Zelena D, Pintér E

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel expressed by the Edinger-Westphal nucleus plays role in posttraumatic stress disorder (PTSD) in mice

3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian Physiological Society; Plitvice (Horvátország); 2022. szeptember 22-25.

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Zelena D, Pintér E

The lack of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) alters the behavioural responses as well as the urocortin1 expression of the Edinger-Westphal nucleus in the mouse model of posttraumatic stress disorder

19th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology; Glasgow (Egyesült Királyság); 2023 július 2-7.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Pintér Erikának a Doktori iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek, illetve Dr. Gaszner Dr. Kormos Viktória egyetemi adjunktusnak a PhD munkám során nyújtott oktatómunkáért, vezetésért, anyagi támogatásért kutatói példamutatásért, tanácsokért és segítségért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Zelena Dórának az állatkísérletes modellekben, viselkedés vizsgálatokban és statisztikai analízisben nyújtott segítségéért és tanácsaiért, illetve az állatkísérleteknél használt eszközök és egerek biztosításáért.

Köszönettel tartozom Dr. Gaszner Balázsnak az immunfluoreszcens módszerek és RNAscope ISH során nyújtott anyagi támogatásáért és szakmai tanácsaiért, valamint a szövettani minták fotózásában nyújtott segítségéért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Sándor Zoltánnak az általunk is használt CHO sejtvonal létrehozásáért, valamint a Ca^{2+} beáramlás mérésénél nyújtott munkájáért, Dr. Kecskés Angélnak szakmai segítségéért, illetve Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkóphoz való hozzáférés biztosításáért.

Szeretnék köszönetet mondani Biró-Sütő Tündének asszisztensi munkájáért, Szabó Adriennek és Török Bibiánának az állatkísérleteknél, Dr. Ammar Al-Omarinak a laboratóriumi munka során, továbbá Schram Flóra TDK hallgatónak a morfológiai vizsgálatok kiértékelésében nyújtott segítségéért.

Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és az Élettani Intézet minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkámhoz.

Hálás köszönettel tartozom Családomnak, különösen Édesanyámnak és Édesapámnak, illetve Menyasszonyomnak szeretetükért, támogatásukért, türelmükért és segítségükért.

A PhD dolgozatban összefoglalt kutatási tevékenység anyagi támogatásáért köszönet illeti a támogatókat: Richter Gedeon Talentum Alapítvány: Richter Gedeon Kiválósági PhD. Ösztöndíj; Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal: TKP2021-EGA-16; Nemzeti Agykutatási Program 2.0: 2017-1.2.1.-NKP-2017-00002; Nemzeti Agykutatási Program 3.0: RRF-2.3.1-21-2022-00015.



Article

The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioural Responses of Mice

János Konkoly^{1,2,†}, Viktória Kormos^{1,2,3,†} , Balázs Gaszner^{2,3} , Zoltán Sándor^{1,2}, Angéla Kecskés^{1,2} , Ammar Alomari^{1,2}, Alíz Szilágyi^{4,5}, Beatrix Szilágyi^{4,5}, Dóra Zelena^{2,4,5,‡} and Erika Pintér^{1,2,*}

¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; konkojani1@gmail.com (J.K.); viktoria.kormos@aok.pte.hu (V.K.); zoltan.sandor@aok.pte.hu (Z.S.); angela.kecsek@aok.pte.hu (A.K.); alomariammar75@gmail.com (A.A.)

² Centre for Neuroscience, Szentágotthai Research Centre of the University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; balazs.b.gaszner@aok.pte.hu (B.G.); dora.zelena@aok.pte.hu (D.Z.)

³ Research Group for Mood Disorders, Department of Anatomy, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

⁴ Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; aliz_szilagyi@yahoo.com (A.S.); szilagyibeatrice0621@gmail.com (B.S.)

⁵ Institute of Experimental Medicine, H-1085 Budapest, Hungary

* Correspondence: erika.pinter@aok.pte.hu

† These authors contributed equally as first authors.

‡ These authors contributed equally as last authors.



Citation: Konkoly, J.; Kormos, V.; Gaszner, B.; Sándor, Z.; Kecskés, A.; Alomari, A.; Szilágyi, A.; Szilágyi, B.; Zelena, D.; Pintér, E. The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioural Responses of Mice. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1336.

<https://doi.org/10.3390/ph14121336>

Academic Editor: Arpad Szallasi

Received: 8 December 2021

Accepted: 14 December 2021

Published: 20 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), a nonselective cation channel, contributes to several (patho)physiological processes. Smell loss is an early sign in several neurodegenerative disorders, such as multiple sclerosis, Parkinson's and Alzheimer's diseases; therefore, we focused on its role in olfaction and social behaviour with the aim to reveal its potential therapeutic use. The presence of *Trpa1* mRNA was studied along the olfactory tract of mice by combined RNAscope in situ hybridisation and immunohistochemistry. The aversive effects of fox and cat odour were examined in parallel with stress hormone levels. In vitro calcium imaging was applied to test if these substances can directly activate TRPA1 receptors. The role of TRPA1 in social behaviour was investigated by comparing *Trpa1* wild-type and knockout mice (KO). *Trpa1* mRNA was detected in the olfactory bulb and piriform cortex, while its expression was weak in the olfactory epithelium. Fox, but not cat odour directly activated TRPA1 channels in TRPA1-overexpressing Chinese Hamster Ovary cell lines. Accordingly, KO animals showed less aversion against fox, but not cat odour. The social interest of KO mice was reduced during social habituation–dishabituation and social interaction, but not during resident–intruder tests. TRPA1 may contribute to odour processing at several points of the olfactory tract and may play an important role in shaping the social behaviour of mice. Thus, TRPA1 may influence the development of certain social disorders, serving as a potential drug target in the future.

Keywords: TRPA1; social behaviour; innate fear; piriform cortex; olfactory bulb; olfactory epithelium; 2-methyl-2-thiazoline; valeric acid

1. Introduction

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), a nonselective cation channel, may contribute to several physiological and pathological processes, including neurodegeneration. In our previous studies we provided substantial evidence that the lack of this ion-channel in *Trpa1* knockout (KO) animals decelerated the progression of diverse neurodegenerative processes (e.g., demyelination, fibre loss [1–3]), while the presence of TRPA1 ameliorated age-related memory decline [4]. Based on the role of TRPA1 receptors in the abovementioned pathological processes, we presume that this ion channel could be a promising therapeutic target in the treatment of these disorders. Smell loss is an early sign of neurodegeneration, therefore our study focused on the role of TRPA1 in olfaction.

The olfactory tract is one of the oldest among the principal sensory systems allowing smell. Olfaction begins in the olfactory epithelium (OE) located in the nasal cavity [5]. Its sensory bipolar neurons (OSN) have a peripheral dendrite which is responsible for odour sensation, and a central axon transmitting the stimuli—via glomerular synapses—to the glutamatergic cells of the olfactory bulb (OB) [5–7]. Another important cell type in the OB is the GABAergic granule cell, interacting with the neurotransmission of glutamatergic neurones [7]. The axon bundles of the glutamatergic cells form the olfactory tract and terminate in primary and secondary olfactory areas (i.e., anterior olfactory nucleus (AON), olfactory tubercle (OT), piriform cortex (PC), amygdala (AM) and entorhinal cortex (EC)) [8] (Figure 1). The largest primary olfactory area is the PC, which, after processing, transmits information to the secondary olfactory and association brain areas. Besides the above detailed main olfactory tract, the accessory olfactory system also conveys signals to higher-order centres contributing to behavioral responses, such as social interaction, in several mammalian species [9].

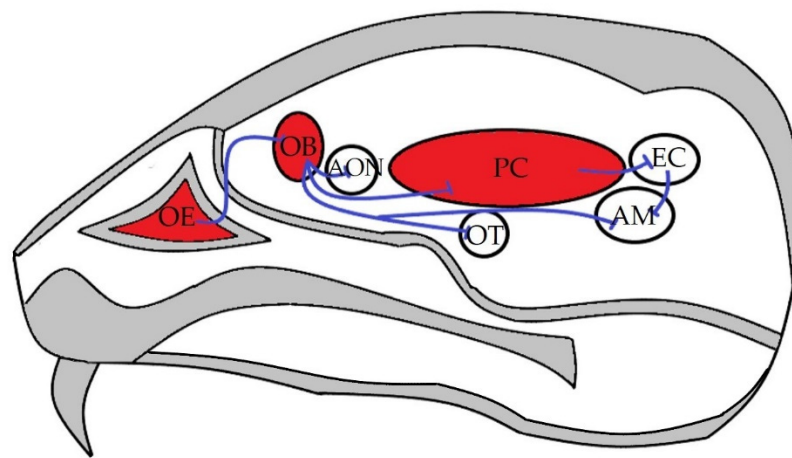


Figure 1. Schematic representation of the mouse olfactory tract. Red colour shows the investigated brain areas, Reprinted from ref [10]. Abbreviations: OE: olfactory epithelium, OB: olfactory bulb, AON: accessory olfactory nucleus, OT: olfactory tubercle, PC: piriform cortex, EC: entorhinal cortex, AM: amygdala.

The anatomical structure of the human olfactory tract resembles that of rodents. However, olfaction is not essential for human survival and the olfactory system therefore plays a less important role in our daily life, being less developed compared to animals (e.g., rodents) [5]. Nevertheless, olfactory stimuli contribute to our social behaviour [11]; furthermore, in most mammals, they are important in establishing social hierarchies, recognition of mating partners, and caring for offspring [12–15]; although this information may remain unconscious, acting presumably through the limbic system. In rodents, sniffing behaviour may contribute to agonistic social behaviour towards the conspecific, conveying multiple types of information [16]. However, the sniffing behaviour of mice varies with behavioural context and can also be modulated by nonolfactory signals [17]. Olfactory signals influence the development of both short- and long-term social memory [18]. In turn, object recognition by rodents requires only intact vision [19,20].

Moreover, the functional integrity of the olfactory system is necessary for the detection of food sources and avoiding predators [12], and can therefore contribute to innate fear and anxiety as well. Predator-derived chemostimuli, leading to avoidance behaviours, can be driven through the activation of both the main and the accessory olfactory system. Using these chemostimuli, an increased neuronal activation has been detected within some limbic structures (e.g., AM), playing an important role in innate fear and anxiety [21]. In line with the above, an altered activation of PC, and the bed nucleus of the stria terminalis (BST)—together with increased norepinephrine release in the hippocampus—can be responsible

for predator odour-evoked stress responses [22]. Interestingly, other authors could not detect enhanced innate fear using the same predator odour in naive mice [23].

A wide range of neurological diseases can be associated with olfactory dysfunction, such as schizophrenia [24], bipolar disorder, [25] major depression [26], and post-traumatic stress disorder [27]. Furthermore, anosmia is a typical symptom accompanying various neurodegenerative disorders [28,29]. The loss of smell may occur years before the onset of other symptoms of Parkinson and Alzheimer's disorders, being the first hint for the development of neurodegenerative processes [30,31].

Several chemoreceptors participate in olfaction, among others, multiple transient receptor potential (TRP) cation channels [32]. One member of this superfamily is the TRP subfamily A member 1 (TRPA1), which contains a long ankyrin domain at its N-terminal, the cytoplasmic region being responsible for its thermal and chemical sensitivity [33]. TRPA1 is expressed in various tissues and can be activated by different endogenous and exogenous ligands. TRPA1 channels on the nociceptive afferents participate in the generation of pain signals under physiological and pathophysiological conditions (e.g., inflammation, chronic pain) [33]. This is supported by the fact that an autosomal dominant point mutation of this receptor leads to familial episodic pain syndrome with incapacitating upper body pain in infants [34]. In addition, the role of this receptor was also confirmed in neuropathic pain [35–39]. TRPA1 receptors are expressed on the trigeminal nociceptors contributing to the detection of irritating volatile agents with an aversive odour. Moreover, the genetic deletion of *Trpa1* led to a significant decrease in the emergence of innate fear in *Trpa1* knock out (KO) mice compared to their wild-type (WT) counterparts when using 2-methyl-2-thiazoline (2-MT), a compound imitating fox odour [40]. In this study, 2-MT induced lower neuronal activation in *Trpa1* KO animals—measured by c-Fos immunohistochemistry—in the trigeminal ganglia (TG) and the OB. Subsequently, enhanced neuronal activation was revealed in some stress-sensitive brain regions (periaqueductal grey matter (PAG) and paraventricular nucleus (PVN)), suggesting the role of TRPA1 in the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, triggered by certain irritating compounds and mediated by TG and OB.

Here we aimed to reveal the expression of mouse *Trpa1* mRNA in the OE, OB and PC, the major parts of the olfactory tract. These brain areas are affected in the early stages of neurodegenerative disorders [29,31,41] explaining the emergence of anosmia even years prior to the onset of other neurological symptoms. To reveal the expression of *Trpa1* in the OE, OB and PC and determine the exact types of TRPA1-expressing cells, we performed RNAscope in situ hybridisation (ISH) combined with immunohistochemistry. To confirm the contribution of TRPA1 in predator odour-induced innate fear, we studied the receptor sensitivity towards the major components of fox (2-MT [40]) and cat odour (valeric acid [42,43]) in vitro using TRPA1-overexpressing CHO cells, and examined the behavioural influence of these two odours in WT and KO animals parallel with changes in stress hormone levels (adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone). Furthermore, to confirm the functional importance of TRPA1 channels in the olfactory tract, a detailed characterisation of the social behaviour of *Trpa1* KO and WT mice was also conducted.

2. Results

2.1. *Trpa1* mRNA Expression and Colocalisation in the Piriform Cortex, Olfactory Bulb, and in the Olfactory Epithelium by RNAscope ISH

To assess the possible presence of *Trpa1* in OSNs, RNAscope ISH for *Trpa1* mRNA was combined with anti- β -tubulin III immunohistochemistry, a selective marker of this cell type in the OE [44,45]. *Trpa1* mRNA was poorly detectable in the OE and did not colocalise with β -tubulin III (Figure 2a). In the OB, the *Trpa1* mRNA was colocalised in almost all cases with the neuronal marker, neuronal nuclear protein (NeuN), suggesting its almost exclusive neuronal presence (Figure 2b). In addition, using double RNAscope labelling, *Trpa1* mRNA was moderately expressed in glutamate decarboxylase 1 (*Gad1*) mRNA containing GABAergic neurons of the OB, but was poorly detected on glutamatergic excitatory neurons characterised by vesicular glutamate transporter 1 (*Vglut1*) (Figure 2c).

In the PC, the RNAscope technique was sensitive enough to detect considerable amounts of *Trpa1* mRNA positive cells. In this region, the *Trpa1* mRNA was shown only on the Vglut1 mRNA containing excitatory neurons and did not colocalise with Gad1-positive cells (Figure 2d).

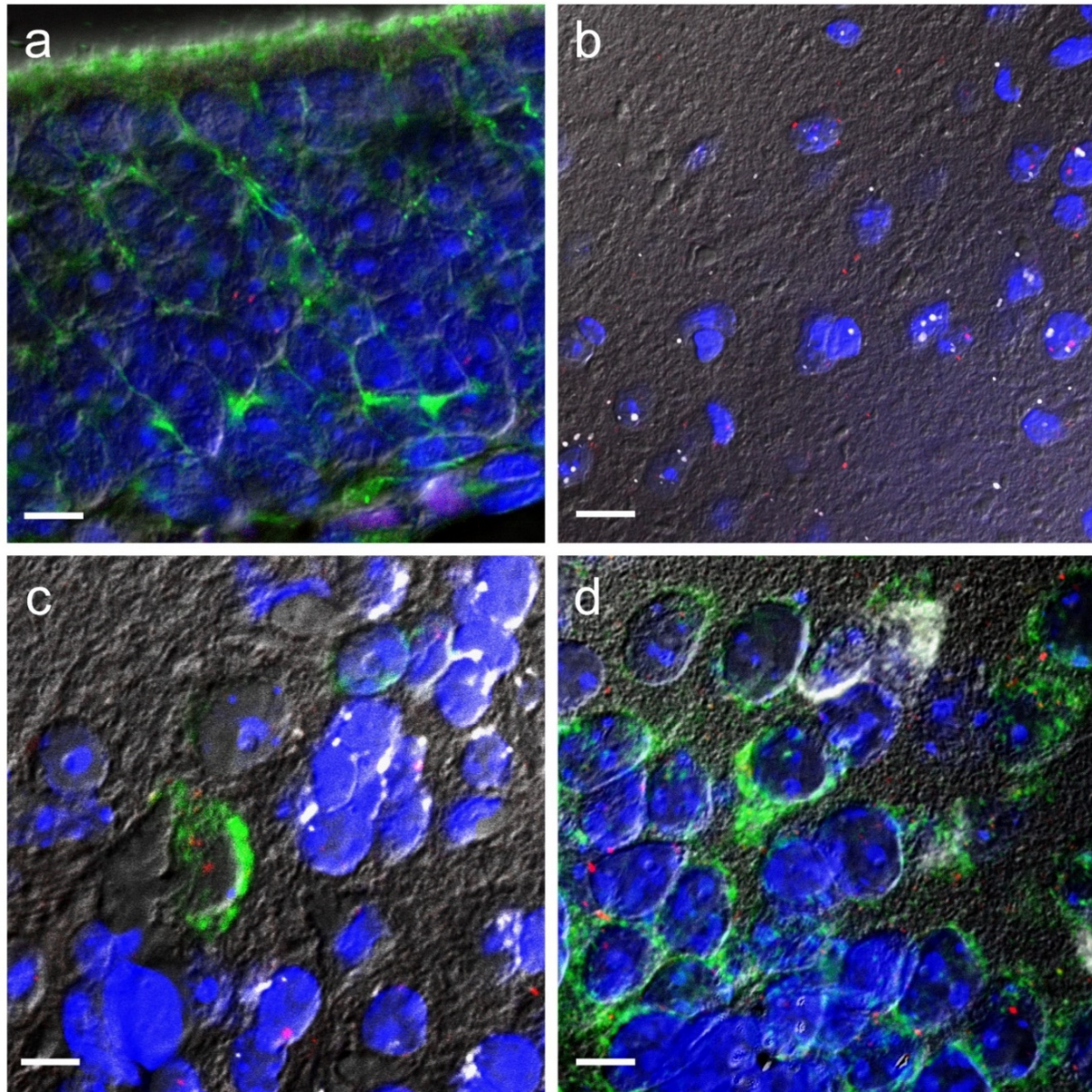


Figure 2. Expression of *Trpa1* mRNA in the investigated regions of the olfactory system of C57BL/6 mice ($n = 4$). *Trpa1* (red) mRNA signal did not colocalise with β -tubulin III (green) immunoreactive cells in the OE (a). *Trpa1* (red) mRNA signal colocalised exclusively with NeuN (white) positive neurons in the OB (b). *Trpa1* (red), Gad1 (white) and Vglut1 (green) mRNA expression in the OB (Bregma 3 mm), (c) and in the PC (d) (Bregma -1.46 mm). *Trpa1* mRNA signal colocalised both with Gad1 and Vglut1 positive neurons in the OB (c), but it colocalised only with Vglut1 positive neurons in the PC (d). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue) in all areas. Abbreviations: NeuN: neuronal nuclear protein, Gad1: glutamate decarboxylase 1, Vglut1: vesicular glutamate transporter 1, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole. In order to highlight the cell borders, differential interference contrast (DIC) images were merged with the virtual color images. Bars: 10 μ m.

2.2. TRPA1 and Predator Olfaction

2.2.1. Fox (2-MT) and Cat Odour (Valeric Acid) Induced Calcium Influx in Mouse and Human TRPA1-Overexpressing CHO Cells

Human and mouse TRPA1 channel-overexpressing Chinese Hamster Ovary cells (CHO) ($n = 5-6 \times 10^4$ cells per data point) showed a concentration-dependent increase in the green fluorescence ratio compared to dye-loaded unstimulated cells in response to 2-MT (fox odour), both in the case of mouse and human receptor expressing cells, without significant differences between the receptor activation of the two species (Figure 3a). The EC₅₀ value was 5010 $\mu\text{mol/L}$ in human and 4419 $\mu\text{mol/L}$ in mouse TRPA1-expressing cells. CHO cells not expressing TRPA1, used as a negative control, did not respond to 2-MT. Similarly, neither TRPA1-expressing cell lines responded to valeric acid (cat odour) (Figure 3b).

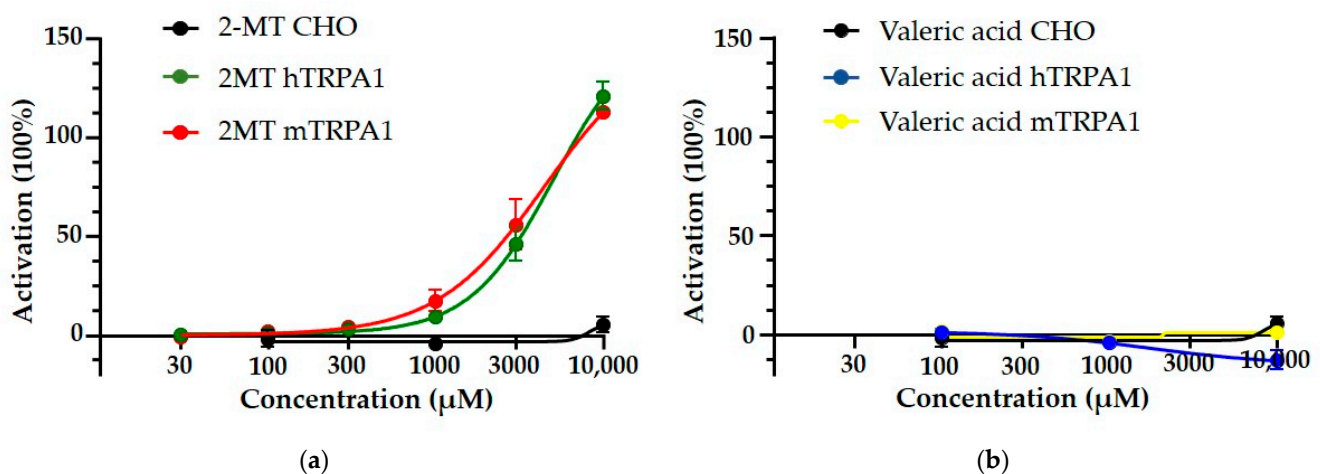


Figure 3. Effect of fox (2-MT) and cat odour (valeric acid) on the calcium response in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells expressing human and mouse TRPA1 (hTRPA1 and mTRPA1, respectively) receptors. An increased calcium response was characterised by an enhanced ratio of Fluo-4 AM fluorescence compared to dye-loaded unstimulated cells. 2-MT resulted in a concentration-dependent elevation of the calcium response with an EC₅₀ value of 5010 $\mu\text{mol/L}$ in human TRPA1-expressing cells and with an EC₅₀ value of 4419 $\mu\text{mol/L}$ in mouse TRPA1-expressing cells (a). Applying valeric acid, neither human nor mouse TRPA1-expressing cell lines showed an elevated Ca²⁺ signal (b). No change of the calcium response was detected in CHO cells not expressing TRPA1 in response to 100, 1000 and 10,000 $\mu\text{mol/L}$ 2-MT or valeric acid. $n = 5-6 \times 10^4$ cells for all types of cell lines, all experiments were performed four times.

2.2.2. Interest of *Trpa1* WT and KO Animals towards Fox (2-MT) and Cat Odour (Valeric Acid)

Considerable differences were detected between WT and KO mice during the 2-MT evoked odour aversion test. Both the duration and the frequency of sniffing the odour holder was significantly higher in *Trpa1* KO mice compared to WT animals ($t_{\text{duration}}(2,23) = -6.52, p < 0.01$; $t_{\text{frequency}}(2,23) = -8.43, p < 0.01$) (Figure 4a,b). On the other hand, freezing lasted for a significantly shorter period and occurred much less frequently in KO mice ($t_{\text{duration}}(2,23) = 11.78, p < 0.01$; $t_{\text{frequency}}(2,23) = 2,81, p < 0.01$) (Figure 4c,d).

In the case of valeric acid, similar differences were observed between the genotypes in sniffing ($t_{\text{duration}}(2,19) = -3.27, p < 0.01$; $t_{\text{frequency}}(2,19) = -2.40, p < 0.03$) (Figure 5a,b), while only a tendentious difference was observed for freezing ($p_{\text{frequency}} > 0.50, p_{\text{duration}} > 0.14$) (Figure 5c,d). During this experiment, we investigated the temporal alterations of the frequency and duration of sniffing and found that KO animals sniffed the filter paper more often ($F_{\text{genotype}}(1,18) = 4.44, p < 0.05$; $F_{\text{interaction}}(9,162) = 2.11, p < 0.04$) and for a longer time ($F_{\text{genotype}}(1,18) = 9.29, p < 0.01$; $F_{\text{interaction}}(9,162) = 1.96, p < 0.05$) predominantly at the beginning and end of the examination ($p_{2\text{fr}} < 0.04, p_{5\text{fr}} < 0.01, p_{7\text{fr}} < 0.03$,

$p_{8fr} < 0.05$ and $p_{2dur} < 0.03$, $p_{5dur} < 0.01$, $p_{7dur} < 0.01$, $p_{8dur} < 0.01$, $p_{10dur} < 0.04$) compared to their WT mates (Figure 5e,f). However, neither in the case of frequency nor duration, was any significant effect of time detectable ($F_{time\ frequency} (9,162) = 0.49$, $p > 0.88$; $F_{time\ duration} (9,162) = 1.02$, $p > 0.42$).

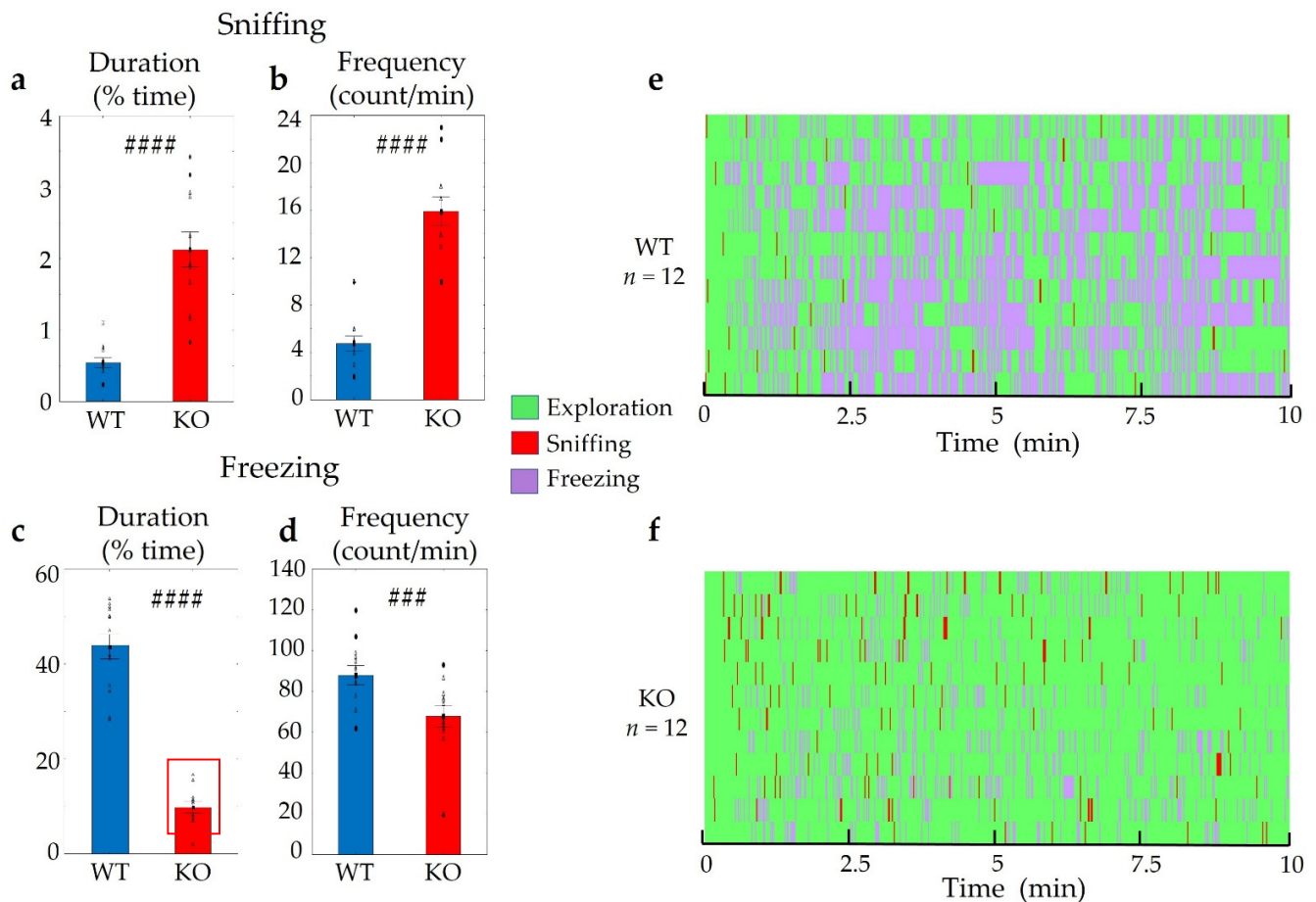


Figure 4. Behavioural differences in *Trpa1* wild-type (WT) and knockout (KO) mice triggered by the fox odour, 2-MT. Remarkable differences were established in the duration and frequency of sniffing the odour holder (a,b) and freezing behaviour (c,d) between the two groups. The Gantt diagram presents the individual animals (e,f). $n = 12$ in both (WT and KO) groups, the symbol # shows a significant difference between the two genotypes, in cases with ### $p < 0.001$, and #### $p < 0.0001$. Blank triangles represent individual values while dark spots show outliers (characterized by a higher or lower value than $\text{mean} \pm 2$ standard deviation (SD)).

2.2.3. Hormone (ACTH and Corticosterone) Measurements in WT and KO Mice after Using 2-MT or Valeric Acid

The investigation of blood samples at the end of a 10 min odour exposure revealed significantly higher ACTH levels in KO mice after using 2-MT ($t(1,19) = -3.02$, $p < 0.01$) (Figure 6a). However, differences in corticosterone levels were not established [$t(1,23) = -0.85$, $p > 0.4$] (Figure 6b). Moreover, after the odour aversion test with valeric acid, no differences in either ACTH ($t(1,11) = 1.69$, $p > 0.11$) or in corticosterone levels ($t(1,13) = -0.71$, $p > 0.49$) could be detected (Figure 6c,d).

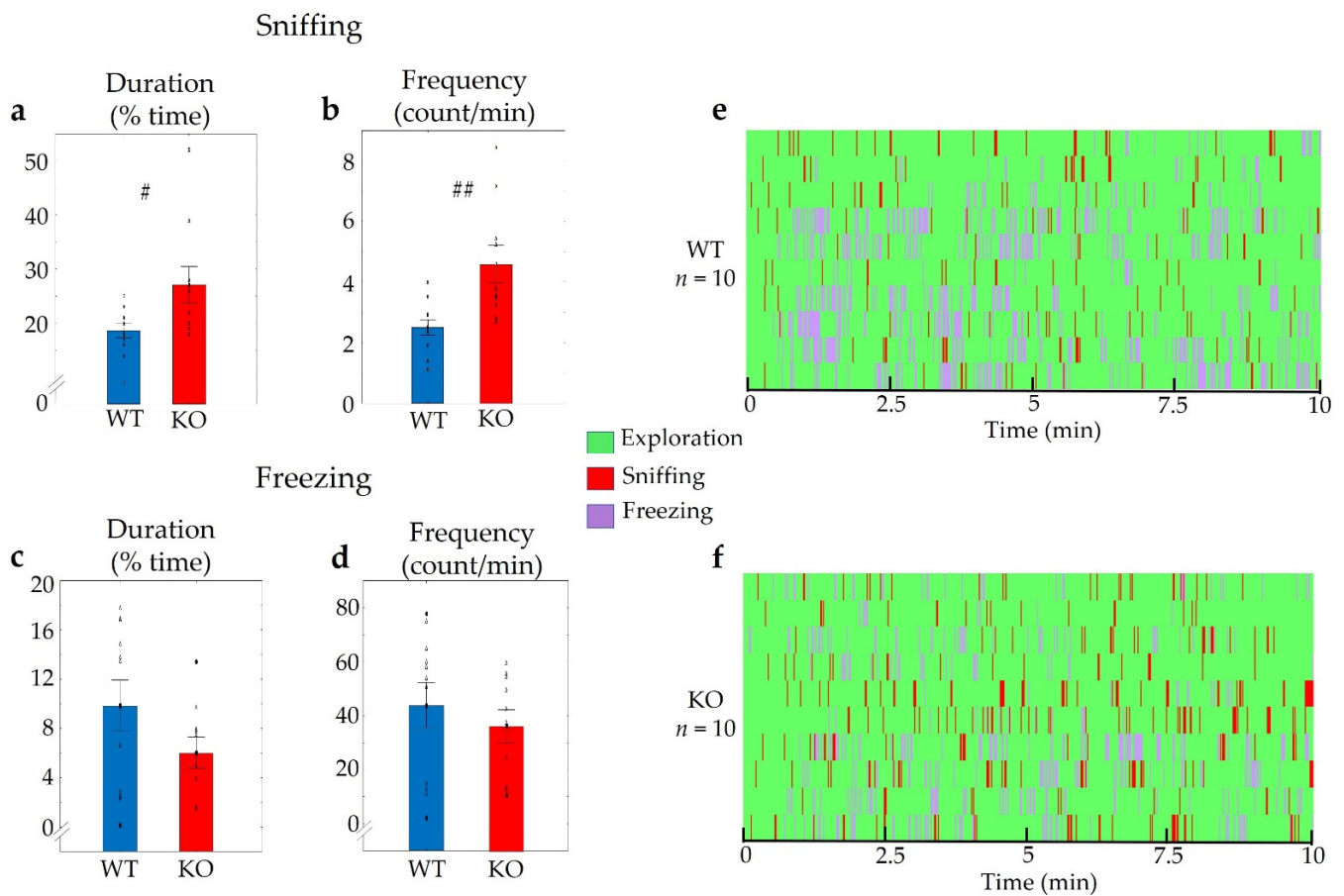


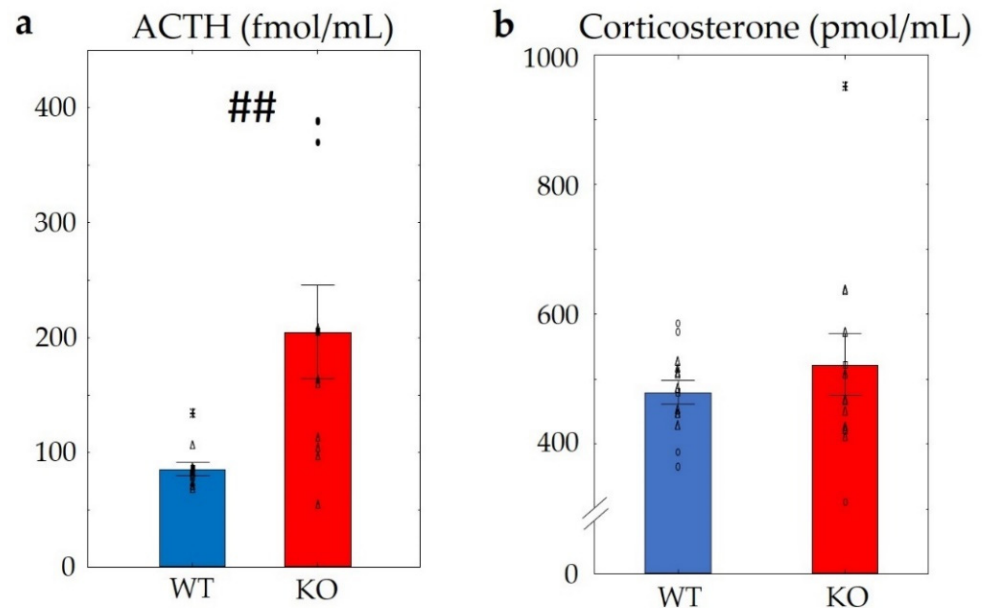
Figure 5. Behavioural differences in *Trpa1* WT and KO mice triggered by the major component of cat odour, valeric acid. Significant differences were detected in the duration (a) and frequency (b) of sniffing the odour holder between the two groups. However, differences in innate fear (freezing) were not present in this trial (c,d). Individual values are represented on a Gantt diagram (e,f). $n = 10$ in both (WT and KO) groups, the symbol # shows a significant difference between the two genotypes, in cases with # $p < 0.05$, and ## $p < 0.01$. Blank triangles represent individual values while dark spots show outliers (characterized by a higher or lower value than mean ± 2 standard deviation (SD)).

2.3. TRPA1 and Social Behaviour

2.3.1. Object Habituation–Dishabituation and Social Habituation–Dishabituation Tests in WT and KO Mice

No significant differences were detected in the duration or frequency of sniffing during the object habituation–dishabituation trial within or between the groups (duration: $F_{\text{time}}(4,40) = 1.17$, $p > 0.33$; $F_{\text{genotype}}(1,10) = 0.32$, $p > 0.58$; $F_{\text{interaction}}(4,40) = 0.46$, $p > 0.76$ and frequency: $F_{\text{time}}(4,40) = 2.00$, $p > 0.11$; $F_{\text{genotype}}(1,10) = 0.17$, $p > 0.68$; $F_{\text{interaction}}(4,40) = 0.32$, $p > 0.86$), either when the same object was presented repeatedly, or when a new object was introduced (Figure 7a,b).

2-MT



Valeric acid

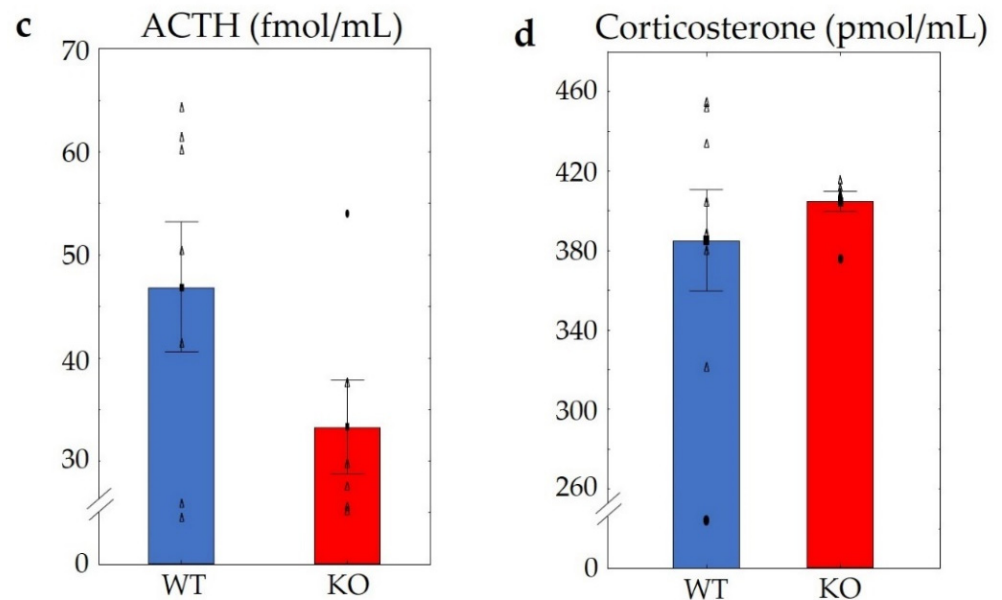
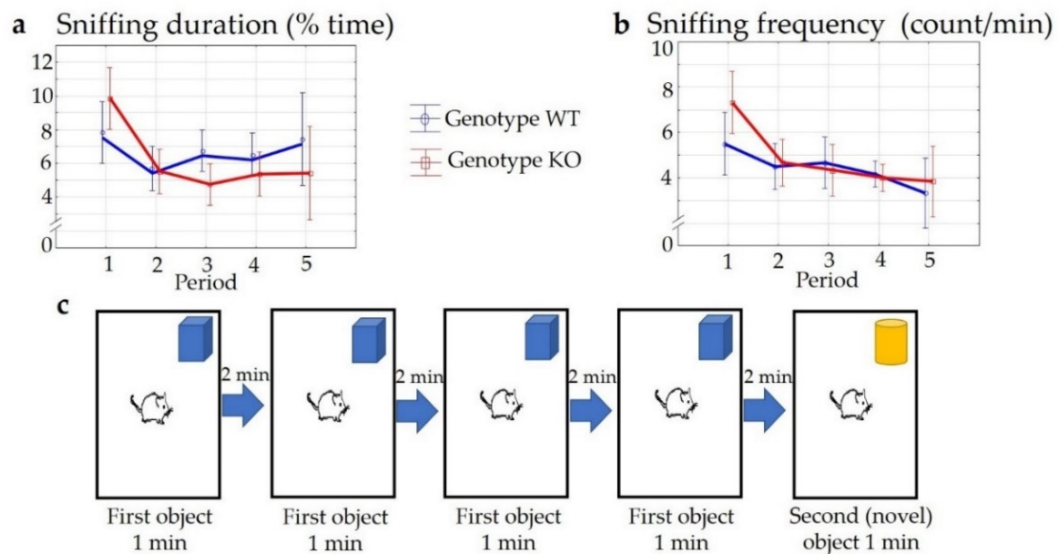


Figure 6. Serum adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone levels of WT and KO mice after using 2-MT or valeric acid. Applying 2-MT, KO mice showed significantly higher ACTH levels than WTs (a), without significant differences in the corticosterone levels (b). Using valeric acid, no differences in either ACTH (c) or in corticosterone levels (d) were detectable. The symbol # shows a significant difference between the two genotypes, in cases with ## $p < 0.01$. $n = 10$ in both (WT and KO) groups. Blank triangles represent individual values while dark spots show outliers (characterized by a higher or lower value than mean ± 2 standard deviation (SD)).

Object habituation



Social habituation

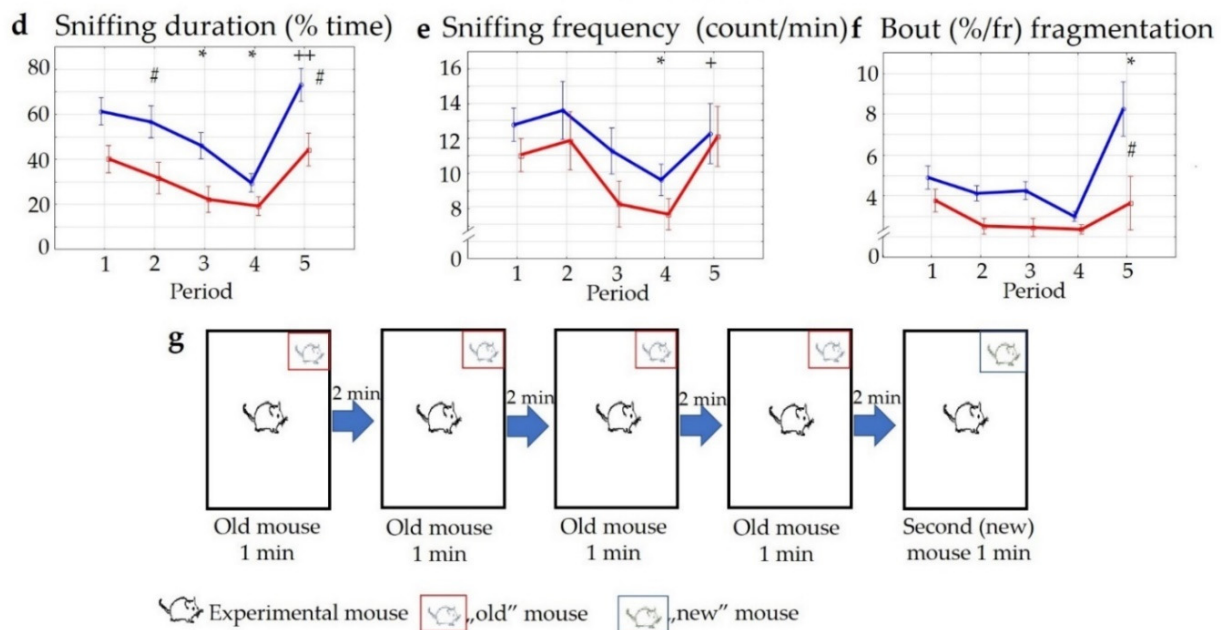


Figure 7. Results of object (a–c) and social habituation–dishabituation trials (d–g). There was no difference in the duration and frequency of sniffing an object between the genotypes during the object habituation test (a,b). During the social habituation trial, a remarkable decrease in the social behaviour was shown using the first stimulus repeatedly in mice of both genotypes. However, after adding a novel stimulus for mice, the social interactions were again increased (d–f). The social behaviour of KO mice was lower than WT mice during the whole examination period, with significant differences in the 2nd and 5th part of the trial (d). $n = 12$ in both groups, the symbol # shows a significant difference between KO and WT mice ($p < 0.05$); * shows a significant difference between the periods compared to the 1st part of the trial in the same group, in cases with $* p < 0.05$; + shows a significant difference between the 4th and the 5th part of the trial in the same group, in cases with $+ p < 0.05$ and $++ p < 0.01$.

In contrast, the social stimulus was more attractive than the object. Accordingly, the duration of social interactions was higher in both groups during the first encounter with the (“old”) stimulus mice but reduced rapidly during subsequent presentations ($F_{\text{time}}(4,88) = 15.48, p < 0.01$) (Figure 7d). This decrease in the social behaviour was significant during the third and fourth encounter in the case of KO animals ($p < 0.05$) and during the fourth encounter in the case of WT animals ($p_4 < 0.01$). On the other hand, a remarkable increase in social interest was detectable using novel stimulus mice during the fifth period of the examination ($p < 0.01$ in both genotypes). The abovementioned alterations were present in both genotypes; however, the level of the social behaviours was lower in the KO mice during the whole experiment ($F_{\text{genotype}}(1,22) = 12.61, p < 0.01$; $F_{\text{interaction}}(4,88) = 1.04, p > 0.39$). A post hoc comparison revealed a significant genotype difference during the second and the fifth period of the trial ($p < 0.05$). Similar temporal alterations were detected in the case of the frequencies of the social interactions ($F_{\text{time}}(4,88) = 4.49, p < 0.01$), and these differences were significant during the fourth and fifth encounter in both genotypes ($p < 0.05$), although significant differences could not be established between WT and KO animals ($F_{\text{genotype}}(1,22) = 2.02, p > 0.16$; $F_{\text{interaction}}(4,88) = 0.39, p > 0.82$) (Figure 7e). On the other hand, the length of one sniffing period (bout fragmentation; duration/frequency) was also significantly lower in KO animals ($F_{\text{genotype}}(1,22) = 14.10, p < 0.01$; $F_{\text{time}}(4,88) = 7.30, p < 0.01$) and this effect was especially visible when new stimulus mice were introduced ($F_{\text{interaction}}(4,88) = 2.71, p < 0.05$) (Figure 7f). The level of aggression was very low (occurred an average of one time during the 1 min interaction) and without genotype differences.

2.3.2. “Three Chamber” Sociability Experiment in WT and KO Animals

During the habituation phase of a subsequent sociability test, KO animals investigated the objects more frequently than their counterparts ($F_{\text{genotype}}(1,10) = 8.9, p < 0.02$), without a significant side preference ($F_{\text{side}}(1,10) = 3.65, p > 0.08$) and there was no genotype effect detectable on the side preference ($F_{\text{interaction}}(1,10) = 0.41, p > 0.53$) (Figure 8a). In the case of the investigation duration, the main significant effects of genotype and side preference were detected ($F_{\text{genotype}}(1,10) = 7.41, p < 0.03$; $F_{\text{side}}(1,10) = 6.32, p < 0.04$), although a post hoc comparison did not reveal significant differences ($p > 0.05$ in all cases), and the genotype did not influence the side preference ($F_{\text{interaction}}(1,10) = 0.01, p < 0.92$) (Figure 8d).

During the sociability (third) phase, all animals showed a higher duration of interest towards the social stimulus (first stimulus mice) ($F_{\text{effect of choice}}(1,10) = 21.23, p < 0.01$), without significant differences between the two genotypes ($F_{\text{genotype}}(1,10) = 0.07, p > 0.79$; $F_{\text{interaction}}(1,10) = 0.65, p < 0.43$). Moreover, there was no significant difference in the frequency of interest between the two genotypes ($F_{\text{genotype}}(1,10) = 0.41, p > 0.53$; $F_{\text{interaction}}(1,10) = 0.59, p > 0.45$), although the main effect of choice was significant ($F_{\text{effect of choice}}(1,10) = 9.24, p < 0.02$; in a post hoc comparison $p_{\text{WT}} > 0.13$ and $p_{\text{KO}} > 0.08$) (Figure 8b,e). A single sample t-test showed a remarkable social interest in the sociability index of both groups ($t_{\text{WT}}(1,4) = 6.70, p < 0.01$; $t_{\text{KO}}(1,6) = 2.98, p < 0.05$) when compared to the 50% chance level (Figure 8g).

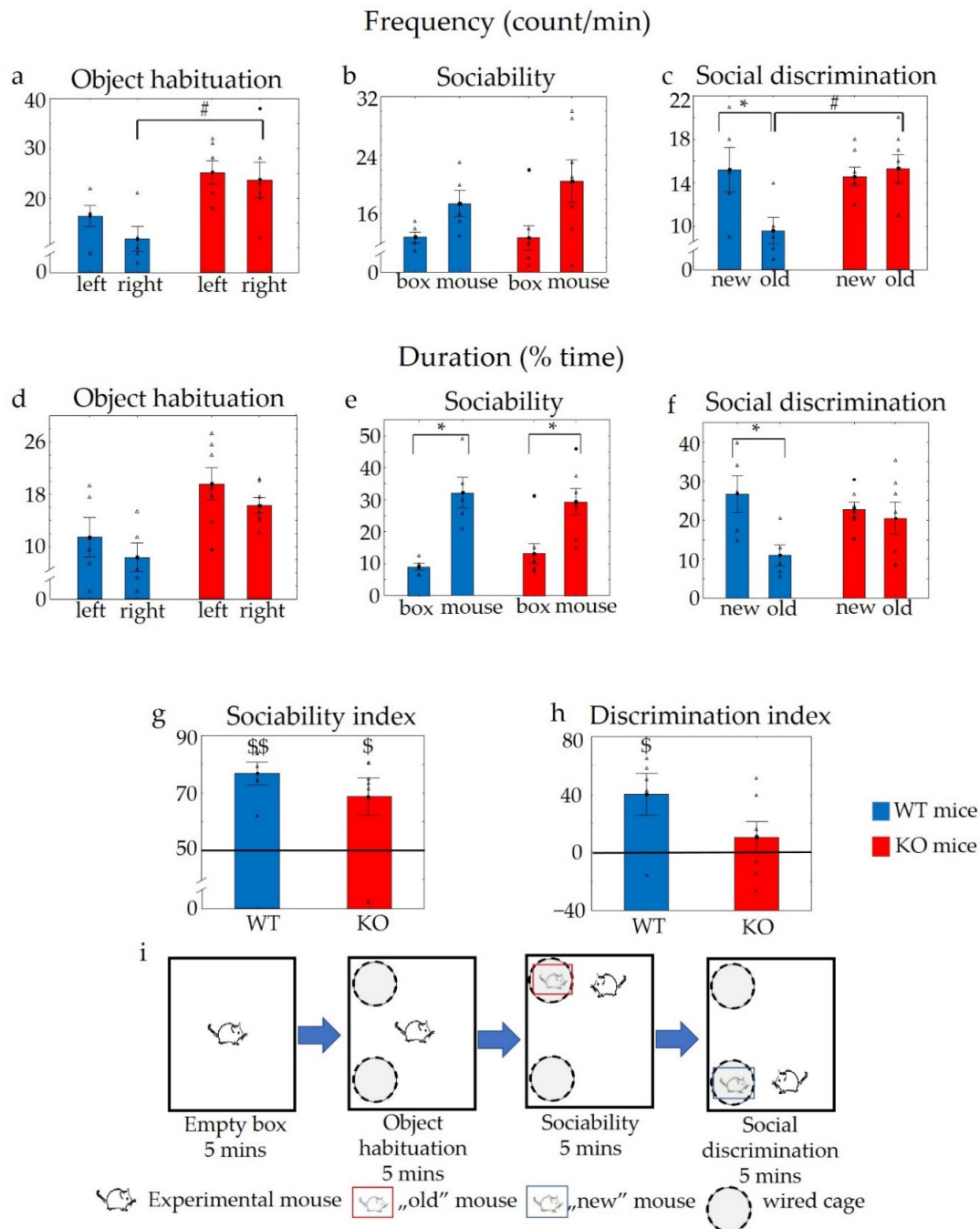


Figure 8. Results of the sociability test. During the object habituation phase, the KO animals investigated the objects more times than the WTs (a), but the difference in the duration was not significant (d). During the sociability phase, increased interest was detected towards the social stimulus in both groups without significant genotype differences (b,e). During the social discrimination phase, WT animals demonstrated increased interest towards the novel stimulus mice, but this kind of difference were not detectable in KO mice (c,f). Both genotypes revealed significant social interest as represented by a sociability index higher than 50% (g). However, only WTs showed intact short-term social memory as represented by a discrimination index higher than 0 (h). Schematic representation of the sociability trial (i). $n = 5$ in WT and $n = 7$ in KO groups, the symbol # shows a significant difference between KO and WT mice ($p < 0.05$); * shows a significant difference between the two sides with wired cages, in cases with $* p < 0.05$; \$ shows a significant difference in the same group using a single sample t-test, in cases with $\$ p < 0.05$, and $\$\$ p < 0.01$. Blank triangles represent individual values while dark spots show outliers (characterized by a higher or lower value than $\text{mean} \pm 2$ standard deviation (SD)).

During the social discrimination phase (last part) WT mice sniffed the novel stimulus animals significantly more often than the old counterparts ($F_{\text{interaction}}(1,10) = 7.06$, $p < 0.02$) (Figure 8c). However, there was no difference in the frequency of interest towards the new stimulus animals between the two genotypes ($F_{\text{genotype}}(1,10) = 2.77$, $p > 0.13$; $F_{\text{effect of choice}}(1,10) = 4.23$, $p > 0.06$). On the other hand, KO mice showed a significantly higher interest towards the old stimulus animals compared to the WT genotype ($p < 0.04$ in the post hoc comparison). In addition, WT mice dealt with the novel stimulus mice for a significantly longer time ($F_{\text{effect of choice}}(1,10) = 6.21$, $p < 0.04$; in the post hoc comparison $p < 0.05$), while a similar tendency in the duration of sniffing could not be detected in KO animals ($p > 0.66$) (Figure 8f). With respect to this parameter, there were no differences between the two groups ($F_{\text{genotype}}(1,10) = 0.65$, $p > 0.44$; $F_{\text{interaction}}(1,10) = 3.49$, $p > 0.09$). No direct differences in the sociability index (preferring the mice containing box above the empty one during the third phase of the test) and discrimination index (preferring the new stimulus animal above the old one during the fourth phase of the test) were detectable between the genotypes ($p_{\text{SI}} > 0.36$ and $p_{\text{DI}} > 0.12$). However, using a single sample t -test, only the WT mice showed an intact memory ($t_{\text{WT}}(1,4) = 2.78$, $p < 0.05$) (discrimination index > 0) and such an effect was not shown in KO animals ($p > 0.38$) (Figure 8g,h).

2.3.3. Social Interaction and Resident–Intruder Trials in WT and KO Mice

During the social interaction test, differences in the sniffing frequency, representing friendly social interaction, were not detectable between the genotypes ($t(2,22) = 1.06$, $p > 0.3$) (Figure 9a), but we observed a significantly reduced time spent sniffing a conspecific ($t(2,22) = 2.25$, $p < 0.04$) (Figure 9b) and a decreased sniffing bout length ($t(2,22) = 3.26$, $p < 0.01$) (Figure 9c) in KO mice. On the other hand, we could not detect aggressive interactions during this experiment.

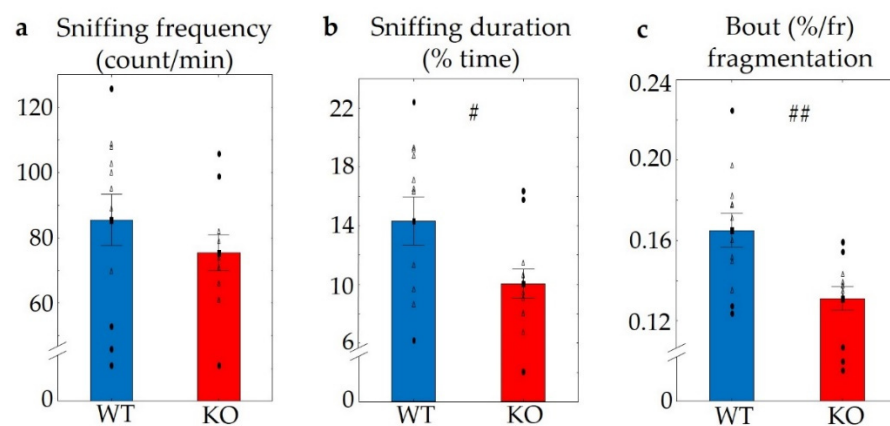
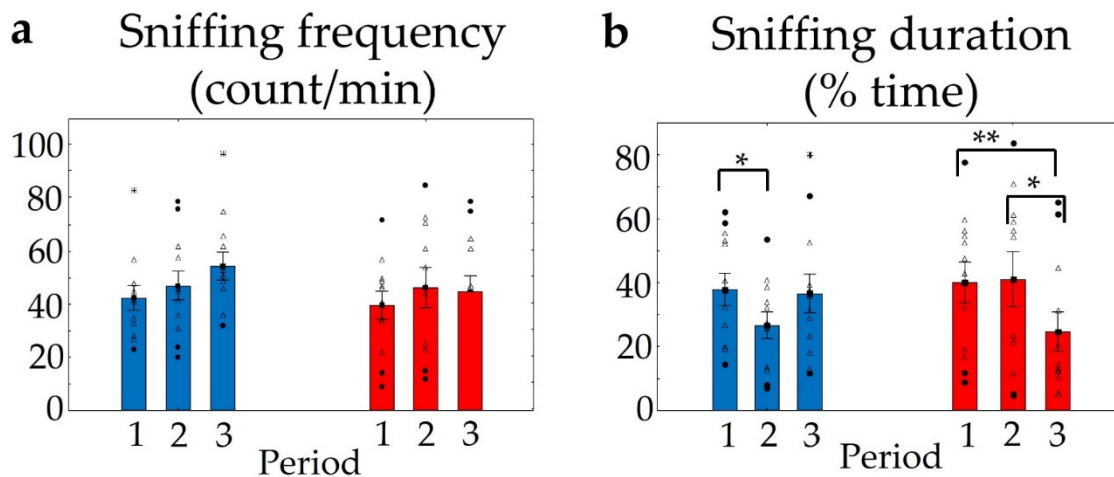


Figure 9. Results of the social interaction test. No differences were detected in the frequency of social behaviour between the two genotypes (a); however, a decreased duration of sniffing (b) and bout fragmentation (c) were detected in KO mice. $n = 12$ in both groups, the symbol # shows a significant difference, in cases with # $p < 0.05$, and ## $p < 0.01$. Blank triangles represent individual values while dark spots show outliers (characterized by a higher or lower value than mean ± 2 standard deviation (SD)).

During repeated resident–intruder trials one week apart, we evaluated home cage defence, and no alterations were detected in the frequency of social behaviour within and between the two genotypes ($F_{\text{genotype}}(1,21) = 0.50$, $p > 0.48$; $F_{\text{time}}(2,42) = 1.07$, $p > 0.35$; $F_{\text{interaction}}(2,42) = 0.36$, $p > 0.7$) (Figure 10a), but the duration of friendly social behaviour was decreased significantly in both groups by repeating the trials ($F_{\text{time}}(2,42) = 2.62$, $p > 0.08$; in a post hoc comparison $p_{\text{WT and KO 1-2 period}} < 0.05$, $p_{\text{KO 2-3 period}} < 0.01$; and $F_{\text{interaction}}(2,42) = 5.14$, $p < 0.01$), although genotype differences could not be detected ($F_{\text{genotype}}(1,21) = 0.11$, $p > 0.74$) (Figure 10b). In addition, there was no significant temporal alteration in aggression ($F_{\text{time duration}}(2,42) = 1.18$, $p > 0.31$; $F_{\text{time frequency}}(2,42) = 0.86$,

$p > 0.43$), as well as no detectable genotype effect ($F_{\text{genotype duration}} (1,21) = 0.002, p > 0.96$ and $F_{\text{genotype frequency}} (1,21) = 0.07, p > 0.79$) and the genotype did not influence the temporal changes ($F_{\text{interaction duration}} (2,42) = 1.67, p > 0.2$; and $F_{\text{interaction frequency}} (2,42) = 1.91, p > 0.16$) (Figure 10c,d).

Social behaviour



Aggressive behaviour

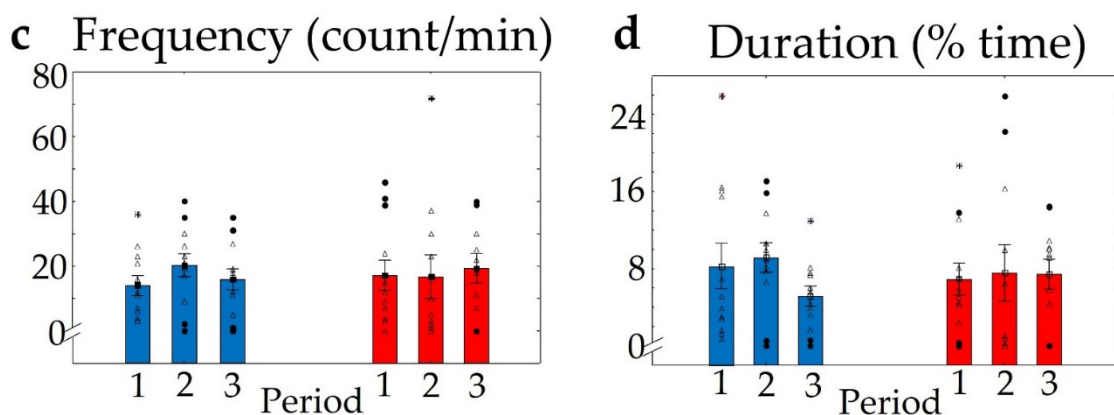


Figure 10. Results of resident–intruder trials. Numbers 1,2,3 represent 10 min trials 1 week apart. No significant differences were found in the frequency of social behaviour between the two genotypes (a). The duration of sniffing decreased significantly in both groups during the subsequent trials, although relevant temporal differences were detectable only in KOs (b). Neither the frequency nor the duration of aggressive interactions were significantly altered by time or by genotype (c,d). $n = 12$ in both groups, $* p < 0.05$ and $** p < 0.01$ show a significant difference between repeated trials in the same group. Blank triangles represent individual values while dark spots show outliers (characterized by a higher or lower value than mean ± 2 standard deviation (SD)).

3. Discussion

Here, we demonstrated the presence of *Trpa1* mRNA in various parts of the olfactory system with a prominent expression in the OB, colocalised with GABAergic and glutamatergic markers, and in the PC, with glutamatergic cells. In accordance with previous results, we confirmed that the TRPA1 channel is an important player of innate fear induced by a predator odour [40]. Our in vitro results, using TRPA1-overexpressing CHO cell lines revealed that only fox, but not cat odour is able to directly activate TRPA1 receptors in the OE and may contribute to a subsequent triggering of avoidance behaviour. Moreover,

we also found that TRPA1 is a significant player in friendly, but not aggressive social interest and intact social memory, as in its absence, reduced social investigation was found during social habituation–dishabituation and social interaction tests and there was a loss of memory during the social discrimination phase of the sociability test.

It has already been suggested that fox odour is a direct activator of chemosensory TRPA1 channels in the OE [40]. Indeed, during the evaluation of Ca^{2+} influx in TRPA1-expressing CHO cells, we found that both the mouse and the human receptors respond to 2-MT. However, in our case the effective concentration was higher than previously described [40]. These differences might be explained by the different cell lines, and by the different experimental conditions. On the other hand, valeric acid could not induce any responses on either receptor. Indeed, valeric acid is a chemical compound belonging to the group of carboxylic acids and does not have an electrophilic structure, suggesting that it cannot directly influence TRPA1 receptors. Interestingly, KO mice showed slightly different behaviour to cat odour compared to their WT pairs. Although in the case of cat odour (valeric acid) a genotype difference was detected, but only in the interest towards the odour holder, not in freezing, and this might be explained by the overall less fearful nature of the cat odour. (In the case of fox odour this behavioural pattern accounts for around 45% of the entire time in WT mice and 10% in KO mice, while in case of cat odour around 10% in WT and 5% in KO animals.) Thus, we cannot exclude the possibility that the freezing reduction in KOs is masked by this low “basal” level. Despite its contribution to the behavioural consequences of predator odour, the lack of TRPA1 does not reduce fear responses in general. For example, in the case of conditioned fear, an amygdala–hippocampal–prefrontal cortex-dependent paradigm [46], *Trpa1* KO mice showed enhanced rather than reduced freezing [47]. Thus, we might assume that the interest towards an odour stimulus can be mediated by TRPA1 receptors through the olfactory system, more specifically in its central part, e.g., in the OB and PC, as the OE does not contain a considerable amount. As the chemical particles of the odour cannot directly reach the secondary/tertiary neurones, the TRPA1-induced alteration in sniffing time and frequency will be independent from the odour type. However, it must be also considered, that TRPA1 agonists (like fox odour) may lead to the activation of trigeminal nociceptors in the nasal epithelium, triggering local pain responses [48], which may also strongly influence the behavioural responses of the animals. Pain itself as well as a direct connection between the PC and PVN [49] may enhance the neuronal activity of stress-sensitive brain areas (e.g., PAG, PVN) [40] and certain limbic structures (e.g., hippocampus, BST) [22]. Controversially, the *Trpa1* KO animals reacted to 2-MT with higher ACTH levels, without any genotype differences in the corticosterone levels. This observation may be the consequence of their increased motility resulting from their less intense innate fear responses. Previous studies confirmed a connection between locomotion and ACTH levels [50]. In contrast to our findings, in another study the application of 2-MT induced a lower corticosterone elevation of KO animals compared to their WT counterparts [40]. This discrepancy can be explained by the different concentration of 2-MT used as well as by the distinct duration of the trials which might have covered the previously observed difference. More importantly, after applying valeric acid, none of the abovementioned stress hormones showed differences between the genotypes. This fact further confirms that the sensation of different odours may activate different pathways and that TRPA1 channels might influence this process at different places (e.g., in the case of fox odour, the trigeminal ganglion (pain) can activate the stress axis, while in the case of cat odour the OB/PC pathway might be involved in shaping the behaviour of the animals).

In support of this behavioural role of central TRPA1 receptors, a decreased social interest of KO mice was detected in the social habituation–dishabituation and social interaction trials. In agreement with this, they had a worse social memory (see discrimination index). Although we might assume that the social behaviour of KO animals might be impaired due to their higher distress triggered by a novel environment, their more frequent object approach contradicts this idea. Indeed, KO mice were more interested in a newly

introduced object (see object habituation phase of sociability as well as the first encounter of the object in habituation–dishabituation, although this later effect was not significant, probably due to the short, 1 min observation time), which excludes the general loss of interest of *Trpa1* KO mice as well. This further supports the less anxious phenotype of KO mice [47]. However, their social behaviour was more fragmented suggesting an enhanced arousal [51]. In contrast to our results Lee et al. in 2017 found an enhanced social interest in *Trpa1* KO mice during an experiment similar to our sociability test. Although in their case the enhanced interest towards the container might have confused the results as there was no object habituation phase. Moreover, we used juvenile stimulus mice to avoid any possible threat from them, which might also influence the quality of the social interaction. Notwithstanding the above, we did not find any remarkable differences between the genotypes in aggressive behaviour, both during the social interaction as well as the resident–intruder trials. This implies that TRPA1 participates in the fine tuning of social behaviour and might regulate only certain aspects, especially friendly social interactions. We might assume that its role in olfaction might be an important player in its contribution to social behaviour. In support, although previous results found a better memory function of KO mice during novel object recognition tasks [47], during the social memory test the performance of this genotype was worse than its WT counterparts. Furthermore, it must be underlined that the recognition of objects in rodents is rather reliant on visual cues [19,20].

In support of the importance of TRPA1 in olfaction, we confirmed its presence at different levels of the olfactory system.

Nevertheless, *Trpa1* mRNA was expressed with only a low number of copies in the OE, and it was not colocalised with anti- β -tubulin III, a selective marker of OSNs [44,45], suggesting that the receptor may be expressed in other OE structures (e.g., on the ending of trigeminal neurons or in type B cells) [52]. The synthesis of this TRPA1 receptor protein may happen predominantly in the perikaryon of TG neurons, where *Trpa1* expression has been confirmed previously [53–55], contributing to the development of diverse (patho)physiological conditions [48]. The OB might be a major site of action of aversive chemostimuli as we detected a considerable amount of *Trpa1* mRNA here by RNAscope ISH. We detected *Trpa1* predominantly in GABAergic neurones, but some transcripts in glutamatergic neurons were also seen. In a previous study, *Trpa1* mRNA was also detected in the OB using RT-PCR, and further investigations confirmed its expression predominantly in glutamatergic mitral and GABAergic granule cells [56]. We confirmed for the first time that *Trpa1* is expressed also in the PC. Here, in the PC, *Trpa1* mRNA is expressed only in *Vglut1* positive glutamatergic neurons. These cells are known to be principal neurones receiving signals from other olfactory structures (e.g., OB), certain limbic brain areas (e.g., basolateral AM) and from several other parts of the brain. The diverse afferentation of these cells contributes to shaping information encoding [57]. These results suggest the relevance of TRPA1 receptors in the central processing of olfactory information.

In the central nervous system, TRPA1 was found on astrocytes [58,59] and oligodendrocytes [60]. The functional inhibition of TRPA1 located on oligodendrocytes may decrease the myelin damage caused by ischemia [60]. Moreover, the lack of TRPA1 attenuates the process of demyelination and oligodendrocyte apoptosis in cuprizone-treated mice, suggesting its role in the progression of autoimmune multiple sclerosis as well [1,2]. On the other hand, the presence of TRPA1 is necessary for normal neuronal development and oligodendrocyte maturation, and its functional ablation may lead to impaired emotion, cognition, learning, memory, and social behaviour [47]. TRPA1 is also increasingly considered as a major participant in the development and progression of certain neurodegenerative disorders [3]. TRPA1 may facilitate the synaptic dysfunction triggered by oligomeric amyloid- β peptide, implying its role in Alzheimer's disease [61]. Intracerebral amyloid beta₁₋₄₂ injection induced smaller cholinergic fibre loss in the somatosensory cortex accompanied by normalised memory function in *Trpa1* KO mice [3]. In addition, TRPA1 deficiency resulted in an attenuated memory loss in aged mice, suggesting the importance of this receptor in age-related memory decline as well [4]. In addition, our experiments

confirmed the expression of TRPA1 receptors in the OB and the PC, which are brain areas that are already involved in the early stages of neurodegenerative disorders [29,31,41]. A possible mechanism of neurodegeneration may be the activation of TRPA1 channels leading to an increased calcium influx, triggering neuronal activation on one hand and in the case of excessive function, neuronal apoptosis. This process may occur in the glutamatergic excitatory neurons of the OB and PC and—together with consecutive glutamatergic excitotoxicity—may explain the appearance of anosmia in neurodegenerative diseases (e.g., Parkinson's, Alzheimer's) [62–64] 5–10 years prior to the emergence of other neurological symptoms [30,31].

In summary, our results confirmed the presence of TRPA1 at multiple levels of the olfactory tract playing an important role in the perception of aversive/irritating as well as social odours. This receptor, located in the central structures of the olfactory tract, may have a pivotal role in the central processing of odour information contributing to the association of emotional responses and behavioural patterns. Therefore, this ion channel could be a drug target in the treatment of diseases with disturbed emotions and social behaviour. In addition, TRPA1 receptors, located in the OB and PC, could be a promising target in the early treatment of certain neurodegenerative conditions by decelerating neuronal apoptosis in these brain areas.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

RNAscope in situ hybridisation was performed using naive 9-week-old male C57BL/6 mice. Behavioural experiments were carried out on 3–4 months-old male *Trpa1*^{+/+} (wild-type, WT) and *Trpa1*^{-/-} (knockout, KO) mice. The original breeding pairs of mice were acquired from Prof. P. Geppetti, University of Florence, Italy. Mice were generated and characterised as described earlier [65]. Animals were bred on a C57BL/6J background and crossed back after 5 generations. The genotype of offspring for the *Trpa1* gene was verified by PCR. Four-week-old *Trpa1* WT (sociability, social habituation–dishabituation) or CD1 mice (resident–intruder test) were used as stimulus animals. All efforts were made to minimise the number of animals used and their suffering.

Animals were kept in a temperature and humidity controlled 12 h light–dark cycle environment (lights on at 6 a.m.) in standard polycarbonate cages (365 mm × 207 mm × 144 mm) at the animal facility of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs. Ad libitum standard rodent chow and tap water were provided for the animals. Four to six mice were housed in a cage, and 1 week before the first resident–intruder test they were separated to have a “homecage”. The social behaviour of the animals was examined during the early dark phase between 19 and 23 h, while all other examinations were conducted in the morning.

4.2. RNAscope ISH and Immunohistochemistry

4.2.1. Tissue Sample Collection and Preparation

The intact C57BL/6 male mice were deeply anaesthetised by intraperitoneal urethane injection (2.4 g/kg) and transcardially perfused with 20 mL of ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH: 7.4) followed by 150 mL 4% paraformaldehyde (PFA) solution in Millonig buffer (pH 7.4) for 15 min. After perfusion, the brains with OBs were removed, and collected into PFA for 36 h for postfixation at 4 °C. Olfactory epithelia were also removed and collected into 4% PFA containing 30% sucrose for 36 h postfixation, to ensure cryoprotection. The brains with the OBs were coronally sectioned using a Leica VT1000 S vibratome (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Five series of 30 µm sections were gathered and stored in antifreeze solution (20% ethylene glycol, 30% glycerol and 0.1 M sodium-phosphate buffer) at –20 °C. OE samples were embedded in OCT tissue freezing medium (Leica), and five series of 17 µm transversal sections were obtained using a cryostat (Leica CM1950, Nussloch, Germany). Then, sections were taken on SuperFrost Ultra Plus

adhesion slides (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany, Cat. No.: 10417002), and stored at -20°C .

4.2.2. RNAscope ISH on Mouse Olfactory Bulb and Piriform Cortex

The RNAscope assay was carried out on coronal OB and PC sections, applying RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v.2 (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) according to the protocol of the product with a modified pretreatment [66]. Briefly, after the tissue pretreatment, samples were hybridised with probes specific to mouse *Trpa1* (Cat. No.: 400211-C2), *NeuN* (neuronal nuclear protein; Cat. No.: 313311-C3), *Vglut1* (vesicular glutamate transporter 1; Cat. No.: 416631) and *Gad1* (glutamate decarboxylase 1; Cat. No.: 400951-C3, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) mRNA. We performed sequential signal amplification and channel development according to the manual. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI (Cat. No.: 323108, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA)) was used to detect cell nuclei. Sections were cover-slipped with ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) for confocal microscopy. To provide reliable results, we simultaneously applied a RNAscope 3-plex mouse positive control probe (ACD; Cat. No.: 320881, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) specific to RNA polymerase II subunit A mRNA (*Polr2a* (fluorescein)), peptidylprolyl isomerase B mRNA (*Ppib* (cyanine 3, Cy3)) and ubiquitin C mRNA (*Ubc* (cyanine 5, Cy5)) and 3-plex negative control probes (ACD; Cat. No.: 320871) to bacterial D-box binding PAR BZIP transcription factor (*dabP*) mRNA (Supplementary Materials Figure S1). To obtain fluorescent images of the OB and PC, an Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning confocal microscope and FluoView FV-1000S-IX81 image acquisition software system (Olympus, Tokyo, Japan) were used. The confocal aperture was set to $80\ \mu\text{m}$. We conducted the analogue sequential scanning with a $40\times$ objective lens (NA: 0.75). We applied an optical thickness of $1\ \mu\text{m}$ and the resolution was set to 1024×1024 pixels. The excitation time was set to $4\ \mu\text{s}$ per pixel. The following virtual colours were used for the fluorescent signals: blue for DAPI, green for fluorescein (488 nm) (*Vglut1* mRNA), red for Cyanine 3 (550 nm) (*Trpa1* mRNA), and white for Cyanine 5 (647 nm) (*Gad1* and *NeuN* mRNA). Images were contrasted using ImageJ software (version 1.52a, NIH). To establish the colocalisation of the *Trpa1* mRNA signal with the *NeuN*, *Gad1* and *Vglut1* mRNA signal as well as with the immunohistochemistry signal of anti- β -Tubulin III, we performed a differential interference contrast (DIC) technique combined with the fluorescence signal.

4.2.3. RNAscope ISH Combined with β -Tubulin III-Immunohistochemistry

We also performed RNAscope ISH on transversal sectioned OE according to the above detailed protocol. Subsequently, β -tubulin III immunohistochemistry was also conducted to mark OSNs. Briefly, after channel development of the RNAscope assay, sections were washed for $2\times 15\ \text{min}$ in PBS, incubated overnight at RT with polyclonal rabbit anti- β -tubulin III (Merck, Sigma Aldrich GmbH; Cat. No.: T2200, Schnellendorf, Germany), diluted 1:200 with 2% normal donkey serum for blocking aspecific binding. Then, sections were washed for $2\times 15\ \text{min}$ in PBS, and treated in Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (A-11012, Thermo Fisher Scientific), diluted 1:500 in $1\times$ PBS with 2% normal donkey serum for 3 h at RT. After rinses, cell nuclei were counterstained with DAPI, and the sections were mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant for confocal microscopy.

4.3. Measurement of Ca^{2+} Influx in TRPA1-Expressing CHO Cells in Response to 2-MT or Valeric Acid by Flow Cytometry

Cell lines overexpressing mouse and human TRPA1 were constructed according to the protocol used in the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, Medical School [67]. Culture medium (500 mL Dulbecco's-Modified Eagle Medium (DMEM), 50 mL fetal bovine serum albumin, 10 mL L-glutamine (200 mmol/L), 10 mL MEM non-essential amino acid solution, 500 μL penicillin and streptomycin) was gently

removed from cells and a trypsin solution (250 μ L, 0.1% in PBS) was applied for 5 min. For each sample approximately 10^4 TRPA1-expressing CHO cells were resuspended in 100 μ L cell culture medium. Fluo-4 AM (Invitrogen, 0.4 μ L, 1 μ g/ μ L in DMSO) was added for 30 min at 37 °C. Extracellular solution (ECS) was added (400 μ L, containing (in mmol/L): NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glucose, 10; pH 7.3). An appropriate amount of 2-MT or valeric acid was added to the cell suspensions in 500 μ L ECS. Cell suspensions were analysed by flow cytometry. Fluo-4 AM was excited by a 488 nm laser. Fluorescence was detected at 504 nm. The mean green fluorescence of the samples was compared to the base fluorescence of dye-loaded control cells and to receptor carrying cells activated with 100 μ M of the TRPA1 agonist, allyl-isothiocyanate, representing 100% activation [67].

4.4. Behavioural Tests

The behaviour of the animals was video recorded and later scored by computer-based event-recorder software (Solomon coder <https://solomon.andraspeter.com/>, 8 August 2019) by an experimenter blinded to the treatment groups. The following behavioural patterns were investigated: inactivity/freezing (no obvious activity), exploration (walking through the box or sniffing towards the environment), social investigation (sniffing at partner) and aggression (wrestling with the intruder often accompanied by biting or pushing down the opponent while it is trying to escape). Both the duration (in percentage) and frequency of all behaviours were registered. Exploration and sniffing were analysed in all trials, aggression was investigated in the social interaction and resident–intruder test, but freezing was only registered in the odour aversion tests.

4.4.1. Odour Aversion Tests and Blood Sample Collection

The experiment was performed in a transparent box located in a sound-attenuated room within a hood with a camera above the box. In the corner of the box a tube was fixed, containing a filter paper scented with 2-MT (Sigma-Aldrich, Cat. No.: 2346-00-1) or valeric acid (Merck, Sigma Aldrich GmbH, Schnellendorf, Germany, Cat. No.: 800821). The substances were diluted with saline (50 μ L to 2 mL) and a 50 μ L sample was used for each animal. The mice were allowed to freely explore the arena for 10 min. The boxes were cleaned with ethanol between animals and the odour was refreshed using a new filter paper and odour. Right at the end of this trial, animals were sacrificed, blood was collected into prechilled tubes, and the samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Supernatant serum samples were collected and stored at –20 °C for ACTH and corticosterone radioimmunoassay experiments (Figure 11).

4.4.2. Test Battery for Social Behaviour

Day 1: Object Habituation–Dishabituation

The animals were put in the test cage with nontransparent walls, filled with fresh bedding. After a 2 min habituation, an object was added to the box for four 1-min long trials with an inter-trial interval of 2 min. During the fifth trial a novel object was used with a different colour and shape. Objects were inserted in the corner of the box in all cases, but the location of the corner was randomised. The objects were small plastic toys (built from coloured plastic cubes and having complex shapes). Prior to the experiment all items were cleaned with ethanol (Figure 7c).

Day 2: Sociability Test

The experiment consisted of four trials, all of them lasted for 5 min. For the first five minutes the experimental animals were put in the empty box, to acclimatise to the new environment. During the second phase, two empty wired cages were placed into the corner of the box for 5 min, to habituate the animals to these objects (habituation). During the third period a stimulus animal was placed below one of the wired cages (social interest), and here, we calculated the sociability index (in this index the interest towards the social

partner is divided by the sum of the interest towards the box and social partner). During the last five minutes a novel stimulus mouse was inserted below the second wired cage (social discrimination), and we calculated the discrimination index with the following formula: $(\text{new mouse} - \text{old mouse}) / (\text{old} + \text{new mouse}) \times 100$ (Figure 8i).

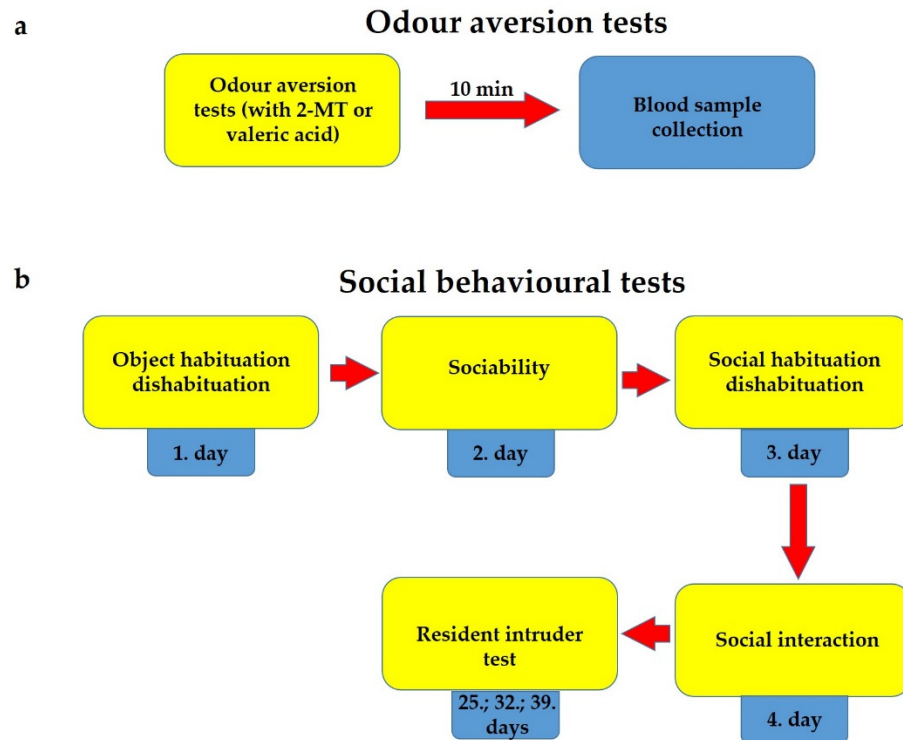


Figure 11. Schematic representation of the process of odour aversion (a) and social behavioural experiments (b), carried out on *Trpa1* knockout mice and their wild-type siblings.

Day 3: Social Habituation–Dishabituation

The experimental design was similar to that of the object habituation protocol with the sole difference, that in this trial, 4-week-old *Trpa1* WT stimulus animals were used. Briefly, a *Trpa1* WT stimulus male mouse was placed into the box for four 1-min long unrestricted interactions with an inter-trial interval of 2 min. During the intervals, the stimulus mouse was housed alone in a holding container and the experimental animal remained in the testing cage. In the fifth phase of the trial, a novel stimulus animal was used from a different cage (Figure 7g).

Day 4: Social Interaction

This test was also performed during the dark period for the animals; however, the investigating room was lighted to enhance the anxiety component. Two experimental animals, belonging to the same group but living in different cages, were placed into the same box for 10 min, and the interactions between them were registered.

Resident–Intruder Test

Resident–intruder trials were performed on days 25, 32 and 39 after at least 4 days of single housing to ensure that the test animal considered the cage as its home. On the day of the trial a smaller 4-week-old CD1 mouse (intruder) was inserted into the cage for 10 min.

4.5. Hormone Measurement

Hormone levels were measured by radioimmunoassay in unextracted serum (ACTH: 50 μL ; corticosterone: 10 μL), both using a specific antibody developed at the Institute of Experimental Medicine (Budapest, Hungary) [68]. The intra-assay coefficients of variation

were 7.5% and 4.7%, respectively. All samples from a particular experiment were measured in one session.

4.6. Statistical Analysis

Data are represented as mean \pm SEM with individual data as dark spots. The comparison between WT and KO groups was conducted by paired sample *t*-test. Main effects were studied by factorial or repeated-measures ANOVA as shown in the text. A post hoc analysis was carried out by the Fisher and Tukey test depending on the number of investigated groups. For social and discrimination indices, the single sample *t*-test was used in comparison to 50% (social) or 0% (discrimination). All statistical analyses were performed using Statistica 13.5.0 software. Datasets were tested for normal distribution and for homogeneity of variance. If the *p*-value was lower than 0.05, it was considered statistically significant.

5. Conclusions

We confirmed the presence and role of the TRPA1 receptor in olfaction and—in this context—in the regulation of aversive and social behaviour. Thus, TRPA1 might be a promising drug target for the treatment of certain behavioural disorders. Furthermore, the location of TRPA1 in the primary olfactory cortex—and the possibility of neuronal apoptosis induced both by calcium and by glutamatergic excitotoxicity [69,70] due to the excessive activation of the receptor—may explain the occurrence of anosmia, as an early marker, in several neurodegenerative disorders. Thus, TRPA1 targeting drugs may decelerate neuronal apoptosis, and prevent the further development of the disorders at an early stage.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph14121336/s1>. Figure S1: Electrophoretograms of RT-PCR products. Six olfactory bulb samples of C57BL/6 mice were investigated. The housekeeping gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), size: 237 bp) and the gene of interest (*Trpa1*, size: 101 bp) were expressed in all samples (a). Eight piriform cortex samples of C57BL/6 mice were investigated. The housekeeping gene (*Gapdh*, size: 237 bp) was expressed in all samples but a detectable level of gene of interest (*Trpa1*, size: 101 bp) could be found only in three cases (b). NTC: no template control; noRT: no reverse transcriptase controls. Figure S2: RNAscope triplex positive and negative controls in the mouse piriform cortex. RNAscope triplex negative control probes would hybridize with the bacterial *dabP* gene (a). RNAscope triplex positive control probes specific to mouse *Polr2a* (b), *Ppib* (c) and *Ubc* (d). mRNA targets are represented in green, red and white, respectively. Abbreviations: *dabP*: D-box binding PAR BZIP transcription factor, *Polr2a*: RNA polymerase II subunit A, *Ppib*: peptidylprolyl isomerase B, *Ubc*: ubiquitin C.

Author Contributions: Conceptualisation, E.P., D.Z., V.K. and J.K.; methodology, D.Z., Z.S., V.K., A.K. and J.K.; investigation, D.Z., Z.S., V.K., A.K., J.K. and A.A.; validation, D.Z., V.K., Z.S. and J.K.; formal analysis, D.Z., Z.S., V.K., J.K., A.A., B.S. and A.S.; visualisation, B.G.; resources, E.P. and D.Z.; supervision, E.P. and D.Z.; writing—original draft preparation, J.K., D.Z., V.K. and E.P.; writing—review and editing, J.K., D.Z., V.K., E.P. and Z.S.; funding acquisition, E.P., D.Z., V.K. and B.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: KTIA Hungarian Brain Research Program 2.0: 2017-1.2.1.-NKP-2017-00002; Thematic Excellence Program 2021 Health Sub-programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the EGA-16 project of the Pécs of University; Research Grant of Medical School, University of Pécs: KA-2019-12 and KA-2021-23; New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund: ÚNKP-20-4-II-PTE-874; National Research, Development and Innovation: K120311, K131406, K138763; FK124188; Eötvös Loránd Research Network (ELKH); A.K. (Angéla Kecskés) was sponsored by János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: The study was designed and conducted according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013, II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes. The project was approved by the Animal

Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County (permission No: BA02/2000/25/2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is available within the article and supplementary material.

Acknowledgments: For his technical service at the confocal microscope, we are thankful to Gergely Berta. Authors are grateful to the referees and editors of the journal for their thorough work and valuable suggestions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bölcskei, K.; Kriszta, G.; Sággy, É.; Payrits, M.; Sipos, É.; Vranesics, A.; Berente, Z.; Ábrahám, H.; Ács, P.; Komoly, S.; et al. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *320*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sággy, É.; Sipos, É.; Ács, P.; Bölcskei, K.; Pohóczky, K.; Kemény, Á.; Sándor, Z.; Szőke, É.; Sétáló, G.J.; Komoly, S.; et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination—A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia* **2016**, *64*, 2166–2180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Payrits, M.; Borbely, E.; Godo, S.; Ernszt, D.; Kemeny, A.; Kardos, J.; Szoke, E.; Pinter, E. Genetic deletion of TRPA1 receptor attenuates amyloid beta- 1-42 (A β (1-42))-induced neurotoxicity in the mouse basal forebrain in vivo. *Mech. Ageing Dev.* **2020**, *189*, 111268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Borbély, É.; Payrits, M.; Hunyady, Á.; Mező, G.; Pintér, E. Important regulatory function of transient receptor potential ankyrin 1 receptors in age-related learning and memory alterations of mice. *GeroScience* **2019**, *41*, 643–654. [[CrossRef](#)]
5. Smith, T.D.; Bhatnagar, K.P. Anatomy of the olfactory system. *Handb. Clin. Neurol.* **2019**, *164*, 17–28. [[CrossRef](#)]
6. Mueller, M.; Egger, V. Dendritic integration in olfactory bulb granule cells upon simultaneous multispike activation: Low thresholds for nonlocal spiking activity. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000873. [[CrossRef](#)]
7. Lage-Rupprecht, V.; Zhou, L.; Bianchini, G.; Aghvami, S.S.; Mueller, M.; Rózsa, B.; Sassoè-Pognetto, M.; Egger, V. Presynaptic NMDARs cooperate with local spikes toward GABA release from the reciprocal olfactory bulb granule cell spine. *eLife* **2020**, *9*, e63737. [[CrossRef](#)]
8. Truex, R.C.; Carpenter, M.B. *Human Neuroanatomy*, 6th ed.; Williams and Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1969.
9. Mohrhardt, J.; Nagel, M.; Fleck, D.; Ben-Shaul, Y.; Spehr, M. Signal Detection and Coding in the Accessory Olfactory System. *Chem. Senses* **2018**, *43*, 667–695. [[CrossRef](#)]
10. Rotermund, N.; Schulz, K.; Hirnet, D.; Lohr, C. Purinergic Signaling in the Vertebrate Olfactory System. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 112. [[CrossRef](#)]
11. Boesveldt, S.; Parma, V. The importance of the olfactory system in human well-being, through nutrition and social behavior. *Cell Tissue Res.* **2021**, *383*, 559–567. [[CrossRef](#)]
12. Zou, J.; Wang, W.; Pan, Y.-W.; Lu, S.; Xia, Z. Methods to measure olfactory behavior in mice. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2015**, *63*, 11.18.1–11.18.21. [[CrossRef](#)]
13. Stoop, R. Sniffing and Oxytocin: Effects on Olfactory Memories. *Neuron* **2016**, *90*, 431–433. [[CrossRef](#)]
14. Oetli, L.-L.; Kelsch, W. Oxytocin and Olfaction. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **2018**, *35*, 55–75. [[CrossRef](#)]
15. Vossahl, L.B. Social signals: The secret language of mice. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, R255–R257. [[CrossRef](#)]
16. Wesson, D.W. Sniffing behavior communicates social hierarchy. *Curr. Biol.* **2013**, *23*, 575–580. [[CrossRef](#)]
17. Wesson, D.W.; Donahou, T.N.; Johnson, M.O.; Wachowiak, M. Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem. Senses* **2008**, *33*, 581–596. [[CrossRef](#)]
18. Camats Perna, J.; Engelmann, M. Recognizing Others: Rodent's Social Memories. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **2017**, *30*, 25–45. [[CrossRef](#)]
19. Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* **1988**, *31*, 47–59. [[CrossRef](#)]
20. Ennaceur, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.* **2010**, *215*, 244–254. [[CrossRef](#)]
21. Pérez-Gómez, A.; Bleyemehl, K.; Stein, B.; Pyrski, M.; Birnbaumer, L.; Munger, S.D.; Leinders-Zufall, T.; Zufall, F.; Chamero, P. Innate Predator Odor Aversion Driven by Parallel Olfactory Subsystems that Converge in the Ventromedial Hypothalamus. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 1340–1346. [[CrossRef](#)]
22. Matsukawa, M.; Imada, M.; Aizawa, S.; Sato, T. Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. *Brain Res.* **2016**, *1631*, 46–52. [[CrossRef](#)]
23. Hacquemand, R.; Choffat, N.; Jacquot, L.; Brand, G. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. *Behav. Brain Res.* **2013**, *238*, 227–231. [[CrossRef](#)]

24. Turetsky, B.I.; Hahn, C.-G.; Borgmann-Winter, K.; Moberg, P.J. Scents and nonsense: Olfactory dysfunction in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **2009**, *35*, 1117–1131. [[CrossRef](#)]
25. Hardy, C.; Rosedale, M.; Messinger, J.W.; Kleinhaus, K.; Aujero, N.; Silva, H.; Goetz, R.R.; Goetz, D.; Harkavy-Friedman, J.; Malaspina, D. Olfactory acuity is associated with mood and function in a pilot study of stable bipolar disorder patients. *Bipolar Disord.* **2012**, *14*, 109–117. [[CrossRef](#)]
26. Negoias, S.; Croy, I.; Gerber, J.; Puschmann, S.; Petrowski, K.; Joraschky, P.; Hummel, T. Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience* **2010**, *169*, 415–421. [[CrossRef](#)]
27. Croy, I.; Schellong, J.; Joraschky, P.; Hummel, T. PTSD, but not childhood maltreatment, modifies responses to unpleasant odors. *Int. J. Psychophysiol.* **2010**, *75*, 326–331. [[CrossRef](#)]
28. Rahayel, S.; Frasnelli, J.; Joubert, S. The effect of Alzheimer's disease and Parkinson's disease on olfaction: A meta-analysis. *Behav. Brain Res.* **2012**, *231*, 60–74. [[CrossRef](#)]
29. Tsuboi, Y.; Wszolek, Z.K.; Graff-Radford, N.R.; Cookson, N.; Dickson, D.W. Tau pathology in the olfactory bulb correlates with Braak stage, Lewy body pathology and apolipoprotein epsilon4. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2003**, *29*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Doty, R.L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2012**, *8*, 329–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Braak, H.; Ghebremedhin, E.; Rüb, U.; Bratzke, H.; Del Tredici, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* **2004**, *318*, 121–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zufall, F. TRPs in olfaction. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, *223*, 917–933. [[CrossRef](#)]
33. Logashina, Y.A.; Korolkova, Y.V.; Kozlov, S.A.; Andreev, Y.A. TRPA1 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function, Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands. *Biochemistry* **2019**, *84*, 101–118. [[CrossRef](#)]
34. Kremeyer, B.; Lopera, F.; Cox, J.J.; Momin, A.; Rugiero, F.; Marsh, S.; Woods, C.G.; Jones, N.G.; Paterson, K.J.; Fricker, F.R.; et al. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* **2010**, *66*, 671–680. [[CrossRef](#)]
35. Koivisto, A.; Hukkanen, M.; Saarnilehto, M.; Chapman, H.; Kuokkanen, K.; Wei, H.; Viisanen, H.; Akerman, K.E.; Lindstedt, K.; Pertovaara, A. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: Sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy. *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 149–158. [[CrossRef](#)]
36. Wei, H.; Hämäläinen, M.M.; Saarnilehto, M.; Koivisto, A.; Pertovaara, A. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiology* **2009**, *111*, 147–154. [[CrossRef](#)]
37. Eid, S.R.; Crown, E.D.; Moore, E.L.; Liang, H.A.; Choong, K.-C.; Dima, S.; Henze, D.A.; Kane, S.A.; Urban, M.O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol. Pain* **2008**, *4*, 48. [[CrossRef](#)]
38. Obata, K.; Katsura, H.; Mizushima, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Tominaga, M.; Noguchi, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2393–2401. [[CrossRef](#)]
39. Pinheiro, F.d.V.; Villarinho, J.G.; Silva, C.R.; Oliveira, S.M.; Pinheiro, K.d.V.; Petri, D.; Rossato, M.F.; Guerra, G.P.; Trevisan, G.; Antonello Rubin, M.; et al. The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *747*, 105–113. [[CrossRef](#)]
40. Wang, Y.; Cao, L.; Lee, C.-Y.; Matsuo, T.; Wu, K.; Asher, G.; Tang, L.; Saitoh, T.; Russell, J.; Klewe-Nebenius, D.; et al. Large-scale forward genetics screening identifies *Trpa1* as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2041. [[CrossRef](#)]
41. Braak, H.; Del Tredici, K.; Rüb, U.; de Vos, R.A.I.; Jansen Steur, E.N.H.; Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 197–211. [[CrossRef](#)]
42. Bland, K.P. Tom-cat odour and other pheromones in feline reproduction. *Vet. Sci. Commun.* **1979**, *3*, 125–136. [[CrossRef](#)]
43. Miyazaki, T.; Nishimura, T.; Yamashita, T.; Miyazaki, M. Olfactory discrimination of anal sac secretions in the domestic cat and the chemical profiles of the volatile compounds. *J. Ethol.* **2018**, *36*, 99–105. [[CrossRef](#)]
44. Lee, V.M.; Pixley, S.K. Age and differentiation-related differences in neuron-specific tubulin immunostaining of olfactory sensory neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1994**, *83*, 209–215. [[CrossRef](#)]
45. Packard, A.I.; Lin, B.; Schwob, J.E. Sox2 and Pax6 Play Counteracting Roles in Regulating Neurogenesis within the Murine Olfactory Epithelium. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155167. [[CrossRef](#)]
46. Moustafa, A.A.; Gilbertson, M.W.; Orr, S.P.; Herzallah, M.M.; Servatius, R.J.; Myers, C.E. A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain Cogn.* **2013**, *81*, 29–43. [[CrossRef](#)]
47. Lee, K.-I.; Lin, H.-C.; Lee, H.-T.; Tsai, F.-C.; Lee, T.-S. Loss of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Deregulates Emotion, Learning and Memory, Cognition, and Social Behavior in Mice. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 3606–3617. [[CrossRef](#)]
48. Talavera, K.; Startek, J.B.; Alvarez-Collazo, J.; Boonen, B.; Alpizar, Y.A.; Sanchez, A.; Naert, R.; Nilius, B. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 725–803. [[CrossRef](#)]
49. Kondoh, K.; Lu, Z.; Ye, X.; Olson, D.P.; Lowell, B.B.; Buck, L.B. A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature* **2016**, *532*, 103–106. [[CrossRef](#)]

50. White-Welkley, J.E.; Bunnell, B.N.; Mougey, E.H.; Meyerhoff, J.L.; Dishman, R.K. Treadmill exercise training and estradiol differentially modulate hypothalamic-pituitary-adrenal cortical responses to acute running and immobilization. *Physiol. Behav.* **1995**, *57*, 533–540. [[CrossRef](#)]
51. Toth, M.; Mikics, E.; Tulogdi, A.; Aliczki, M.; Haller, J. Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. *Horm. Behav.* **2011**, *60*, 28–36. [[CrossRef](#)]
52. Koike, K.; Yoo, S.-J.; Bleyemehl, K.; Omura, M.; Zapiec, B.; Pyrski, M.; Blum, T.; Khan, M.; Bai, Z.; Leinders-Zufall, T.; et al. Danger perception and stress response through an olfactory sensor for the bacterial metabolite hydrogen sulfide. *Neuron* **2021**, *109*, 2469–2484.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Diogenes, A.; Akopian, A.N.; Hargreaves, K.M. NGF up-regulates TRPA1: Implications for orofacial pain. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 550–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Nilius, B.; Owsianik, G.; Voets, T.; Peters, J.A. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 165–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Marone, I.M.; De Logu, F.; Nassini, R.; De Carvalho Goncalves, M.; Benemei, S.; Ferreira, J.; Jain, P.; Li Puma, S.; Bunnett, N.W.; Geppetti, P.; et al. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain* **2018**, *141*, 2312–2328. [[CrossRef](#)]
56. Dong, H.-W.; Davis, J.C.; Ding, S.; Nai, Q.; Zhou, F.-M.; Ennis, M. Expression of transient receptor potential (TRP) channel mRNAs in the mouse olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* **2012**, *524*, 49–54. [[CrossRef](#)]
57. Wang, L.; Zhang, Z.; Chen, J.; Manyande, A.; Haddad, R.; Liu, Q.; Xu, F. Cell-Type-Specific Whole-Brain Direct Inputs to the Anterior and Posterior Piriform Cortex. *Front. Neural Circuits* **2020**, *14*, 4. [[CrossRef](#)]
58. Shigetomi, E.; Tong, X.; Kwan, K.Y.; Corey, D.P.; Khakh, B.S. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* **2011**, *15*, 70–80. [[CrossRef](#)]
59. Jiang, L.; Ma, D.; Grubb, B.D.; Wang, M. ROS/TRPA1/CGRP signaling mediates cortical spreading depression. *J. Headache Pain* **2019**, *20*, 25. [[CrossRef](#)]
60. Hamilton, N.B.; Kolodziejczyk, K.; Kougioumtzidou, E.; Attwell, D. Proton-gated Ca(2+)-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature* **2016**, *529*, 523–527. [[CrossRef](#)]
61. Bosson, A.; Paumier, A.; Boisseau, S.; Jacquier-Sarlin, M.; Buisson, A.; Albrieux, M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca(2+) hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12*, 53. [[CrossRef](#)]
62. Marin, C.; Laxe, S.; Langdon, C.; Alobid, I.; Berenguer, J.; Fuentes, M.; Bernabeu, M.; Mullol, J. Olfactory Training Prevents Olfactory Dysfunction Induced by Bulbar Excitotoxic Lesions: Role of Neurogenesis and Dopaminergic Interneurons. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 8063–8075. [[CrossRef](#)]
63. Sairazi, N.S.M.; Sirajudeen, K.N.S.; Asari, M.A.; Mummy, S.; Muzaimi, M.; Sulaiman, S.A. Effect of tualang honey against KA-induced oxidative stress and neurodegeneration in the cortex of rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 31. [[CrossRef](#)]
64. Zhong, W.; Wu, A.; Berglund, K.; Gu, X.; Jiang, M.Q.; Talati, J.; Zhao, J.; Wei, L.; Yu, S.P. Pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease by deficiency of NMDA receptor subunit GluN3A. *Alzheimer's Dement.* **2021**. [[CrossRef](#)]
65. Meza, N.W.; Puyet, A.; Pérez-Benavente, S.; Quintana-Bustamante, O.; Diez, A.; Bueren, J.A.; Segovia, J.C.; Bautista, J.M. Functional analysis of gammaretroviral vector transduction by quantitative PCR. *J. Gene Med.* **2006**, *8*, 1097–1104. [[CrossRef](#)]
66. Nemes, B.; Bölskei, K.; Kecskés, A.; Kormos, V.; Gaszner, B.; Aczél, T.; Hegedüs, D.; Pintér, E.; Helyes, Z.; Sándor, Z. Human Somatostatin SST(4) Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3758. [[CrossRef](#)]
67. Pozsgai, G.; Payrits, M.; Sághy, É.; Sebestyén-Báta, R.; Steen, E.; Szőke, É.; Sándor, Z.; Solymár, M.; Garami, A.; Orvos, P.; et al. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst(4) receptors. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2017**, *65*, 10–21. [[CrossRef](#)]
68. Zelena, D.; Mergl, Z.; Foldes, A.; Kovács, K.J.; Tóth, Z.; Makara, G.B. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2003**, *285*, E1110–E1117. [[CrossRef](#)]
69. Wang, Q.; Li, J.; Wei, X.; Liao, J.; Xu, Y.; Lu, T.; Qin, B.; Xie, J.; Deng, C.; Huang, X. Alterations of NMDA receptor binding in various brain regions among 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Int. J. Neurosci.* **2014**, *124*, 457–465. [[CrossRef](#)]
70. Vaughan, D.N.; Jackson, G.D. The piriform cortex and human focal epilepsy. *Front. Neurol.* **2014**, *5*, 259. [[CrossRef](#)]



OPEN ACCESS

EDITED BY

Steve Peigneur,
KU Leuven, Belgium

REVIEWED BY

Eri Segi-Nishida,
Tokyo University of Science, Japan
Seungwoo Kang,
Augusta University, United States

*CORRESPONDENCE

Viktória Kormos,
viktor.kormos@aoak.pte.hu

[†]These authors contributed equally to this work and share first authorship

[‡]These authors contributed equally to this work and share last authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Molecular and Cellular Pathology, a section of the journal Frontiers in Cell and Developmental Biology

RECEIVED 30 September 2022

ACCEPTED 21 November 2022

PUBLISHED 06 December 2022

CITATION

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Correia P, Berta G, Biró-Sütő T, Zelena D and Pintér E (2022), Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel expressed by the Edinger-Westphal nucleus contributes to stress adaptation in murine model of posttraumatic stress disorder. *Front. Cell Dev. Biol.* 10:1059073. doi: 10.3389/fcell.2022.1059073

COPYRIGHT

© 2022 Konkoly, Kormos, Gaszner, Correia, Berta, Biró-Sütő, Zelena and Pintér. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel expressed by the Edinger-Westphal nucleus contributes to stress adaptation in murine model of posttraumatic stress disorder

János Konkoly^{1†}, Viktória Kormos^{1*†}, Balázs Gaszner², Pedro Correia³, Gergely Berta^{4,5}, Tünde Biró-Sütő¹, Dóra Zelena^{3‡} and Erika Pintér^{1‡}

¹Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary, ²Department of Anatomy, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary, ³Department of Physiology, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary, ⁴Department of Medical Biology, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary, ⁵Signal Transduction Research Group, János Szentágotthai Research Centre, Pécs, Hungary

The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (EWcp) is involved in stress adaptation. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) mRNA was previously shown to be expressed abundantly in mouse and human EWcp urocortin 1 (UCN1) positive neurons and reacted to chronic stress. Since UCN1 neurons are deeply implicated in stress-related disorders, we hypothesized that TRPA1/UCN1 neurons are also affected in posttraumatic stress disorder (PTSD). We examined male *Trpa1* wild type (WT) and gene-deficient (KO) mice in the single prolonged stress (SPS) model of PTSD. Two weeks later the behavioral changes were monitored by forced swim test (FST) and restraint. The *Trpa1* and *Ucn1* mRNA expression and the UCN1 peptide content were assessed by RNAscope *in situ* hybridization technique combined with immunofluorescence labeling in the EWcp. SPS-induced immobility was lower in *Trpa1* KO compared to WT animals, both in the FST and restraint, corresponding to diminished depression-like behavior. The copy number of *Trpa1* mRNA decreased significantly in EWcp of WT animals in response to SPS. Higher basal *Ucn1* mRNA expression was observed in the EWcp of KO animals, that was not affected by SPS exposure. EWcp neurons of WT animals responded to SPS with substantially increased amount of UCN1 peptide content compared to control animals, whereas such changes were not observable in KO mice. The decreased *Trpa1* mRNA expression in the SPS model of PTSD associated with increased neuronal UCN1 peptide content suggests that this cation channel might be involved in the regulation of stress adaptation and may contribute to the pathomechanism of PTSD.

KEYWORDS

TRPA1, PTSD, Edinger-Westphal nucleus, single prolonged stress, urocortin 1, stress adaptation

1 Introduction

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a non-selective cation channel expressed in the primary sensory neurons of the dorsal root, vagal and trigeminal ganglia (Talavera et al., 2020). In the peripheral nervous system it is involved in pain sensation, inflammatory and immune responses (Julius, 2013; Moore et al., 2018; Souza Monteiro de Araujo et al., 2020). Limited knowledge is available about its location and role in the central nervous system. Its expression has already been confirmed by our research group in certain stress-related brain areas, including olfactory bulb, piriform cortex (Konkoly et al., 2021), hypothalamus (Olah et al., 2021) and dorsal raphe nucleus (DR) (Milicic et al., unpublished). The highest level of *Trpa1* mRNA expression was found in the urocortinergic neurons of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (EWcp) in mice (Kormos et al., 2022). Most recently we found that the TRPA1 ion channel shows functional activity in patch clamp recordings on acute mouse EWcp slices (Al-Omari et al., unpublished). Our previous study revealed that *Trpa1* is downregulated in the EWcp both upon chronic variable mild stress (CVMS) in mice and in humans who died by suicide. Moreover, altered stress adaptation response was observed in the absence of TRPA1 in mice (Kormos et al., 2022). These findings suggested that TRPA1 expressed by the urocortinergic EWcp neurons might contribute to stress response. Considering that a disturbed stress adaptation is characteristic for posttraumatic stress disorder (PTSD) (Perry and Pollard, 1998; Yehuda, 1998; Kasckow et al., 2001; Rohleder et al., 2010; Deppermann et al., 2014; Dunlop and Wong, 2019), we investigated the role of TRPA1 in this psychopathology.

PTSD is a mental health condition triggered by intense physical or emotional trauma (e.g.: accident, childhood abuse, sexual violence, physical assault, combat exposure and other life-threatening events). Flashbacks, severe anxiety, and nightmares associated with intrusive memories, negative changes in mood and thinking, and altered physical and emotional reactions are all possible symptoms (Auxéméry, 2018). The most important brain areas being involved in the pathogenesis of PTSD are the prefrontal cortex (PFC), amygdala, and hippocampus (Miller et al., 2018; Harnett et al., 2020; Kamiya and Abe, 2020). The EWcp and its urocortinergic neurons have not been studied in relation to PTSD, yet.

Our research team has been investigating the role of the EWcp in stress adaptation response and mood control (Kozicz et al., 2001; Gaszner and Kozicz, 2003; Gaszner et al., 2004; Gaszner et al., 2007, 2012; Rouwette et al., 2011; Kormos and Gaszner, 2013; Kormos et al., 2022; Ujvári et al., 2022). EWcp expresses urocortin 1 (UCN1) neuropeptide, which is a member of the corticotropin-releasing hormone (CRH) family. It binds to the CRH receptor 1 (CRHR1) and 2 (CRHR2) (Kozicz, 2007), with a 40-fold higher affinity towards

CRHR2 than CRH itself (Vaughan et al., 1995; Deussing and Chen, 2018). Interestingly, direct connections have been identified between the EWcp and the most relevant PTSD-related limbic brain areas (PFC, amygdala and hippocampus). For instance, the EWcp sends fibers to the PFC and amygdala (Zuniga and Ryabinin, 2020; Priest et al., 2021; Topilko et al., 2022). EWcp cells receive direct synaptic inputs from hippocampal pyramidal cells that carry serotonin receptor 2c (Li et al., 2018). Peptidergic EWcp cells send afferent projections to GABAergic parvalbumin-containing interneurons in the medial PFC (Bale et al., 2002). Importantly, CRH receptors were found in all three areas (PFC, amygdala and hippocampus) implicated in PTSD (Deussing and Chen, 2018).

Here we aimed to test whether TRPA1 on the EWcp/UCN1 neurons is important in stress adaptation to PTSD. We hypothesized that altered TRPA1 and UCN1 dynamics in the EWcp contribute to the behavioral anomalies induced by PTSD. To test this hypothesis, we used the single prolonged stress (SPS) model of PTSD and examined the behavioral alterations 2 weeks later. To support possible causative role, *Trpa1* KO mice strain was also used.

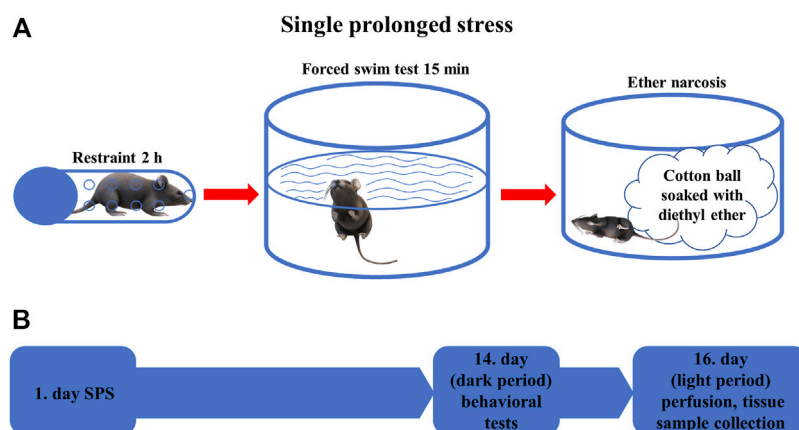
2 Materials and methods

2.1 Animals

3–4 months-old male *Trpa1*^{+/+} (wild type, WT) and *Trpa1*^{-/-} (knockout, KO) mice were used. The original breeding pairs were acquired from Prof. P. Geppetti, University of Florence, Italy, originally generated by Bautista and co-workers (Bautista et al., 2006). Mice were generated and characterized as described earlier (Meza et al., 2006). Animals were bred on a C57BL/6J background and crossed back after 10 generations. The genotype of offspring for the *Trpa1* gene was verified by PCR (sequences of primers: ASM2: ATC ACC TAC CAG TAA GTT CAT; ASP2: AGC TGC ATG TGT GAA TTA AAT).

Animals were housed in the animal facility of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs in a temperature and humidity controlled 12 h light–dark cycle environment (lights on at 6 a.m.) in standard polycarbonate cages (365 mm × 207 mm × 144 mm). *Ad libitum* standard rodent chow and tap water were provided for the animals. Four to six mice were housed in one cage.

During the experiments all efforts were provided to reduce the number of animals used and their suffering. All procedures applied in this protocol were approved by the Animal Welfare Committee at Pécs University and National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary (permission No: BA02/2000/33/2018) in agreement with the directive of the European Communities Council in

**FIGURE 1**

(A) Schematic representation of the single prolonged stress (SPS) experiment. The animals were restrained for 2 h, then forced to swim for 15 min before being exposed to diethyl ether narcosis until loss of consciousness (B) Time course of the behavioral experiments. On the first day, SPS was performed in the stressed groups of animals, after 2 weeks behavioral tests were performed in all animals. On the 16th day, mice were sacrificed, and tissue samples were collected for morphological analysis.

1986, and with the Law of XXCIII, in 1998, on Animal Care and Use in Hungary.

2.2 Experimental design

Animals were divided into four experimental groups: *Trpa1* KO ($n = 12$) and WT ($n = 9$) mice were exposed to SPS model of PTSD, while another set of *Trpa1* KO ($n = 10$) and WT ($n = 10$) mice were used as non-stressed controls. Animals were kept undisturbed in their home cages for 2 weeks after the SPS exposure then they were examined in the behavioral tests (forced swim test (FST), restraint). SPS experiments and the related behavioral tests were carried out during the early dark phase (i.e.: active phase of mice) between 18 and 22 h. To exclude the effect of acute stress caused by the behavioral tests, all animals were sacrificed for morphological studies 36 h after the last test (Figure 1).

2.3 Single prolonged stress

The SPS protocol was conducted as described earlier (Török et al., 2019). Briefly, each stressed animal was restrained for 2 h in a 50 ml conical tube closed with a screw on the top and having ventilation holes on the wall. Immediately after the restraint stress, the mice were forced to swim for 15 min in a 2 L Pyrex® graduated beaker filled with water to a depth of about 20 cm (1.5 L) at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Then the animals were dried with a towel and returned to their own cages for 15 min. Finally, each mouse was exposed to diethyl ether until loss of consciousness. At the end of the SPS, mice

were placed in new cages with fresh bedding. The translational value of SPS is based on the phenomenon that most human PTSD is triggered by combined stressors (Lisieski et al., 2018) and lead to elevated fear response and impaired fear extinction (Yamamoto et al., 2008; Ganon-Elazar and Akirav, 2012; Perrine et al., 2016).

2.3.1 Behavioral experiments

Behavioral experiments were carried out 14 days after the SPS protocol. The behavioral responses of mice were video recorded and later scored by computer-based event-recorder software (Solomon coder <https://solomon.andraspeter.com>) by an experimenter blinded to the treatment groups. Both the duration (in percentage) and frequency of all behavioral parameters were registered upon these tests.

2.3.2 Restraint

We applied the restraint stress again according to the protocol described above with the sole important difference that this time it only lasted for 15 min. We investigated the time spent immobility. Higher immobility time is characteristic for PTSD-like behavior (Török et al., 2019).

2.3.3 Forced swim test

After 1 h rest, each animal was exposed to FST similarly to described above for a total duration of 6 min. The following behavioral parameters were investigated: floating (no obvious activity or balancing only with one of the hind paws) as immobility; swimming (movements to emerge the head from the water using both hind paws) and struggling behavior (intense motion with all paws to escape from the

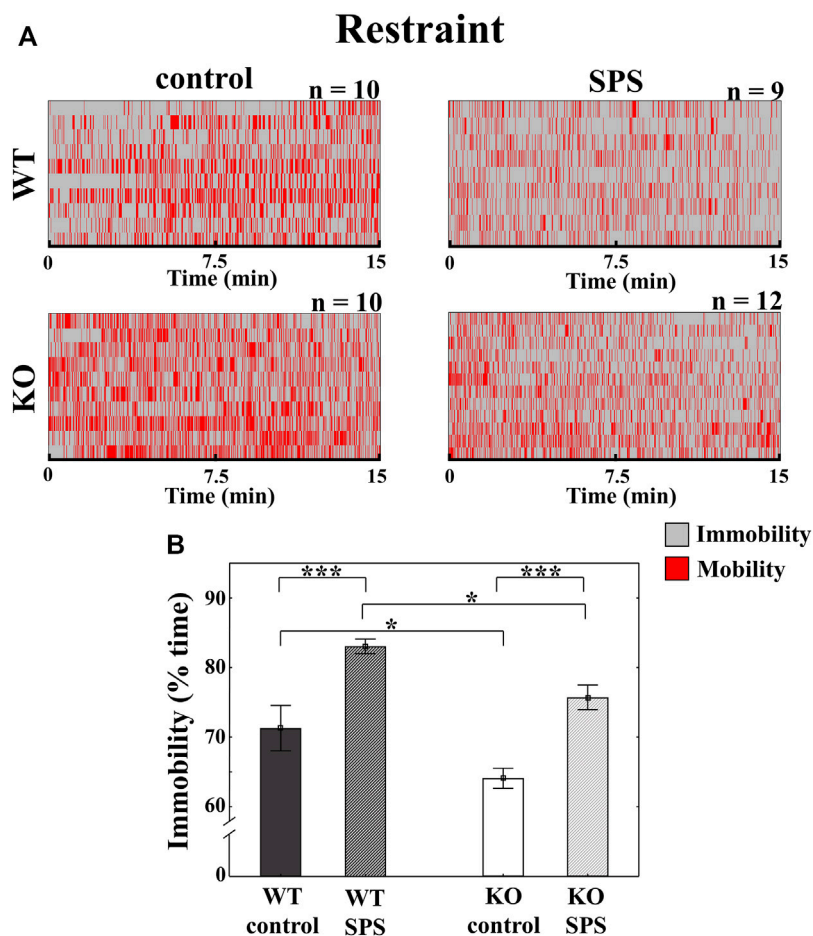


FIGURE 2

Alterations of the behavioral parameters in *Trpa1* wild type (WT) and knockout (KO) mice during the restraint stress. Individual values are represented on a Gantt diagram (A). Columns represent the time of immobility (B) (two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$; $n = 9$ – 12 /group). SPS: single prolonged stress.

beaker) as mobility. Immobility reflects passive coping (Sabban et al., 2015; Kormos et al., 2022) and is considered a sign of PTSD (Török et al., 2019).

2.4 Perfusion, tissue collection

Thirty-six hours after the behavioral experiments all animals were deeply anesthetized by intraperitoneal urethane injection (2.4 g/kg) and transcardially perfused with 20 ml of ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH: 7.4) followed by 150 ml 4% paraformaldehyde (PFA) solution in Millonig buffer (pH 7.4) for 15 min. After this procedure, the brains were removed, and collected into PFA for 72 h postfixation at 4°C. The brains were coronally sectioned using a Leica VT1000 S vibratome (Leica

Biosystems, Wetzlar, Germany), three series of 30 μ m sections were collected and stored in antifreeze solution (20% ethylene glycol, 30% glycerol and 0.1 M sodium-phosphate buffer) at -20°C . Sections containing the EWcp (from Bregma -2.92 mm to -4.04 mm according to Paxinos and Franklin (Paxinos and Franklin, 2001)) were selected for morphological studies.

2.5 RNAscope *in situ* hybridization (ISH) combined with immunofluorescence

The RNAscope ISH was performed on two different series of coronal EWcp sections to detect the *Ucn1* and *Trpa1* mRNA expression. RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v.2 (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, United States) was

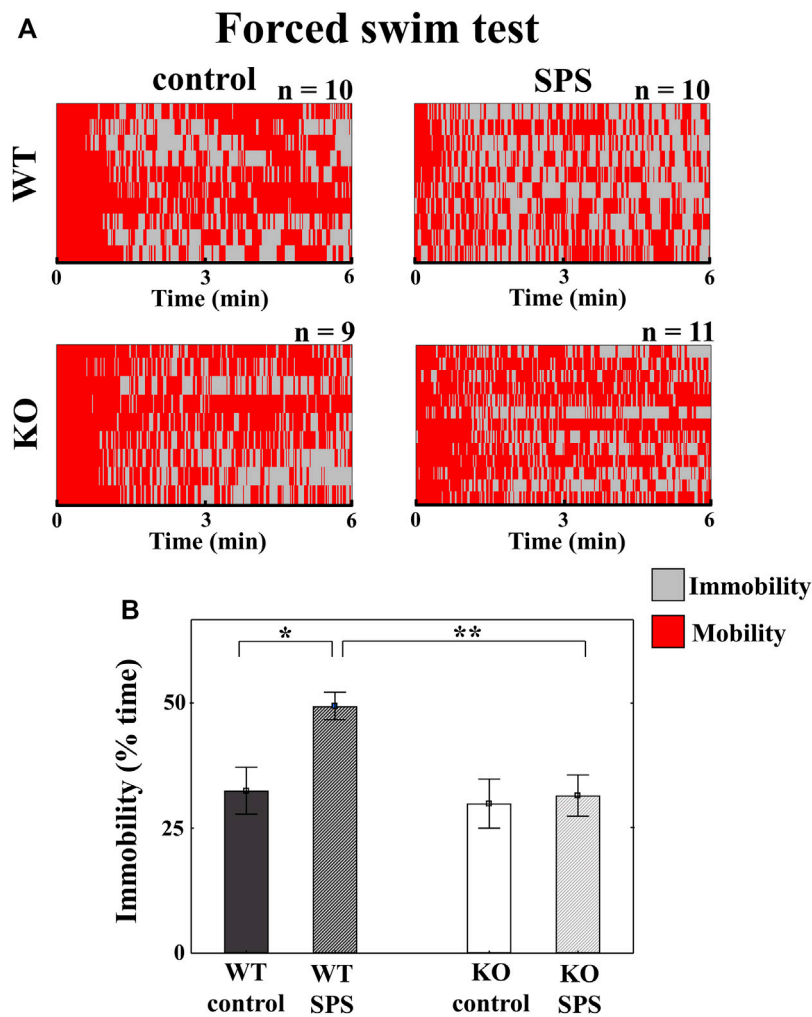


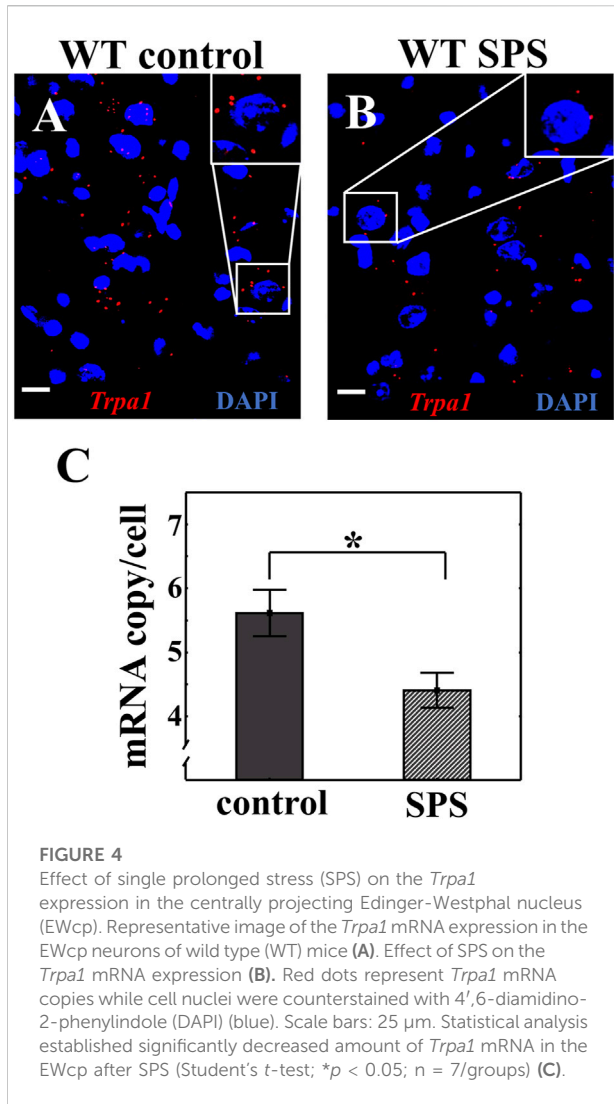
FIGURE 3

Changes in the behavioral parameters in *Trpa1* wild type (WT) and knockout (KO) mice during the forced swim test. Individual values are represented on a Gantt diagram (A). Columns depict the duration of immobility (B) (two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$; $n = 9$ – 12 /group). SPS: single prolonged stress.

used according to the protocol described earlier by our research group (Konkoly et al., 2021). Briefly, after the tissue pretreatment, samples were hybridized with the probe specific to mouse *Trpa1* (ACD, Cat. No. 400,211-C2) and *Ucn1* (ACD, Cat. No. 466,261) mRNA. In our KO animals the major part of exon 23 was replaced, thus, a modified *Trpa1* mRNA and mutated TRPA1 protein is expressed in KO mice with loss of function. However, the commercially available RNAscope probe hybridizes with the non-deleted mRNA sequence of the non-functioning protein, the RNAscope gives positive signal in knockout mice also.

Signal amplification and channel development was carried out according to the manual. In case of RNAscope 3-plex mouse positive control probes (ACD; Cat. No. 320,881, Advanced Cell Diagnostics,

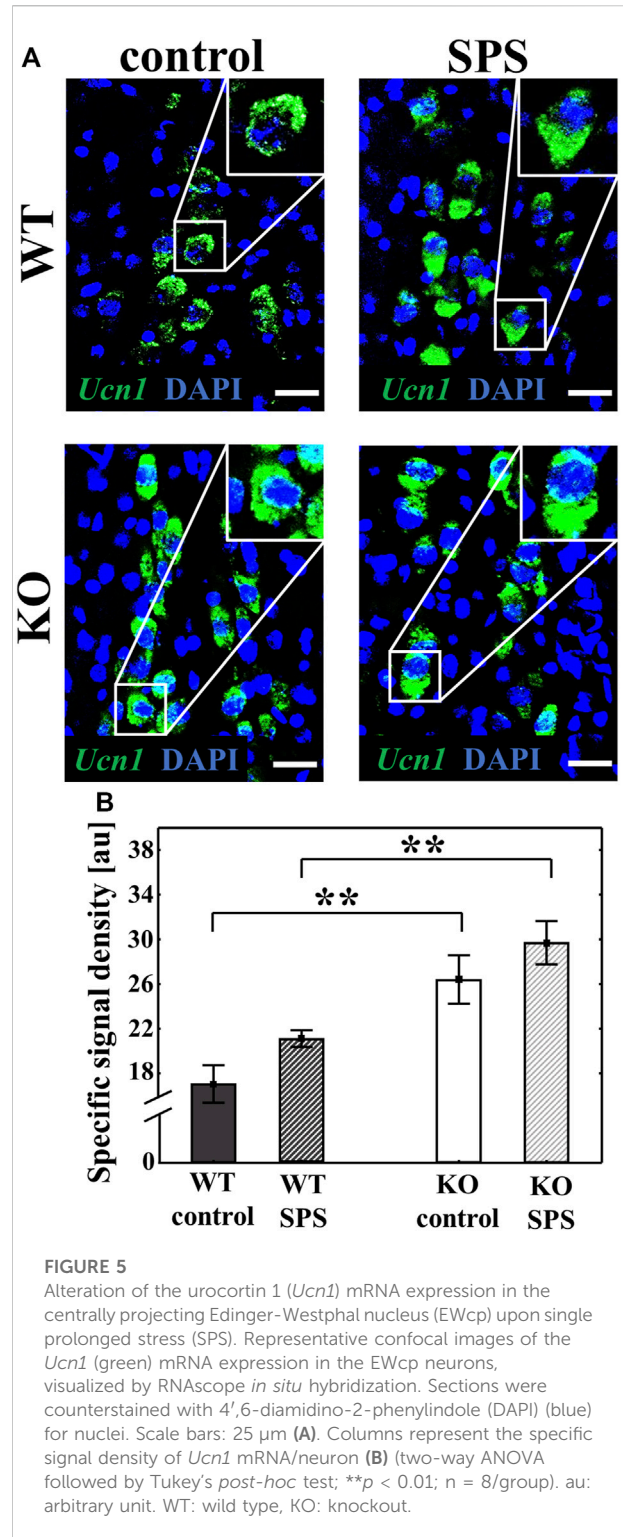
Newark, CA, United States), specific to RNA polymerase II subunit A mRNA (*Polr2a* (fluorescein)), peptidylprolyl isomerase B mRNA (*Ppip* (cyanine 3, Cy3)) and ubiquitin C mRNA (*Ubc* (cyanine 5, Cy5)), and 3-plex negative control probes (ACD; Cat. No. 320,871), specific to bacterial D-box binding PAR BZIP transcription factor (*dabP*) mRNA, were also used as technical controls. That series, where the *Trpa1* was the target, ISH was combined with immunofluorescence to measure the UCN1 peptide content of the neurons in the EWcp (Kormos et al., 2022). Briefly, after channel development of the RNAscope ISH, sections were washed for 2×15 min in PBS, incubated overnight at room temperature (RT) with recombinant anti-urocortin 1 antibody (Abcam Cat. No. ab283503) diluted (1:10,000) in PBS with 2% normal donkey serum. Sections were washed for 2×15 min in PBS and



incubated in Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK; Cat. No. 711-545-152), diluted to 1:500 in $1 \times$ PBS with 2% normal donkey serum for 3 h at RT. After rinses, we applied 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI (Cat. No. 323,108, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA)) to visualize cell nuclei and sections were mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) for confocal microscopy.

2.6 Microscopy, digital imaging, and morphometry

For imaging we used the Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning confocal microscope and FluoView FV-1000S-IX81 image acquisition software system (Olympus



Europa, Hamburg, Germany). Digital images were obtained by sequential scanning in analogue mode for the respective fluorophores to avoid false positive signal due to the slightly overlapping emission spectra and to detect

reliably quantifiable fluorescent signal. The confocal aperture was set to 80 μm , and the analogue sequential scanning was performed using a $\times 60$ objective lens (NA: 1.35). An optical thickness of 3.5 μm was calculated by the software and the resolution was set to 1,024 \times 1,024 pixel. The excitation time was set to 4 μs per pixel. DAPI was excited at 405 nm, Fluorescein as well as Alexa Fluor 488 at 488 nm and Cy3 at 543 nm. To visualize the different targets, we used the following virtual colors for the fluorescent signals: blue for DAPI, red for Cyanine 3, green for Fluorescein and Alexa 488.

The morphometry was performed using ImageJ software (version 1.52a, NIH, United States) on non-edited pictures. In case of the *Ucn1* mRNA and UCN1 peptide the intensity of the fluorescence was measured in 5-10 cell bodies for *Ucn1*/UCN1 using four non-edited images of the corresponding channel. The region of interest was manually determined at cytoplasmic areas of neurons. The signal density was measured and corrected for the background signal. The specific signal density (SSD) was expressed in arbitrary units (au). The average of the SSD of 5-10 neurons was quantified in four sections. The average of these four values represented the SSD value of one mouse.

In case of the *Trpa1* mRNA signal we manually counted the number of copies per cell in 5-10 neurons of a section, in four representative sections per animal. Finally, these values were averaged as described above and subjected to the statistical assessment.

2.7 Statistical analysis

All statistical analyses were carried out applying Statistica 13.5.0 software. Data are represented as mean \pm SEM. Datasets were tested for normal distribution and for homogeneity of variance. The comparison between mRNA expression of control and stressed WT animals was performed by paired sample *t*-test. In the further experiments, the main effects were studied by two-way analysis of variance (ANOVA, factors SPS and genotype) followed by Tukey's *post hoc* tests. If the *p*-value was lower than 0.05, it was considered statistically significant.

3 Results

3.1 TRPA1 KO mice show blunted SPS-induced immobility in the restraint stress compared to the stressed WT animals

In restraint stress, we detected enhanced immobility in both stressed groups compared to the control, non-stressed mice with

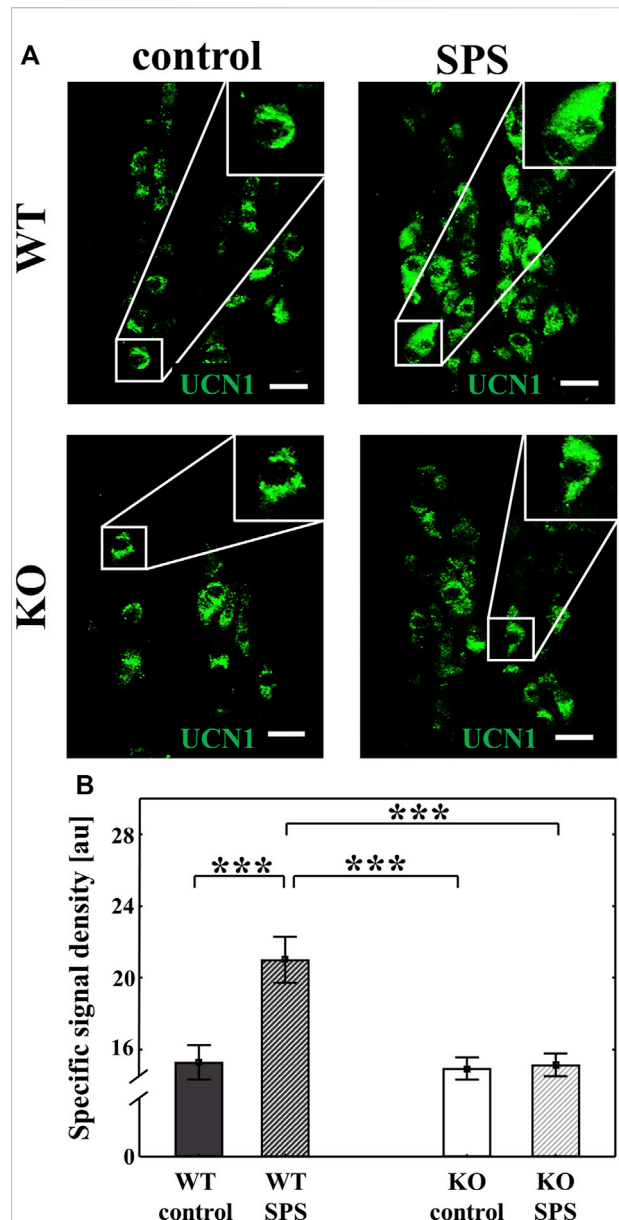
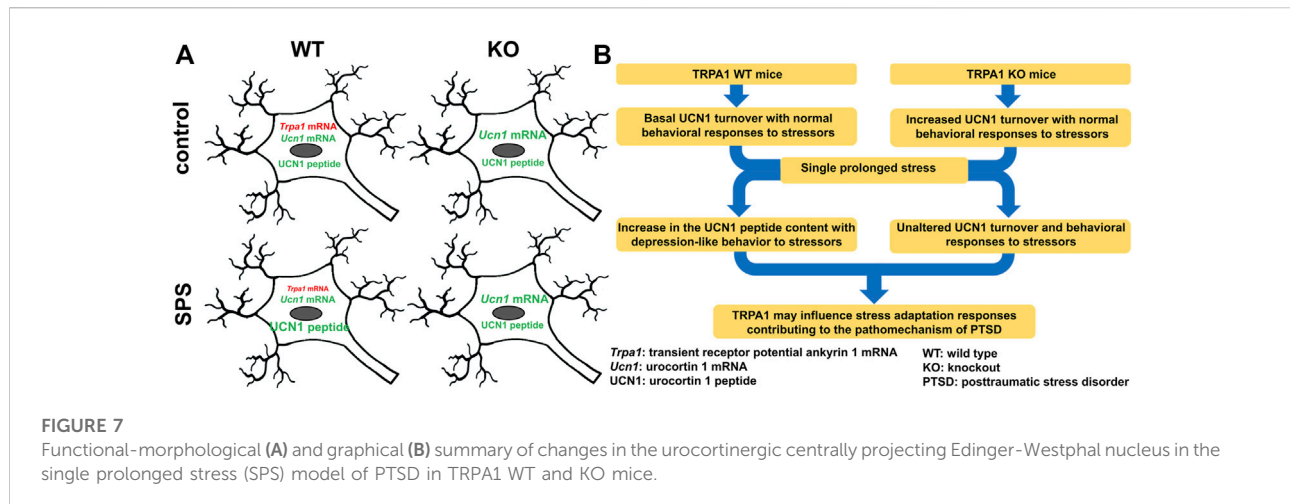


FIGURE 6
Effects of single prolonged stress (SPS) on the urocortin 1 (UCN1) peptide content of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (EWcp) neurons. Representative confocal images of the UCN1 (green) immunofluorescence in the EWcp neurons. Scale bars: 25 μm (A). Columns represent the specific signal density of urocortin 1 peptide/neuron (B) (two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test; ****p* < 0.001; *n* = 8/group). au: arbitrary unit, WT: wild type, KO: knockout.

a significant main effect of stress ($F_{\text{SPS}}(1.36) = 30.34$, $p < 0.01$). The determinant influence of the genotype ($F_{\text{genotype}}(1.36) = 11.81$, $p < 0.01$) meant that the degree of immobility was significantly lower in both groups of KO mice in comparison with the related WT animals without interaction between stress and genotype (Figure 2).



3.1.1 TRPA1 KO mice do not show SPS-induced immobility in forced swim test

During the FST, stressed WT mice showed significantly increased immobility compared to their control counterparts, however such differences were not detectable in case of KO animals with a significant main effect of the genotype in ANOVA ($F_{\text{genotype}}(1.37) = 5.61, p < 0.03$), and strong tendency in the main effect of stress ($F_{\text{SPS}}(1.37) = 4.07, p < 0.06$), but without interaction between stress and genotype (Figure 3).

3.2 *Trpa1* mRNA expression is downregulated in the urocortinergic neurons of the EWcp upon SPS

RNAscope ISH was used to investigate the *Trpa1* expression in the EWcp combined with UCN1 immunofluorescent signal in WT animals. We have proven once again the colocalization of *Trpa1* transcripts with UCN1 peptide in the EWcp neurons (Suppl. Figure 1). We detected significantly lower number of *Trpa1* mRNA copies in the urocortinergic neurons of stressed animals compared to the controls ($t_{\text{copy/cell}}(2.14) = 2.65, p < 0.02$) (Figure 4).

3.3 Increased basal *Ucn1* mRNA expression was detected in the EWcp of TRPA1 KO mice

RNAscope ISH was used to measure the *Ucn1* mRNA expression in the EWcp of WT and KO mice. Both basal and SPS-induced *Ucn1* expression was significantly elevated in the KO animals compared to the WT counterparts with a

strong main effect of the genotype ($F_{\text{genotype}}(1.22) = 30.70, p < 0.01$) and the stress ($F_{\text{SPS}}(1.22) = 4.99, p < 0.04$) without interaction. Although stress has a main effect in ANOVA test, upon Tukey's *post hoc* comparison there was no significant difference between controls and SPS-treated groups (both p_{WT} and $p_{\text{KO}} > 0.30$). (Figure 5).

3.4 TRPA1 KO mice do not show elevated UCN1 peptide content of EWcp neurons upon SPS

We performed immunofluorescence staining to detect the UCN1 in the EWcp neurons. UCN1 peptide content was significantly increased in WT animals upon SPS ($F_{\text{SPS}}(1.28) = 10.29, p < 0.01$), however, no SPS-induced changes were observed in KO mice ($F_{\text{genotype}}(1.28) = 11.36, p < 0.01$), which was supported with a strong interaction in ANOVA ($F_{\text{interaction}}(1.28) = 8.95, p < 0.01$, upon Tukey's *post hoc* comparison both p_{WT} and $p_{\text{KO}} < 0.01$) (Figure 6).

4 Discussion

In mice, the PTSD model SPS diminished the *Trpa1* mRNA content in the EWcp with a concomitant increase in its UCN1 content (see also Supplementary Figure S1 for independent replication). Additionally, the SPS-induced PTSD-like behavioral symptoms were diminished in the lack of TRPA1, together with a prevention of EWcp/UCN1 protein increase. Controversially, UCN1 mRNA of the EWcp was higher in KO than WT, independently from stress.

The behavioral results proved the reliability of the SPS as PTSD model as the WT mice showed higher immobility during

both the FST and restraint tests, characteristic for the PTSD (Lisieski et al., 2018; Verbitsky et al., 2020). The increased immobility during both tests were supported by findings of other research groups (Yamamoto et al., 2009; Serova et al., 2013, 2014; Sabban et al., 2015). Moreover, our present observation in FST that the lack of TRPA1 prevented stress-induced behavioral changes is consistent with our previous findings in the CVMS model (Kormos et al., 2022). These behavioral observations suggest a functional role of TRPA1 in stress adaptation.

As *Trpa1* mRNA occurred in the EWcp in the greatest amount, next we focused on this area. First, we replicated our recent findings (Kormos et al., 2022; Al-Omari et al., unpublished), that exclusively UCN1 positive cells express *Trpa1* in the mouse EWcp (Supplementary Figure S2). *Trpa1* mRNA expression was significantly reduced upon SPS in WT mice, which is in full agreement with our previous results in the CVMS model (Kormos et al., 2022). The high translational value and the relevance of TRPA1 in stress (mal)adaptation is further supported by our findings in EWcp samples of suicide victims where the *TRPA1* mRNA was also downregulated (Kormos et al., 2022).

As we have observed that the downregulation of *Trpa1* is a common phenomenon in these stress models, the question arises as to what might be behind this change. One plausible explanation from the pharmacological point of view may be that the action of an agonist may lead to the downregulation of its target (Rang et al., 2018). TRPA1 ion channels are known to be activated by glia-derived (Hori and Kim, 2019; Oroian et al., 2021) reactive free radicals including lipid peroxidation products and prostanoids (Logashina et al., 2019; Talavera et al., 2020), mediators released during oxidative stress, neuroinflammation and importantly, in PTSD (Yehuda, 1998; Kasckow et al., 2001; Rohleder et al., 2010; Ozdemir et al., 2012; Aschbacher et al., 2013; Bulut et al., 2013; Miller et al., 2015, 2018; Atli et al., 2016; Stoop, 2016; Hori and Kim, 2019; Oroian et al., 2021). Further molecular pharmacological studies are required to identify the exact role of inflammatory mediators in the regulation of *Trpa1* expression in the EWcp. In the lack of a widely trusted TRPA1 antibody, our present work provides only findings at mRNA level regarding TRPA1. Importantly, most recently we proved the presence of functionally active TRPA1 in EWcp/UCN1 cells by electrophysiological tools (Al-Omari et al. unpublished).

The modulatory role of TRPA1 in the control of UCN1 cells is further supported by our findings, that in the absence of the functional receptor, neither the *Ucn1* mRNA nor the UCN1 peptide content of the cells increased in the SPS model. Interestingly, this was in line with unchanged FST immobility time in SPS-exposed KO mice. This altered stress response might be explained by the reduced adaptation capacity of the UCN1 cells in KO mice as shown both by higher basal *Ucn1* mRNA expression level compared to the WT counterparts,

and by absence of response to SPS. Interestingly, we observed the same basal difference between the genotypes in CVMS model (Kormos et al., 2022). We might assume that TRPA1 will also affect the release of UCN1 and thereby stress adaptation (Kozicz et al., 2001; Gaszner and Kozicz, 2003; Gaszner and Kozicz, 2003; Gaszner et al., 2007, 2012; Rouwette et al., 2011; Kormos and Gaszner, 2013; Kormos et al., 2022; Ujvári et al., 2022). Although we do not provide experimental evidence for this in the present study, it is already known that activation of the TRPA1 cation channel may increase the neuropeptide release (e.g., UCN1) via elevated intracellular calcium level (Denner et al., 2017; Casello et al., 2022). We might assume that the stress-induced decrease in *Trpa1* expression is aimed to compensate the exaggerated UCN1 release and thereby the behavioral responses. However, further investigations are needed to confirm this theory. Moreover, there was a discrepancy between the low EWcp/UCN1 peptide content of the TRPA1 KO mice despite their high *Ucn1* mRNA levels, which may be explained by the altered dynamics of UCN1 peptide release. It is supported by the previously mentioned role of TRPA1 in the intracellular calcium homeostasis, as well as by its possible developmental influence (Asai et al., 2010). However, we cannot exclude that other cation channels expressed in the EWcp (Li and Ryabinin, 2022), may have compensated for the lack of TRPA1 in KO mice.

Finally, it is well-known that PTSD may show co-morbidity with enhanced pain sensitivity (Gibson, 2012) and somatoform disorders (Afari et al., 2014; Egle et al., 2016). Interestingly, epigenetic modifications on the promoter of *TRPA1* gene in human leukocytes were found in these conditions (Achenbach et al., 2019). Since the epigenetic profile of a gene promoter may be similar in both the peripheral and central nervous system (Davies et al., 2012) it is plausible that these epigenetic changes may also affect TRPA1 on EWcp/UCN1 neurons. We earlier found that maternal deprivation blunts the stress responsivity of UCN1 neurons in the rat EWcp (Gaszner et al., 2009). Consistently, early life stress in mice caused epigenetic modifications of histone H3 acetylation in EWcp/UCN1 cells if superimposed with CVMS (Gaszner et al., 2022). These data raise the possibility that the EWcp/UCN1 neurons may contribute not only to the development of major depression (Kormos and Gaszner, 2013; Farkas et al., 2017) but also may underlie PTSD, a disease that share similar epigenetic pathobiological mechanisms (Blacker et al., 2019).

5 Conclusion and future perspectives

Decreased *Trpa1* mRNA expression in the PTSD model was associated with increased neuronal UCN1 peptide content in the EWcp. This suggests the involvement of this cation channel in stress (mal)adaptation contributing to the pathomechanism of PTSD (Figure 7). In our ongoing research we examine the recruitment of EWcp/TRPA1/

UCN1 neurons in models of PTSD in contexts of neuroinflammation and epigenetics.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of Pécs University and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary.

Author contributions

Conceptualization, EP, DZ, VK, and JK; Methodology, DZ, VK, JK, and TB-S; Investigation, DZ, PC, VK, and JK; Validation, DZ, VK, and JK; Formal Analysis, DZ, VK, and JK; Visualization, BG, VK and GB; Resources, EP, and DZ; Supervision, EP, VK, and DZ; Writing—Original Draft Preparation, JK, DZ, VK, and EP; Writing—Review and Editing, BG, PC, TB-S, and GB. Funding acquisition, EP, DZ, VK, BG, and JK. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding

The scientific research and results publicized in this article was reached with the sponsorship of Gedeon Richter Talentum Foundation in framework of Gedeon Richter Excellence PhD Scholarship of Gedeon Richter. VK was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00750/22/5) and by the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research,

References

- Achenbach, J., Rhein, M., Gombert, S., Meyer-Bockenkamp, F., Buhck, M., Eberhardt, M., et al. (2019). Childhood traumatization is associated with differences in TRPA1 promoter methylation in female patients with multisomatoform disorder with pain as the leading bodily symptom. *Clin. Epigenetics* 11 (1), 126. doi:10.1186/s13148-019-0731-0
- Afari, N., Ahumada, S. M., Wright, L. J., Mostoufi, S., Golnari, G., Reis, V., et al. (2014). Psychological trauma and functional somatic syndromes: A systematic review and meta-analysis. *Psychosom. Med.* 76 (1), 2–11. doi:10.1097/PSY.000000000000010
- Asai, Y., Holt, J. R., and Géléoc, G. S. G. (2010). A quantitative analysis of the spatiotemporal pattern of transient receptor potential gene expression in the developing mouse cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 11 (1), 27–37. doi:10.1007/s10162-009-0193-8
- Aschbacher, K., O'Donovan, A., Wolkowitz, O. M., Dhabhar, F. S., Su, Y., and Epel, E. (2013). Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 38 (9), 1698–1708. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.02.004
- Atli, A., Bulut, M., Bez, Y., Kaplan, I., Ozdemir, P. G., Uysal, C., et al. (2016). Altered lipid peroxidation markers are related to post-traumatic stress disorder (PTSD) and not trauma itself in earthquake survivors. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 266 (4), 329–336. doi:10.1007/s00406-015-0638-5
- Auxéméry, Y. (2018). Post-traumatic psychiatric disorders: PTSD is not the only diagnosis. *Presse Med.* 47 (5), 423–430. doi:10.1016/j.lpm.2017.12.006

Development and Innovation Fund (ÚNKP-22-5-PTE-1740). “Project no. TKP2021-EGA-16 has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the EGA 16 funding scheme.” to BG. and E.P. “Project no. RRF-2.3.1-21-2022-00015 has been implemented with the support provided by the European Union.” and by the Hungarian Brain Research Program 3.0 (NAP 3.0) 2022–2025. DZ was supported by the National Research Development and Innovation Office of Hungary (K141934, K138763).

Acknowledgments

Authors are grateful for the References and Editors of the Journal for their thorough work and valuable suggestions.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.1059073/full#supplementary-material>

- Bale, T. L., Lee, K.-F., and Vale, W. W. (2002). The role of corticotropin-releasing factor receptors in stress and anxiety. *Integr. Comp. Biol.* 42 (3), 552–555. doi:10.1093/icb/42.3.552
- Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., et al. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124 (6), 1269–1282. doi:10.1016/j.cell.2006.02.023
- Blacker, C. J., Frye, M. A., Morava, E., Kozicz, T., and Veldic, M. (2019). A review of epigenetics of PTSD in comorbid psychiatric conditions. *Genes* 10 (2), E140. doi:10.3390/genes10020140
- Bulut, M., Selek, S., Bez, Y., Karababa, I. F., Kaya, M. C., Gunes, M., et al. (2013). Reduced PON1 enzymatic activity and increased lipid hydroperoxide levels that point out oxidative stress in generalized anxiety disorder. *J. Affect. Disord.* 150 (3), 829–833. doi:10.1016/j.jad.2013.03.011
- Casello, S. M., Flores, R. J., Yarur, H. E., Wang, H., Awanyai, M., Arenivar, M. A., et al. (2022). Neuropeptide system regulation of prefrontal cortex circuitry: Implications for neuropsychiatric disorders. *Front. Neural Circuits* 16, 796443. doi:10.3389/fncir.2022.796443
- Davies, M. N., Volta, M., Pidsley, R., Lunnon, K., Dixit, A., Lovestone, S., et al. (2012). Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol.* 13 (6), R43. doi:10.1186/gb-2012-13-6-r43
- Denner, A. C., Vogler, B., Messlinger, K., and De Col, R. (2017). Role of transient receptor potential ankyrin 1 receptors in rodent models of meningeal nociception - experiments *in vitro*. *Eur. J. Pain* 21 (5), 843–854. doi:10.1002/ejp.986
- Deppermann, S., Storchak, H., Fallgatter, A. J., and Ehlich, A. C. (2014). Stress-induced neuroplasticity: (mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD—a critical overview. *Neuroscience* 283, 166–177. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.037
- Deussing, J. M., and Chen, A. (2018). The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. *Physiol. Rev.* 98 (4), 2225–2286. doi:10.1152/physrev.00042.2017
- Dunlop, B. W., and Wong, A. (2019). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD: Pathophysiology and treatment interventions. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 89, 361–379. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.10.010
- Egle, U. T., Egloff, N., and von Känel, R. (2016). Stress-induced hyperalgesia (SIH) as a consequence of emotional deprivation and psychosocial traumatization in childhood: Implications for the treatment of chronic pain. *Schmerz (Berlin, Ger.)* 30 (6), 526–536. doi:10.1007/s00482-016-0107-8
- Farkas, J., Kovacs, L. A., Gaspar, L., Nafz, A., Gaszner, T., Ujvari, B., et al. (2017). Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience* 354, 11–29. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.04.019
- Ganon-Elazar, E., and Akirav, I. (2012). Cannabinoids prevent the development of behavioral and endocrine alterations in a rat model of intense stress. *Neuropsychopharmacology* 37 (2), 456–466. doi:10.1038/npp.2011.204
- Gaszner, B., Csernus, V., and Kozicz, T. (2004). Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 480 (2), 170–179. doi:10.1002/cne.20343
- Gaszner, B., Jensen, K. O., Farkas, J., Reglodi, D., Csernus, V., Roubos, E. W., et al. (2009). Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27 (5), 439–451. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006
- Gaszner, B., Kormos, V., Kozicz, T., Hashimoto, H., Reglodi, D., and Helyes, Z. (2012). The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 202, 283–299. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.11.046
- Gaszner, B., Korosi, A., Palkovits, M., Roubos, E. W., and Kozicz, T. (2007). Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 500 (4), 708–719. doi:10.1002/cne.21177
- Gaszner, B., and Kozicz, T. (2003). Interaction between catecholaminergic terminals and urocortinergic neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Brain Res.* 989 (1), 117–121. doi:10.1016/s0006-8993(03)03367-5
- Gaszner, T., Farkas, J., Kun, D., Ujvári, B., Berta, G., Csernus, V., et al. (2022). Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 13, 995900. doi:10.3389/fendo.2022.995900
- Gibson, C.-A. (2012). Review of posttraumatic stress disorder and chronic pain: The path to integrated care. *J. Rehabil. Res. Dev.* 49 (5), 753–776. doi:10.1682/jrrd.2011.09.0158
- Harnett, N. G., Goodman, A. M., and Knight, D. C. (2020). PTSD-related neuroimaging abnormalities in brain function, structure, and biochemistry. *Exp. Neurol.* 330, 113331. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113331
- Hori, H., and Kim, Y. (2019). Inflammation and post-traumatic stress disorder. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 73 (4), 143–153. doi:10.1111/pcn.12820
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155833
- Kamiya, K., and Abe, O. (2020). Imaging of posttraumatic stress disorder. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 30 (1), 115–123. doi:10.1016/j.nic.2019.09.010
- Kasckow, J. W., Baker, D., and Geraciotti, T. D. J. (2001). Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides* 22 (5), 845–851. doi:10.1016/s0196-9781(01)00399-0
- Konkoly, J., Kormos, V., Gaszner, B., Sandor, Z., Kecskes, A., Alomari, A., et al. (2021). The role of TRPA1 channels in the central processing of odours contributing to the behavioural responses of mice. *Pharm. (Basel, Switz.)* 14 (12), 1336. doi:10.3390/ph14121336
- Kormos, V., and Gaszner, B. (2013). Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans. *Neuropeptides* 47 (6), 401–419. doi:10.1016/j.npep.2013.10.014
- Kormos, V., Kecskes, A., Farkas, J., Gaszner, T., Csernus, V., Alomari, A., et al. (2022). Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *J. Psychiatry Neurosci.* 47 (3), E162–E175. doi:10.1503/jpn.210187
- Kozicz, T., Li, M., and Arimura, A. (2001). The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus following stress in rats. *Stress (Amsterdam, Neth.)* 4 (2), 85–90. doi:10.3109/10253890109115724
- Kozicz, T. (2007). On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153 (1–3), 235–240. doi:10.1016/j.ygcen.2007.04.005
- Li, J., and Ryabinin, A. E. (2022). Oxytocin receptors in the mouse centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus and their potential functional significance for thermoregulation. *Neuroscience* 498, 93–104. doi:10.1016/j.neuroscience.2022.07.002
- Li, X., Chen, W., Pan, K., Li, H., Pang, P., Guo, Y., et al. (2018). Serotonin receptor 2c-expressing cells in the ventral CA1 control attention via innervation of the Edinger-Westphal nucleus. *Nat. Neurosci.* 21 (9), 1239–1250. doi:10.1038/s41593-018-0207-0
- Lisieski, M. J., Eagle, A. L., Conti, A. C., Liberzon, I., and Perrine, S. A. (2018). Single-prolonged stress: A review of two decades of progress in a rodent model of post-traumatic stress disorder. *Front. Psychiatry* 9, 196. doi:10.3389/fpsy.2018.00196
- Logashina, Y. A., Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., and Andreev, Y. A. (2019). TRPA1 channel as a regulator of neurogenic inflammation and pain: Structure, function, role in pathophysiology, and therapeutic potential of ligands. *Biochemistry* 84 (2), 101–118. doi:10.1134/S0006297919020020
- Meza, N. W., Puyet, A., Perez-Benavente, S., Quintana-Bustamante, O., Diez, A., Bueren, J. A., et al. (2006). Functional analysis of gammaretroviral vector transduction by quantitative PCR. *J. Gene Med.* 8 (9), 1097–1104. doi:10.1002/jgm.951
- Miller, M. W., Lin, A. P., Wolf, E. J., and Miller, D. R. (2018). Oxidative stress, inflammation, and neuroprogression in chronic PTSD. *Harv. Rev. Psychiatry* 26 (2), 57–69. doi:10.1097/HRP.0000000000000167
- Miller, M. W., Wolf, E. J., Sadeh, N., Logue, M., Spielberg, J. M., Hayes, J. P., et al. (2015). A novel locus in the oxidative stress-related gene ALOX12 moderates the association between PTSD and thickness of the prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology* 62, 359–365. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.003
- Moore, C., Gupta, R., Jordt, S. E., Chen, Y., and Liedtke, W. B. (2018). Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neurosci. Bull.* 34 (1), 120–142. doi:10.1007/s12264-017-0200-8
- Olah, E., Rumbus, Z., Kormos, V., Tekus, V., Pakai, E., Wilson, H. V., et al. (2021). The hypothesized effect of hydrogen sulfide is mediated by the transient receptor potential ankyrin-1 channel in mice. *Pharm. (Basel, Switz.)* 14 (10), 992. doi:10.3390/ph14100992
- Oroian, B. A., Ciobica, A., Timofte, D., Stefanescu, C., and Serban, I. L. (2021). New metabolic, digestive, and oxidative stress-related manifestations associated with posttraumatic stress disorder. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 5599265. doi:10.1155/2021/5599265
- Ozdemir, O., Selvi, Y., Ozkol, H., Tuluze, Y., Besiroglu, L., and Aydin, A. (2012). Comparison of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and adenosine deaminase activities between respiratory and nocturnal subtypes

- of patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 66 (4), 244–251. doi:10.1159/000341880
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). *Mouse brain in stereotaxic coordinates*. Cambridge, MA, USA: Academic Press.
- Perrine, S. A., Eagle, A. L., George, S. A., Mulo, K., Kohler, R. J., Gerard, J., et al. (2016). Severe, multimodal stress exposure induces PTSD-like characteristics in a mouse model of single prolonged stress. *Behav. Brain Res.* 303, 228–237. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.056
- Perry, B. D., and Pollard, R. (1998). Homeostasis, stress, trauma, and adaptation: A neurodevelopmental view of childhood trauma. *Child Adolesc. Psychiatric Clin. N. Am.* 7 (1), 33–51. doi:10.1016/s1056-4993(18)30258-x
- Priest, M. F., Freda, S. N., Badong, D., Dumrongprechachan, V., and Kozorovitskiy, Y. (2021). Peptidergic modulation of fear responses by the Edinger-Westphal nucleus. *bioRxiv*. doi:10.1101/2021.08.05.455317
- Rang, H. (2018). “Rang & dale’s Pharmacology. 9,” in *Rod flower, graeme henderson, yoon kong loke, david MacEwan*. Editor H. R. James Ritter (London: Elsevier).
- Rohleder, N., Wolf, J. M., and Wolf, O. T. (2010). Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (1), 104–114. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.12.003
- Rouvette, T., Klemann, K., Gaszner, B., Scheffer, G. J., Roubos, E. W., Scheenen, W. J. J. M., et al. (2011). Differential responses of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 to acute pain stress in the rat brain. *Neuroscience* 183, 15–24. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.054
- Sabban, E. L., Serova, L. I., Alaluf, L. G., Laukova, M., and Peddu, C. (2015). Comparative effects of intranasal neuropeptide Y and HS014 in preventing anxiety and depressive-like behavior elicited by single prolonged stress. *Behav. Brain Res.* 295, 9–16. doi:10.1016/j.bbr.2014.12.038
- Serova, L. I., Laukova, M., Alaluf, L. G., and Sabban, E. L. (2013). Intranasal infusion of melanocortin receptor four (MC4R) antagonist to rats ameliorates development of depression and anxiety related symptoms induced by single prolonged stress. *Behav. Brain Res.* 250, 139–147. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.006
- Serova, L. I., Laukova, M., Alaluf, L. G., Pucillo, L., and Sabban, E. L. (2014). Intranasal neuropeptide Y reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24 (1), 142–147. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.11.007
- Souza Monteiro de Araujo, D., Nassini, R., Geppetti, P., and De Logu, F. (2020). TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opin. Ther. Targets* 24 (10), 997–1008. doi:10.1080/14728222.2020.1815191
- Stoop, R. (2016). Sniffing and oxytocin: Effects on olfactory memories. *Neuron* 90 (3), 431–433. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.033
- Talavera, K., Startek, J. B., Alvarez-Collazo, J., Boonen, B., Alpizar, Y. A., Sanchez, A., et al. (2020). Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: From structure to disease. *Physiol. Rev.* 100 (2), 725–803. doi:10.1152/physrev.00005.2019
- Topilko, T., Diaz, S. L., Pacheco, C. M., Verny, F., Rousseau, C. V., Kirst, C., et al. (2022). Edinger-Westphal peptidergic neurons enable maternal preparatory nesting. *Neuron* 110 (8), 1385–1399.e8. doi:10.1016/j.neuron.2022.01.012
- Török, B., Sipos, E., Pivac, N., and Zelena, D. (2019). Modelling posttraumatic stress disorders in animals. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 90, 117–133. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.11.013
- Ujvári, B., Pytel, B., Marton, Z., Bognar, M., Kovacs, L. A., Farkas, J., et al. (2022). Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson’s disease in the rat. *J. Neuroinflammation* 19 (1), 31. doi:10.1186/s12974-022-02399-w
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M. H., Lewis, K., Sutton, S., et al. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378 (6554), 287–292. doi:10.1038/378287a0
- Verbitsky, A., Dopfel, D., and Zhang, N. (2020). Rodent models of post-traumatic stress disorder: Behavioral assessment. *Transl. Psychiatry* 10 (1), 132. doi:10.1038/s41398-020-0806-x
- Yamamoto, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Kurata, A., Kozuru, T., and Yamawaki, S. (2008). Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology* 33 (9), 2108–2116. doi:10.1038/sj.npp.1301605
- Yamamoto, S., Morinobu, S., Takei, S., Fuchikami, M., Matsuki, A., Yamawaki, S., et al. (2009). Single prolonged stress: Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress. Anxiety* 26 (12), 1110–1117. doi:10.1002/da.20629
- Yehuda, R. (1998). Psychoneuroendocrinology of post-traumatic stress disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* 21 (2), 359–379. doi:10.1016/s0193-953x(05)70010-1
- Zuniga, A., and Ryabinin, A. E. (2020). Involvement of centrally projecting Edinger-Westphal nucleus neuropeptides in actions of addictive drugs. *Brain Sci.* 10 (2), E67. doi:10.3390/brainsci10020067